

1-1-2010

Determinación de la concentración letal media CL50 48 de aluminio y arsénico mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia magna*

Saudy Lorena Torres Cardozo
Universidad de La Salle, Bogotá

Viviana Andrea Quintero Tapiero
Universidad de La Salle, Bogotá

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

Citación recomendada

Torres Cardozo, S. L., & Quintero Tapiero, V. A. (2010). Determinación de la concentración letal media CL50 48 de aluminio y arsénico mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia magna*. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/693

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

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{50}^{48}
DE ALUMINIO Y ARSÉNICO MEDIANTE BIOENSAYOS DE
TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE *DAPHNIA MAGNA***

**SAUDY LORENA TORRES CARDOZO
VIVIANA ANDREA QUINTERO TAPIERO**

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

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ, DC
2010**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{50}^{48}
DE ALUMINIO Y ARSÉNICO MEDIANTE BIOENSAYOS DE
TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE *DAPHNIA MAGNA***

SAUDY LORENA TORRES CARDOZO 41032125
VIVIANA ANDREA QUINTERO TAPIERO 41031151

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

Director:
PEDRO MIGUEL ESCOBAR MALAVER
Químico Industrial
Lic. Química y Biología
MSc. en Alta Gestión, Consultoría Y Verificación Medio Ambiental
MSc. en Residuos Urbanos e Industriales

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ, DC
2010

Nota de aceptación:

Firma del Director

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá, Abril de 2010

Determinación de la concentración letal media CL_{50}^{48} de aluminio y arsénico mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia Magna*

AGRADECIMIENTOS

Las Autoras expresan sus agradecimientos por su apoyo tiempo y colaboración a:

Pedro Miguel Escobar Malaver, Químico Industrial, Lic. Química y Biología y director de esta investigación por su amistad y aportes durante el desarrollo de esta investigación.

Oscar Fernando Contento, Ingeniero químico y laboratorista de Ingeniería Ambiental y Sanitaria Universidad de La Salle.

Al grupo de monitores del laboratorio de Ing. Ambiental y Sanitaria, por su colaboración y prestación de servicios durante nuestra estadía en el laboratorio de bioensayos.

Al grupo de bioensayos por su apoyo y cooperación durante el desarrollo del proyecto.

INTRODUCCIÓN

Uno de los recursos más afectados por las industrias galvánicas es el acuático, pues en este son agregados diferentes vertimientos, que contienen sustancias orgánicas e inorgánicas, tóxicas, de difícil descomposición, que ponen en riesgo este ecosistema. El mal manejo de sustancias tóxicas, la utilización y su producción de estas, generan problemas a nivel ambiental que afectan en la salud humana. Las sustancias tóxicas como el aluminio y arsénico son habitualmente utilizadas en diversas industrias, pero con mayor frecuencia en las industrias de galvanotecnia. Este tipo de industrias genera vertimiento con altas concentraciones de estos tóxicos, causando la contaminación progresiva de las diferentes fuentes de agua. Con ayuda de los bioensayos se puede determinar la afectación causada por la toxicidad del aluminio y arsénico en ecosistemas acuáticos como el de las *Daphnia Magna*. A nivel mundial se han realizado diversos estudios para la determinación de la Concentración Letal media (CL_{50}^{48}) dando como resultado no solo valores que indican la toxicidad de un elemento específico, sino también ofreciendo argumentos para el mejoramiento de los monitoreos y control que tiene como objetivo disminuir la contaminación de las fuentes hídricas.

Nuestro país cuenta con el decreto 1594 de 1984 y el decreto 3957 de 2009 que tiene como objetivo reglamentar y regular los vertimientos de efluentes líquidos. En ellos se establecen estándares físicos y químicos de vertimientos industriales y se encuentra información sobre la Concentración Letal media (CL_{50}^{48}) de algunos tóxicos, pero esta información no reconoce en su totalidad los efectos causados por estos tóxicos a los ecosistemas acuáticos. La Universidad de La Salle está realizando un macro-proyecto con los proyectos de grado basados en investigación a través de bioensayos, con el fin de obtener la Concentración Letal Media (CL_{50}^{48}) de los metales incluidos los decretos 1594 de 1984 y 3957 de 2009, de esta manera recopilar información que demuestre la necesidad de cambiar los lineamientos expuestos en los decretos para lograr la preservación y se garantice la calidad y conservación de los recursos hídricos.

GLOSARIO

A continuación se listan algunos conceptos referentes al contenido del documento, relacionados con toxicidad, técnicas de bioensayos, galvanotecnia, entre otros que merecen ser aclarados para el desarrollo y para un mejor entendimiento del trabajo por parte de los lectores.

Aclimatación: es la adaptación fisiológica a un nivel particular de una o más variables ambientales. El término es generalmente referido al control en condiciones de laboratorio.

Agua destilada: es el agua que ha sido tratado para remover los iones de la solución para obtener una conductividad menor o igual a 2 μ mhos/cm.

Agua de dilución: el agua natural o reconstituida que por las características óptimas que presenta para la sobrevivencia y reproducción de los organismos usados en pruebas de toxicidad, es utilizada para preparar las diferentes diluciones o concentraciones efectuadas durante una prueba, sea ésta exploratoria o definitiva.

Agua reconstituida: es agua destilada con adición de reactivos. El resultado es agua dulce sintética libre de contaminantes y con características deseables de pH y dureza. Se prepara con sales inorgánicas en cantidad requerida por el organismo prueba.

Aguas residuales: son las aguas de composición variada provenientes de las descargas municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticas y en general de cualquier otra.

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

Bentos: se llama bentos (del griego Benthos, "fondo marino") a la comunidad formada por los organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos. El bentos se distingue del plancton y del necton, formados por organismos que habitan en la columna de agua. El adjetivo que se hace derivar de bentos es bentónico.

Bioacumulación: efecto biológico pertinente con la capacidad que tiene un tejido vivo para acumular contaminantes.

Bioensayo: ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.

Biomagnificación: Secuencia de procesos que conducen a aumentar la concentración de una sustancia en un organismo con respecto a la del medio que se lo ha aportado. Se suele aplicar a los ecosistemas más que a los individuos.

Cladóceras: es el orden taxonómico al que pertenecen las comúnmente llamadas “pulgas de agua”. Las valvas del caparazón de los organismos cubren solamente el tronco y los apéndices.

Concentración Letal (CL): es la concentración de una sustancia (pura o combinada), o efluente que produce la muerte del organismo.

Concentración Letal media (CL_{50}): es la concentración de la sustancia de interés, cuyo efecto tóxico potencial desea ser evaluado, que produce una tasa de mortalidad del 50% de los organismos vivos bajo las condiciones de operación de un bioensayo. Este valor es determinado estadísticamente a partir de los porcentajes de mortalidad obtenidos de la lectura final del bioensayo.

Contaminante: sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. En un sentido más amplio se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, o de combinaciones de los mismos en lugares, formas y concentraciones tales y con tal duración que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal, o que impidan el uso y goce de las propiedades y lugares de recreación.

Controles negativos o blancos: es una unidad de prueba en la cual se espera obtener una respuesta negativa, es decir, ninguna alteración o afectación detectable sobre el organismo de prueba. Se ejecutan igualmente para la validación del ensayo.

Control positivo: evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia ($K_2Cr_2O_7$), utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema.

Crónico: ocurre durante un periodo relativamente largo de exposición (una porción significativa de la vida del organismo >10%).

Cuarentena: proceso durante el cual los organismos D. magna adultos, se separan en un recipiente cada uno, con los neonatos que dan estas iniciar un nuevo cultivo.

Cuerpos de agua: son los lagos, lagunas costeras, estuarios, acuíferos, redes colectoras, con excepción de los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano y municipal, ríos y sus afluentes directos o indirectos, permanentes o intermitentes, presas, cuencas, cauces,

canales, embalses, cenotes, manantiales y demás depósitos o corrientes de agua.

Dáfnido: es el nombre castellanizado que reciben los organismos del género *Daphnia* conocidos como “pulga de agua”.

***Daphnia magna*:** es un micro-crustáceo del orden Cladóceras de 1 mm a 1,5 mm de longitud los neonatos, y de 4 mm a 6 mm los adultos (ambos, visibles a simple vista). Es un representante importante de las comunidades dulceacuícolas con gran sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos, siendo ésta una de las características principales para que sea usado internacionalmente en pruebas de toxicidad. Asimismo, su ciclo de vida corto y fácil cultivo en laboratorio, permite realizar pruebas rápidas y económicas.

Descarga: aguas residuales que se vierten directa o indirectamente en algún cuerpo de agua o sistema de drenaje y alcantarillado urbano y municipal, incluyéndose los procesos de infiltración e inyección.

Dosis Letal: cantidad de material tóxico por unidad de peso corporal de un animal de prueba y que es capaz de matar a toda la población en un cierto tiempo. (Miller 1994)

Efectos letales: En bioensayos, son las alteraciones que causan la muerte del individuo debidas a la presencia de un efecto tóxico.

Efectos subletales: En bioensayos, son las alteraciones o transformaciones morfológicas sobre un individuo de prueba que surgen por la presencia de un efecto tóxico.

Efectos tóxicos agudos: Efectos adversos sobre un organismo vivo que se presenta en un periodo de tiempo corto.

Efluente: es el agua u otro líquido que procede de un embalse, cuenca, proceso o planta de tratamiento.

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

EPA: Environmental Protection Agency, Agencia de protección ambiental de EE.UU.

Epipodito: branquia, vía de respiración de los crustáceos.

Estudios de toxicidad: actividades de investigación tendientes a determinar la capacidad de una sustancia o mezcla de sustancias para causar efectos adversos sobre un organismo vivo.

Foto período: es la duración de iluminación y oscuridad en un lapso de 24 h.

Galvanotecnia: técnicas de obtención, por vía electrolítica, de depósitos metálicos en la superficie de los metales, aleaciones y cuerpos no metálicos. Recubrimiento de metales.

Metales pesados: son todos aquellos metales que tienen una densidad superior a 5 g/l.

Muestra simple: es la que se toma ininterrumpidamente durante el período necesario para completar un volumen proporcional al caudal, de manera que éste resulte representativo de la descarga de aguas residuales, medido en el sitio y en el momento del muestreo.

Muestra compuesta: es aquella que se forma con la mezcla de muestras simples o instantáneas tomadas en un efluente industrial, agrícola o municipal. El número de muestras simples depende de las horas por día que opere el proceso generador de la descarga

Neonatos de *Daphnia magna*: son los dáfnidos de 1 mm a 1.5 mm de longitud y edad menor a 24 h utilizados en pruebas de toxicidad.

Prueba de toxicidad (bioensayos de toxicidad): es la exposición controlada de organismos a sustancias puras, combinadas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto.

Replicado: es una cámara o recipiente de ensayo, conteniendo un número especificado de organismos en una concentración/dilución de muestra definida o de agua de dilución como control. En un ensayo de toxicidad con cinco concentraciones de ensayo y un control que usa tres replicados, se utilizan 18 cámaras de ensayo con tres cámaras por concentración. Un replicado debe ser una unidad separada o independiente de ensayo.

Test definitivo: de los ensayos preliminares se haya la CL_{50} preliminar, se procede a efectuar el ensayo definitivo, el cual debe ser realizado efectuando diferentes concentraciones, por lo general de 5 a 7, dentro de las concentraciones detectadas en los ensayos preliminares.

Tiempo de exposición: es el período al que se someten los organismos a las soluciones de prueba en un bioensayo de toxicidad.

Toxicidad: es el efecto adverso que procede un tóxico.

Toxicidad aguda: es el efecto letal que se produce después de exponer a los organismos prueba a sustancias (puras o combinadas) o efluentes una sola vez, durante un período corto. Para *Daphnia magna* es de 48 h.

Tóxico: es cualquier sustancia (pura o combinada) o efluente que al entrar en contacto con el organismo produzca daños, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

Tóxico de referencia: es una sustancia química utilizada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos a determinadas concentraciones es conocido, y por lo tanto, permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados, así como comparar los resultados intra e inter laboratorios. El uso de estos tóxicos, proporciona también una evaluación general de la precisión (estabilidad y respetabilidad) del método a través del tiempo.

Toxicología acuática: es el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos adversos producidos por productos químicos y materiales antropogénicos sobre los organismos acuáticos. Verso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de el material de ensayo, usualmente de pocos días.

RESUMEN

En este trabajo se determinó la concentración Letal media CL_{48}^{50} de Aluminio y Arsénico, se evaluó el vertimiento de una industria del sector de galvanizado. La determinación de la CL_{48}^{50} se realizó mediante pruebas toxicológicas empleando *Daphnia magna* como organismo prueba. Se tomaron 5 concentraciones, un control negativo (blanco ó agua reconstituida) y se hicieron cuatro replicas por cada prueba. Los datos de CL_{50-48} fueron analizados por el programa Método de unidades probabilísticas "Probit", el cual evalúa la relación concentración-respuesta de un contaminante sobre un organismo con limites de confiabilidad del 95%.

Palabras Claves: Concentración letal media, *Daphnia magna*, galvanizado, Aluminio, Arsenico, pruebas de toxicidad.

ABSTRAC

In this research, was determined the half -Lethal Concentration CL_{50-48} of Aluminium and Arsenic. It assessed the pouring of galvanized sector's factory. The CL_{50-48} 's determination was realized by means of Toxicology tests using *Daphnia magna* like organism trial. Five concentrations were taken, a negative control (target or "reconstituida" water), and four replic were made to each test. The CL_{50-48} data were analyzed by the measure probability program method "Probit", which assesses the concentration-response relationship of a contaminant on a body with limits of reliability of 95%.

Key Words: hald lethal concentration, *Daphnia magna*, galvanic, Aluminium, Arsenic, toxicity tests.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	
1. OBJETIVOS	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. MARCO TEORICO	5
3.1 Ecosistemas Acuáticos	5
3.1.1 Organismos y organismos acuáticos.	6
3.1.1.1 Bentos.	6
3.1.1.2 Plancton.	6
3.1.1.3 Necton.	7
3.1.1.4 Neuston.	8
3.1.1.5 Seston.	8
3.1.2 Tipos de ecosistemas.	8
3.1.2.1 Ecosistemas lénticos o estancados.	9
3.1.2.2 Ecosistemas lóticos.	9
3.1.2.3 Ecosistemas de humedal.	9
3.1.3 Factores ambientales acuáticos.	10
3.2 <i>Daphnia Magna</i>	11
3.2.1 Generalidades de la <i>Daphnia Magna</i>	11
3.2.2 Alimentación	17
3.2.3 Ciclo de vida	18

3.2.4 Criterios generales de selección de especie	18
3.2.4.1 Selección de especie	19
3.3 Bioensayos	20
3.3.1 Tipos de bioensayos	22
3.3.1.1 Ensayos de respuesta directa	22
3.3.1.2 Bioensayos de respuesta indirecta	24
3.4 Índices de toxicidad	25
3.5 Evaluación estadística de los bioensayos	27
3.5.1 Tipo de pruebas o de bioensayos	27
3.5 Metales pesados	28
3.6.1 Metales pesados en el agua	39
3.6.2. Toxicidad	30
3.6.3 Aluminio	32
3.6.3.1 Propiedades Fisicoquímicas	33
3.6.3.2 Toxicidad del Aluminio	36
3.6.3.3 Riesgos para la salud humana	37
3.6.3.4 Efectos Ambientales del aluminio en organismos	38
3.6.4 Arsénico	39
3.6.4.1 Propiedades Fisicoquímicas	40
3.6.4.2 Toxicidad del arsénico	44
3.6.4.3 Efectos del arsénico sobre la salud humana	45
3.6.4.4 Efectos Ambientales del arsénico en organismos	47
4. INDUSTRIA GALVANOTECNIA.	49
4.1 Generalidades de la Industria.	49
4.2 Descripción general del proceso	49

4.2.1 Desengrase.	51
4.2.2 Desengrase ácido.	51
4.2.3 Desengrase alcalino.	52
4.2.4 Desengrase decapante.	52
4.2.5 Mantenimiento de la capacidad del baño de decapado.	53
4.2.6 Desgalvanizado.	54
4.2.7 Segundo Lavado.	54
4.2.8 Mordentado.	55
4.3. Impacto ambiental que produce la galvanotecnia	56
5. MARCO LEGAL	57
6. METODOLOGÍA	58
6.1 Diseño experimental	59
6.2 Materiales y equipos de laboratorio	60
6.3 Primera fase	61
6.3.1 Preparación de agua reconstituida	61
6.3.2 Preparación del medio Bristol y concentración	
centrifugación de algas <i>Selenastrum Capricornutum</i>	67
6.3.3 Conteo de algas por medio de la cámara Neubauer	73
6.3.4 Inoculación de las algas en medio sólido (agar - agar)	79
6.3.5 Alimentación de organismo de prueba	81
6.3.6 Aclimatación de los organismos prueba.	82
6.3.7 Cultivo y Mantenimiento de <i>Daphnia magna</i> .	82
6.3.8 Selección de neonatos de pruebas.	87
6.4 Segunda Fase	87
6.4.1 Pruebas de toxicidad	87

6.4.2 Preparación de soluciones	89
6.4.3 Montaje de las pruebas de toxicidad (bioensayos)	91
6.5 Tercera Fase	94
6.5.1 Métodos estadísticos	94
6.5.2 Diseño de experimentos	95
6.5.3 Establecimiento de la Relación Dosis – Efecto o Dosis – Respuesta	96
6.5.4 Análisis de varianza (ANOVA)	96
6.5.5 Bases del análisis de varianza	98
6.5.6 Modelos de análisis de varianza	102
6.5.7 Análisis de regresión y análisis PROBIT	102
6.7 Pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$)	105
6.8 Pruebas preliminares de toxicidad con Aluminio y Arsénico	107
6.8.1 Pruebas preliminares de toxicidad con Aluminio	107
6.8.2 Pruebas preliminares de toxicidad con Arsénico	108
6.9 Pruebas definitivas con Aluminio y Arsénico	110
6.9.1 Pruebas definitivas con Aluminio	111
6.9.2 Pruebas definitivas con Arsénico	112
6.10 Toma y preservación de muestras para los ensayos de toxicidad.	114
6.11 Tipo de análisis fisicoquímicos de los vertimientos.	115
6.11.1 Condiciones fisicoquímicos	116
6.11.2 Resultados esperados	117
6.12 Pruebas definitivas con el vertimiento de aluminio y arsénico.	118
6.13 Índice toxicológico.	118

6.13.1 Índice toxicológico del vertimiento	119
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	122
7.1 Ensayos de sensibilidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y obtención de la concentración letal media.	123
7.2 Obtención de la concentración letal media en ensayos con el tóxico aluminio	129
7.3 Análisis de varianza de Aluminio con la sustancia pura.	134
7.4 Obtención de la concentración letal media en ensayo con el tóxico arsénico	137
7.5 Análisis de varianza de arsénico con la sustancia pura.	142
7.6 Ensayos definitivos con el vertimiento de aluminio y arsénico, y obtención de la concentración letal media CL_{50}^{48}	145
7.6.1 Análisis fisicoquímicos del vertimiento con aluminio de la industria galvánica.	145
7.6.2 Análisis fisicoquímico del vertimiento realizado en el laboratorio con arsénico.	146
7.7 Ensayos del vertimiento con aluminio	147
7.8 Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de Aluminio.	154
7.9 Ensayos del vertimiento con arsénico	156
7.10 Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de Arsénico	162
7.11 Obtención de la carga tóxica e índice toxicológico	164
7.11.1 Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de aluminio	165

7.112 Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de arsénico	166
8. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON OTRAS PRUEBAS DE TOXICIDAD REALIZADOS EN EL EXTERIOR Y EN COLOMBIA.	167
8.1 Comparación de los resultados.	167
9. ALTERNATIVAS DE MANEJO PARA METALES PESADOS	169
9.1 Alternativas de remoción de aluminio y arsénico	
remoción de arsénico	169
9.2 Remoción de aluminio	173
10. CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

		<i>Pág</i>
TABLA N°1.	Clasificación taxonómica de la D. magna.	13
TABLA N° 2.	Condiciones de crecimiento del cultivo de Daphnia magna	15
TABLA N° 3.	Propiedades Químicas de aluminio	34
TABLA N°4.	Propiedades físicas del aluminio	34
TABLA N°5.	Propiedades atómicas del aluminio	35
TABLA N°6.	Propiedades químicas del arsénico	41
TABLA N°7.	Propiedades físicas del arsénico.	41
TABLA N°8.	Propiedades atómicas del arsénico.	42
TABLA N° 9.	Soluciones agua reconstituida.	62
TABLA N°10	Reactivos agua reconstituida.	63
TABLA N°11.	Parámetros de control del agua reconstituida.	66
TABLA N°12.	Formato de control agua reconstituida.	66
TABLA N° 13.	Disoluciones medio Bristol.	68
TABLA N°14.	Formato ANOVA	101
TABLA N° 15.	Pruebas definitivas de dicromato.	107
TABLA N°16	Pruebas preliminares de aluminio.	108
TABLA N°17	Pruebas preliminares de arsénico.	110
TABLA N°18.	Pruebas definitivas de aluminio.	111
TABLA N°19.	Pruebas definitivas de arsénico.	113
TABLA N°20	Rangos de índices toxicológicos	120
TABLA N°21.	Concentración de dicromato.	123
TABLA N°22.	Datos Probit con dicromato.	124

TABLA N°23.	Valores internacionales de CL ₅₀₋₄₈ en <i>Daphnia magna</i> con dicromato de potasio.	126
TABLA N° 24.	Comparación con otros proyectos.	128
TABLA N°25.	Datos Probit con aluminio.	132
TABLA N° 26.	Análisis ANOVA con aluminio.	135
TABLA N°27.	Resultado F calculad para aluminio.	135
TABLA N°28.	F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de Aluminio.	136
TABLA N°29.	Datos Probit de arsénico.	139
TABLA N°30.	Análisis de varianza del arsénico.	143
TABLA N°31.	Resultado F calculado para arsénico.	144
TABLA N°32.	F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de Arsénico	144
TABLA N°33.	Resultado análisis fisicoquímico del vertimiento de aluminio	146
TABLA N°34.	Resultado análisis fisicoquímico del vertimiento de arsénico	147
TABLA N° 35.	Pruebas con el porcentaje de dilución del vertimiento	149
TABLA N°36	Concentraciones definitivas con el vertimiento de aluminio	151
TABLA N° 37.	Datos Probit del vertimiento con aluminio.	152
TABLA N°38.	Análisis de varianza con el vertimiento de aluminio.	154

TABLA N°39.	Resultado F calculado para el vertimiento con aluminio.	155
TABLA N°40.	F calculado vs F teórico. Pruebas vertimiento con aluminio	156
TABLA N° 41.	Porcentaje de diluciones del vertimiento de arsénico.	157
TABLA N°42.	Concentraciones definitivas del vertimiento con arsénico.	157
TABLA N°43.	Datos en Probit con el vertimiento de arsénico.	159
TABLA N°44.	Análisis de varianza con el vertimiento de arsénico	162
TABLA N°45	Resultado F calculado del vertimiento con arsénico	163
TABLA N°46.	F calculado vs F teórico. Prueba definitiva con el vertimiento de Arsénico.	164
TABLA N°47.	Valores comparativos de la con especies de Daphnias expuestos a aluminio en el Exterior.	167
TABLA N°48.	Valores comparativos con especies de Daphnias expuestos a aluminio en Colombia.	168
TABLA N°49.	Valores comparativos con especies de Daphnias expuestos a arsénico en Exterior.	168
TABLA N°50.	Rangos de pH.	172
TABLA N° 51.	Eficiencia de remoción.	172
TABLA N°52	Ventajas y desventajas de tratamientos	176

LISTA DE IMÁGENES

		<i>Pág</i>
Imagen N° 1.	Daphnia magna	12
Imagen N° 2.	Soluciones agua reconstituida	63
Imagen N°3.	Acuario agua reconstituida	65
Imagen N° 4.	Preparación medio Bristol.	69
Imagen N°5.	Solución sellada.	70
Imagen N°6.	Solución en autoclave.	70
Imagen N°7.	Medio Bristol.	71
Imagen N°8.	Centrifuga	72
Imagen N° 9.	Tubo centrifugado.	72
Imagen N° 10.	Alimento centrifugado.	72
Imagen N° 11.	Extracción de algas	72
Imagen N° 12.	Cámara de conteo celular	74
Imagen N° 13.	Cámara de conteo celular, un cuadrante.	74
Imagen N° 14.	Cámara de conteo celular	75
Imagen N° 15.	Agar solidificado.	81
Imagen N°16.	Medio inoculado.	81
Imagen N° 17.	Algas	82
Imagen N°18.	Kit dureza.	83
Imagen N°19.	Calculo dureza.	83
Imagen N°20.	Temporizador.	84
Imagen N° 21.	Limpieza de peceras.	85
Imagen N°22.	Conteo de pulgas.	86
Imagen N° 23.	Cultivo	87

Imagen N° 24.	Pecera semana 2.	87
Imagen N° 25.	Selección de neonatos	87
Imagen N° 26.	Pruebas.	88
Imagen N° 27.	Pruebas cubiertas.	88
Imagen N°28.	Solución madre de Al.	90
Imagen N°29.	Trióxido de As.	90
Imagen N°30.	Disoluciones de Al.	94
Imagen N° 31.	Disoluciones As.	94

LISTA DE CUADROS

		Pág
Cuadro N°1.	Factores ambientales acuáticos	10
Cuadro N°2.	Características morfológicas y del ciclo de vida.	13
Cuadro N°3	Normatividad	57
Cuadro N° 4.	Variables diseño experimental.	59
Cuadro N°5.	Materiales de laboratorio.	60
Cuadro N°6.	Equipos de laboratorio.	61
Cuadro N° 7.	Características en pruebas de bioensayos.	91
Cuadro N°8.	Análisis fisicoquímicos.	115

LISTA DE GRAFICAS

		Pág
Grafica N° 1.	Concentración letal media del aluminio	127
Grafica N°2.	Concentración vs %mortalidad	130
Grafica N°3.	Concentración letal media del aluminio	133
Grafica N°4.	Concentración vs mortalidad.	138
Grafica N°5.	Concentración letal media de arsénico	141
Grafica N°6.	Concentración vs mortalidad	150
Grafica N°7.	Concentración letal media del vertimiento de aluminio.	153
Grafica N°9.	Concentración vs mortalidad del vertimiento con arsénico	158
Grafica N°10.	Concentración letal media del vertimiento de arsénico.	161

LISTA DE ESQUEMA

		Pág
Esquema N° 1.	Proceso industrial de galvanotecnia.	50
Esquema N°2.	Fase del proyecto.	121

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Resultados de pruebas toxicológicas	185
ANEXO B	Resultados con el programa Probit	199
ANEXO C	Resultados con el programa ANOVA	203
ANEXO D	Registro de control de parámetros de agua	207
ANEXO E	Protocolos de laboratorio	229

1. OBJETIVOS

1.1 General

Determinar la Concentración Letal media (CL_{50-48}) de Aluminio y Arsénico de los vertimientos de una industria galvánica, mediante pruebas toxicológicas (bioensayos) utilizando *Daphnia magna*.

1.2 Específicos

- ☛ Determinar la sensibilidad de la *Daphnia magna* expuestas al Dicromato de potasio.
- ☛ Determinar la concentración letal media (CL_{50-48}) en soluciones puras de estos metales y en el vertimiento de la industria tipo.
- ☛ Obtener el índice de efecto toxicológico potencial de la industria tipo en la que se encuentran presentes el Aluminio y el Arsénico.
- ☛ Plantear una alternativa para mitigar la concentración de aluminio y arsénico en el vertimiento de la industria galvánica.

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas más significativos respecto al control ambiental es la contaminación de los cuerpos de agua, esto a su vez influye en todos los diferentes entornos y/o ecosistemas con los que tiene algún tipo de contacto, afectando el equilibrio natural, siendo algunas de las características de estos desequilibrios: el cambio del pH, el aumento de la concentración de metales pesados, aumento de la turbiedad, la disminución del oxígeno disuelto, entre otros, generando daños a la salud de los seres vivos. Sumado a esto, los costos de análisis fisicoquímicos convencionales pueden resultar muy elevados por esta razón el uso de bioindicadores es una estrategia simple y efectiva para determinar la presencia de contaminantes.

Los ensayos de toxicidad con organismos acuáticos son métodos reconocidos por la comunidad científica internacional y empleados en muchos países, como herramientas para el monitoreo y control de la contaminación hídrica. En Colombia se establecen estándares fisicoquímicos y microbiológicos en cuanto a la reglamentación de efluentes¹, sin considerar las pruebas de toxicidad para determinar las concentraciones máximas permisibles de contaminantes.

¹ Castro Scarone, Sandra, Los bioensayos como herramienta de evaluación e la toxicidad de los efluentes industriales de Uruguay. 2002, Departamento De Normalización Técnica. Dirección Nacional del Medio Ambiente.

Aunque el alcance de los bioensayos es también limitado, se les reconoce la enorme importancia dentro de los estudios de evaluación de impactos y son actualmente procedimientos imprescindibles para la ejecución de tales estudios.

Estas técnicas son aplicables porque permiten establecer la toxicidad de una sustancia, ya sea de forma inmediata (toxicidad aguda) por la muerte e inhibición de los organismos y a mediano o largo plazo (toxicidad crónica) se produce un efecto sobre el crecimiento, desarrollo y/o reproducción de los organismos. Las pruebas de toxicidad aguda permiten conocer el potencial toxicológico de un vertimiento mediante la estimación de indicadores como la concentración letal media (CL_{50-48}).

En la evaluación de vertimientos industriales las pruebas de toxicidad son empleadas para caracterizar, jerarquizar y regular los vertimientos, aún cuando las sustancias responsables de dichos efectos tóxicos se desconozcan.

Se realizaron pruebas de toxicidad con *Daphnia magna*, como bioindicador con el fin de determinar la concentración de aluminio y arsénico que produzca la muerte del 50% de la población expuesta.

Con los resultados de esta investigación se pretende recopilar información para que el organismo de control correspondiente, fije y establezcan nuevas normas de vertimientos a cuerpos de agua

receptores, ya que la norma actual (Decreto 1594 de 1984 del Ministerio de Salud), no cuenta con estándares que garanticen la preservación de plancton, fitoplancton y fauna acuática en el país, puesto que las concentraciones máximas permitidas son muy altas para los tipos de especies que se encuentran en nuestros ecosistemas acuáticos.

El aporte ingenieril que se da durante la realización de este proyecto es:

1. La determinación con pruebas técnico-científicas toxicológicas de la concentración letal media (CL_{50-48}) de **aluminio** y **arsénico** con *Daphnia magna*.
2. Se mostraran alternativas las cuales ayudaran a mitigar la concentración de aluminio y arsénico en un vertimiento de una empresa galvánica.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Ecosistemas Acuáticos

Se definen los ecosistemas acuáticos como todos aquellos ecosistemas que tienen por biotopo algún cuerpo de agua, como pueden ser: mares, océanos, ríos, lagos, pantanos y demás fuentes. Encontramos dos tipos de ecosistemas más destacados que son: los ecosistemas marinos y los ecosistemas de agua dulce.

El agua dulce de los ríos presenta una enorme variedad de composición. Un ecosistema está compuesto por cinco componentes físicos importantes que son el aire, el agua, el suelo, el viento y la temperatura, llamados factores abióticos y los seres vivos que conforman los factores bióticos. Cada uno de los componentes bióticos son llamados individuos que al vivir en grupos de la misma especie forman una población, la cual reside en un hábitat con otras poblaciones relacionándose entre ambas en forma equilibrada, a esto se lo denomina comunidades biológicas. Para formar un verdadero ecosistema debe existir una interacción tanto entre los factores abióticos y bióticos como entre los bióticos entre sí².

² 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). Disponible en Internet <<http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>>.

3.1.1 Organismos y organismos acuáticos.

En los ecosistemas acuáticos existen grandes variedades de organismos con características especiales que les permiten adaptarse al medio donde viven. Podemos encontrar tres grupos muy importantes el bentos, el plancton y el necton.

3.1.1.1 Bentos.

Son los organismos que se fijan en el fondo, como las plantas a través de sus raíces, los mejillones con filamentos pegajosos, las estrellas de mar utilizando sus pequeños pies, los corales y las anémonas que lo hacen con un disco basal. En éste grupo también se encuentra los que se arrastran como las rayas, caracoles con un pie musculoso y los lenguados.

3.1.1.2 Plancton.

Es un grupo que se caracteriza por su diminuto tamaño, viven arrastrados por la corriente o suspendidos. Este se divide en dos subgrupos muy diferenciados: el fitoplancton y el zooplancton³.

³ Ibid

Zooplankton.

Es la fracción del plancton constituida por seres que se alimenta de materia orgánica ya elaborada, por ingestión. Está constituido por protistas diversos, fagótrofos que engloban el alimento fagocitándolo. También por larvas de esponjas, gusanos, equinodermos, moluscos, crustáceos y de otros artrópodos acuáticos.

Fitoplancton o plancton vegetal.

Se le llama al conjunto de los organismos acuáticos autótrofos, que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua. Forman parte de este grupo muchos seres tradicionalmente considerados algas. Actualmente, estos organismos se encuentran clasificados como bacterias - las algas verdeazuladas - o como Protistas. Uno de los grupos más importantes, por su abundancia y diversidad, es el de las diatomeas, organismos microscópicos con pigmentos amarillo-dorados⁴

3.1.1.3 Necton.

Es otro grupo importante que tiene como característica desplazarse por sus propios medios superando la resistencia del agua. Estos organismos también tienen estructuras especiales como los peces que tienen aletas, anal, caudal, pectorales y pélvicas que les permiten desplazarse con

⁴ Ibid, Párrafo 4 y 5.

agilidad, también tienen opérculos para proteger las branquias, una vejiga natatoria para reducir su peso y un cuerpo aplanado. Los tiburones y las rayas también pertenecen a éste grupo, ellos tienen a diferencia de los peces reservas de aceite en el hígado y un esqueleto cartilaginoso que le sirve para alivianar su cuerpo.

3.1.1.4 Neuston.

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

3.1.1.5 Seston.

Es un término adoptado recientemente y se aplica a la mezcla heterogénea de organismos vivos y sólidos suspendidos que flotan sobre el agua⁵.

3.1.2 Tipos de ecosistemas.

Partiendo del movimiento del agua, se acuerda una división de los ecosistemas de agua dulce. Esta división tiene relevancia tanto para

⁵ Ibid, párrafo 3 y 4.

estudiar la naturaleza como para la explotación y gestión de las aguas interiores.

3.1.2.1 Ecosistemas lénticos o estancados.

Estos comprenden las aguas estancadas y están representados principalmente por lagos, estanques o charcas, varían mucho en tamaño, ya que se pueden encontrar desde pequeños estanques hasta enormes lagos que cubre miles de kilómetros cuadrados. La principal diferencia entre los ecosistemas lénticos y estancados reside en la tasa de renovación del agua, que en los sistemas lacustres es mucho menor y puede llegar a varios años, pero que es necesaria para el aporte de oxígeno y nutrientes.

3.1.2.2 Ecosistemas lóticos.

Incluye los ecosistemas de aguas fluyentes y están principalmente representados por ríos y arroyos. El movimiento del agua puede deberse a descargas de los lagos y estanques, al escurrimiento de las aguas de deshielo, o a partir de manantiales, en los que de modo natural, fluye un caudal apreciable de agua a partir de aguas subterráneas (acuífero).

3.1.2.3 Ecosistemas de humedal.

Áreas donde el suelo está saturado de agua o inundado durante una parte del año.

3.1.3 Factores ambientales acuáticos.

Cuadro N°1. Factores ambientales acuáticos.

FACTOR AMBIENTAL	CARACTERÍSTICAS
Temperatura	<p>Determina la densidad, viscosidad y movimiento del agua.</p> <p>Influye en la periodicidad y reproducción de los organismos ya que posee ciertas propiedades térmicas que son:</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ Calor específico. ☞ Calor latente de fusión ☞ Conductividad térmica ☞ Calor latente de evaporación
Iluminación	<p>La radiación solar puede penetrar hasta determinadas profundidades, dependiendo de la turbiedad y algunos otros elementos suspendidos en el cuerpo de agua. Lo que nos regula el proceso de la fotosíntesis que realiza las plantas acuáticas y el fitoplancton.</p>
Gases disueltos	<p>El oxígeno es el elemento de mayor importancia en el sistema acuático ya que sus concentraciones constituyen con frecuencia factores limitantes.</p> <p>También existen otros gases como el anhídrido sulfuroso, que es muy venenoso y constituye un factor limitante cuando se acumula en aguas estancadas ricas en restos orgánicos.</p>
Sales minerales	<p>Las sales minerales más abundantes son los carbonatos, los sulfatos y los cloruros. Los cationes de mayor importancia son el calcio (64%), el magnesio (17%), el sodio (16%) y el potasio (3%). El calcio juega un papel fundamental, ya que determina dos diferentes tipos de agua: a) aguas duras, cuando la concentración de calcio es inferior a 25 mg por litro; b) aguas blandas, cuando la concentración de calcio es inferior a 9 mg por litro. Muchos moluscos, crustáceos y otros invertebrados, tienen necesidad de calcio para formar sus caparazones o conchas y por tanto puede ser factor limitante para algunas especies.</p> <p>La concentración de sales minerales en las aguas dulces, tienen relación con los procesos de osmorregulación de los seres vivos. Estos, presentan en muchos casos mecanismos de regulación de la presión osmótica, lo cual les permite subsistir en medio de diferente concentración a la del medio interno.</p>

pH	Hay organismos que viven en aguas con un pH ácido; otros viven en medios acuáticos alcalinos. Así, la planta <i>Elodea canadensis</i> vive en aguas con un pH entre 7.4 y 8.8. <i>Typha angustifolia</i> (eneas) vive en aguas con un pH de 8.4 a 9. Los hongos, y otros organismos, viven en medios ácidos. Las aguas dulces tienen el pH entre 6.5 y 8.7; las aguas marinas entre 8 y 8.5.
-----------	--

Fuente: *La tierra y su entorno, Ecología de las aguas dulces, disponible en internet.* http://www.latierraysuentorno.cl/Ecologia_aguas_dulces.htm.

3.2 *Daphnia Magna*

3.2.1 Generalidades de la *Daphnia Magna*.

La “pulga de agua” o *Daphnia magna* (ver Imagen N° 1) es un pequeño crustáceo cladóceros. Vive en lagos y lagunas, alimentándose principalmente de algas, es un organismo planctónico altamente sensible y sirviendo, a su vez, de alimento a los peces, así que una alteración en esta especie afectará los demás eslabones de la cadena trófica. Es un componente importante de las comunidades acuáticas y es sensible a un amplio rango de contaminantes. Su uso se encuentra estandarizado en numerosos protocolos y recomendado en las normas legislativas europeas y españolas, para la evaluación eco-toxicología de vertidos y residuos industriales y urbanos.

Imagen N° 1: *Daphnia magna*



Fuente: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas⁶

La característica más interesante es su sensibilidad a los tóxicos, ya que es capaz de acusar la presencia de, por ejemplo 0,005 mg. del peligroso mercurio en el agua, y aún menores concentraciones de numerosos pesticidas y residuos industriales. Con *Daphnia magna* se hacen, generalmente, dos tipos de bioensayos: de toxicidad aguda y de toxicidad crónica⁷.

En los de toxicidad aguda se evalúa la concentración del tóxico (conocido o desconocido) que es capaz de matar o inmovilizar el 50 % de la población (CL_{50} o CE_{50}) en 48 horas.

⁶ Días Baez. María Consuelo: Fuente: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, 2004.

⁷ Juan C. Paggi - Susana J. de Paggi, *Daphnia magna* el canario de las aguas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Instituto Nacional de Limnología (INALI)-Santo Tomé (Santa Fe).

Tabla N°1: Clasificación taxonómica de la *D. magna*.

Clasificación taxonómica	
Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branchiopoda
Orden	Cladóceras
Familia	Daphniidae
Genero	Daphnia
Especie	Magna

Fuente: Química farmacéutica nacional⁸

Esta pequeña pulga es capaz de medir niveles de toxicidad muy bajos, principalmente se utiliza para medir los metales que se encuentran disueltos en el agua así como mercurio, bromo entre otros.

Cuadro N°2: Características morfológicas y del ciclo de vida

Tamaño	Máximo 5 mm en fase adulta
Estadios	4 periodos: huevo, juvenil, adolescente y adulto
Alimento	Micro algas o pequeñas partículas de fitoplancton de diámetro inferior a 30 micras
Reproducción	La <i>Daphnia</i> tiene dos maneras distintas de reproducción: Una asexual y otra sexual. La asexual se produce por partenogénesis (Parthenos=Virgen) y las poblaciones ordinariamente están constituidas íntegramente de hembras (20) que, según la edad y el tipo de alimentación, puede llegar a dar entre 10 a 20 hasta los 200 ejemplares. Si la ingesta sólo es suficiente para balancear los requerimientos energéticos de ellas, no habrá producción de huevos. A partir del cuarto estadio

⁸ Contreras Cardona, Lourdes marcela, evaluación preliminar de la toxicidad aguda de extractos vegetales utilizando *Daphnia magna* *hydra attenuata* y *allium sepa*, 1982, Universidad Nacional De Colombia, área de química y farmacéutica.

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

En la reproducción *sexual* la hembra produce óvulos que luego de ser fertilizados por el macho, se alojan en el epifio (saco que soporta los huevos) y estos son llamados epífidios.

La producción de estos huevos se debe a la sabiduría de la Naturaleza, ya que de esta manera se asegura la subsistencia de la especie cuando las condiciones de vida no son favorables. Un ejemplo es en casos de sequía relativamente prolongada, los huevos depositados por la hembra son resistentes a la sequía y quedan enterrados en el fango o en la superficie del terreno cuando el agua se evapora.

En algunos casos el viento se encarga de dispersar esos huevos, razón por la cual al llegar las lluvias son arrastrados hacia las depresiones del terreno donde se forman charcos más estables y con las condiciones necesarias para la vida. Estos huevos pueden ser mantenidos por más de 50 años.

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

Respiración

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

Características morfológicas

Cuerpo semitransparente no segmentado, cubierto por un caparazón que encierra el tronco, pero no la cabeza y suele terminar en una espina apical. Posee un par de antenas birramosas que confiere un patrón de nado específico (tipo paracaídas). La cabeza se proyecta en forma ventral en un corto pico y porta un solo ojo nauplio mediano. En el tórax se localizan de cinco a seis pares de apéndices en forma de patas, los cuales son utilizados por el organismo para filtrar el alimento.

Características del ciclo de vida de los organismos

Longevidad	Entre 30 y 65 días
Maduración reproductiva	+/- 2 días

Fuente: química farmacéutica universidad nacional⁹

Tabla N° 2. Condiciones de crecimiento del cultivo de *Daphnia magna*⁹

Foto período	16 horas luz – 8 horas de oscuridad
Temperatura	20°C +/- 2°C
Oxígeno disuelto	Mayor a 6,0 mg/L
pH del medio	7,5 a 8
Dureza	160 a 180 mg CaCO ₃ /l
Alimentación	4,5X10 ⁶ u. algas/individuo/día
Densidad de la población	1 <i>Daphnia</i> /100 ml

Fuente: Autoras.

Criterio de selección: los organismos pertenecientes al género *Daphnia* son ampliamente utilizados en todo el mundo como especie test o de referencia, para la realización de bioensayos o ensayos de toxicidad.

⁹ Contreras Cardona, Lourdes marcela, evaluación preliminar de la toxicidad aguda de extractos vegetales utilizando *Daphnia magna* hídrica atenuada y *Allium cepa*, 1982, Universidad Nacional De Colombia, área de química y farmacéutica.

Algunas de las razones por las cuales este organismo es seleccionado son:

- ☛ Son organismos de amplia distribución, representantes importantes de la comunidad zoo-planctónica.
- ☛ Presentan sensibilidad muy alta a cualquier tipo de tóxicos.
- ☛ Son fáciles de criar en laboratorio y de manipular; se adecuan sin problema a condiciones de cultivo estático, semi-estático o de flujo continuo en acuarios.
- ☛ Se producen partenogenéticamente, de esta forma aseguran uniformidad de respuesta a determinadas condiciones ambientales.
- ☛ Presentan generaciones cortas y con alto número de crías, con lo que se puede realizar estudios sobre generaciones sucesivas en pruebas de toxicidad crónica.
- ☛ Los costos del cultivo son bajos por su ciclo reproductivo.

La mayoría de laboratorios utilizan este organismo para pruebas de toxicidad, lo que facilita la comparación de resultados con otros trabajos, facilitando la reproducibilidad de las pruebas con *Daphnia magna*¹⁰.

¹⁰ Hoyos campos, Liliانا Gisela. Estandarización de bioensayos con *Daphnia magna* para la evaluación de toxicidad en aguas contaminadas, 1995, Universidad Nacional De Colombia.

3.2.4 Alimentación

ALGAS VERDES, *Scenedesmus Acutus*

Las algas seleccionadas como alimento para el mantenimiento de los cultivos de *Daphnia magna*, son algas verdes, pertenecen a la clase Cenobio formado por dos células, un poco arqueadas, mide de 3 µm de ancho y 10 µm de largo cada célula¹¹. Estas se caracterizan por que presentan cloroplastos de color verde puede encontrarse en forma unicelular o colonias no flageladas, microscópicas unicelulares, filamentosas simples o ramificadas y algunas formas desarrolladas. La mayoría forman parte del plancton y del bentos de agua dulce, las especies marinas son de mayor tamaño, y constituyen en forma secundaria el plancton marino.

Algunas colonias son cenóbicas (número de células es fijo), cada célula contiene un cloroplasto plano y usualmente pirenoide. Presentan formas elipsoidales o fusiformes de 2, 4 u 8 en series lineales para formar una colonia plana; pueden presentar pared lisa o verrugosa, los polos de las células se encuentra a menudo ornamentados con espinas (Parra, 1983, citado por Espinosa y Jarro, 1999).

¹¹ http://conabioweb.conabio.gob.mx/bancoimagenes/doctos/001_thumbs8-2.htm

3.2.5 *Ciclo de vida*

La vida de una *Daphnia* no excede los 120 días en condiciones óptimas de temperatura. Por ejemplo, los organismos pueden vivir hasta 108 días a 30 °C, mientras que algunos organismos viven solo 29 días a 28 °C.

Pueden vivir por varias semanas durante el verano y hasta cien días si no son depredadas.

El periodo de huevos se desarrolla completamente dentro de la cámara de cría de la madre. El periodo juvenil presenta entre cuatro y cinco estadios. El adolescente es breve y varía entre 1 y 2; es en este periodo donde se desarrolla la primera cámara de huevos dentro del ovario. El adulto en cambio presenta mayor número de estadios. La aparición de la función reproductiva es la que marca el comienzo de este último periodo. (Alberdi, 1990).

3.2.4 *Criterios generales de selección de especie*

Para seleccionar la especie con la cual se pretende realizar las pruebas de bioensayos es indispensable:

- ☛ Tener suficiente información sobre la historia de vida del organismo
- ☛ Conocer técnicas o métodos de cultivo del organismo

- ☛ Debe ser adecuado el ciclo de vida de los organismos para el logro de los objetivos y diseño
- ☛ Estar al tanto sobre lo concerniente a las prácticas utilizadas durante los bioensayos
- ☛ Que la especie tenga una alta e invariable sensibilidad a tóxicos (no sea tolerante a los tóxicos).
- ☛ Se encuentren con facilidad y abunden
- ☛ Estabilidad genética e igualdad en las poblaciones.
- ☛ adaptabilidad a las condiciones de laboratorio¹².

3.2.4.1 Selección de especie

La especie *Daphnia magna* tienen diversos aspectos biológicos que viabilizan y hacen ideales los ensayos. A pesar de su corto periodo de vida que se encuentra entre 4 o 5 semanas, tienen un alto nivel de fecundidad: una vez alcanzada su madurez se reproduce cada 48 horas haciéndolas ideales, pues la mayoría de los bioensayos se realizan con neonatos de menos de 24 horas de nacidos.

Una de las características más destacadas de esta especie, y por la cual es muy utilizada en el mundo para bioensayos, es su alto nivel de sensibilidad a los tóxicos, pues muestra la presencia de contaminantes incluso en concentraciones bajas de residuos industriales tóxicos que se encuentran en fuentes de agua.

¹² HENRY Linda, Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos. Drexel Institute of technology.

La *Daphnia magna* es apropiada para realizar bioensayos de toxicidad aguda en el cual se evalúa la concentración del tóxico (conocido o desconocido) que es capaz de matar o inmovilizar el 50 % de la población (CL_{50} o CE_{50}) en 48 horas.

Las hembras partenogenéticas de *Daphnia Magna* son una buena opción a la hora de realizar bioensayos ya que son fáciles de obtener, se pueden conseguir en compañías proveedoras de materiales biológicos, quienes certifican la especie. También pueden ser obtenidas de otras fuentes como laboratorios especializados donde se llevan a cabo pruebas de toxicidad con este cladócero o por medio de su recolección en campo ya que se encuentra en un gran número de cuerpos de agua; en estos casos la especie deberá ser identificada taxonómicamente.

Se escogió esta especie pues permite establecer la mortalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros¹³.

3.3 Bioensayos

Los bioensayos son herramientas utilizadas para obtener respuestas biológicas por agentes químicos extraños en organismos vivos

¹³ CASTRO SCARONE, Sandra, Los bioensayos como herramienta de evaluación e la toxicidad de los efluentes industriales de Uruguay. 2002, Departamento De Normalización Técnica. Dirección nacional del medio ambiente

específicos. Básicamente lo que se desea lograr a través de los bioensayos es evaluar el nivel de estímulo necesario para obtener una respuesta de un grupo de individuos de una población. Los bioensayos utilizan los organismos vivos como indicativos de la presencia o concentración de un compuesto químico.

Un bioensayo es un instrumento para determinar la toxicidad de alguna sustancia, o de efluentes, tomando intencionalmente algún ser vivo a distintas concentraciones y de esta manera establecer los efectos (mortalidad) sobre los organismos en cada una de las concentraciones. A través de los bioensayos se tiene como resultado información sobre la toxicidad que se encuentra en el agua y se puede decretar en qué concentraciones un agente tóxico determinado logra causar algún efecto negativo en el sistema biológico, trastornar la tasa de crecimiento, cambiar su ciclo de reproducción, dañar su estructura y función o producir la muerte.

Los bioensayos de laboratorio viabilizan la obtención de información acerca del posible impacto de un tóxico decretado o una mezcla de estos, sobre una población de organismos con características que permitan predecir los impactos a organismos similares.

Durante las pruebas el criterio más utilizado es la muerte, pero también se puede utilizar: la disminución de reproducción, de desarrollo, la paralización, los cambios histológicos o bioquímicos, la pérdida del

equilibrio, etc. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones (Larrain 1995).

3.3.2 Tipos de bioensayos

En la actualidad, se han utilizado diferentes tipos de bioensayos que cuantifican y cualifican una población de organismos a condiciones físicas estandarizadas y a concentración de agentes químicos diferentes externos a su ecosistema, los tipos de bioensayos mas utilizados son:

3.3.2.1 Ensayos de respuesta directa

Bioensayos agudos

Con los bioensayos agudos se puede obtener uno de los datos estándares relevantes en estas pruebas como es la determinación del CL_{50}^{48} (LC_{50}^{48}), lo que realmente indica este dato es este es la concentración de un químico o dilución de una muestra, en la cual el 50% de los organismos muere dentro de un periodo relativamente corto (24 horas – 96 horas) (Esclapés, 1999).

Bioensayos de tipo estático

Se establece la concentración del tóxico al principio del ensayo y se mantiene durante toda la prueba; el medio no se renueva (FAO, 1981).

Sin renovación

Sin modificación de la solución biocida durante todo el tiempo de exposición, (Esclapés, 1999).

Con renovación

El medio se renueva periódicamente. Esta renovación se realiza con el fin de evitar el deterioro o pérdida de sustancias químicas que influyan en los resultados de las pruebas realizadas (FAO, 1981).

Bioensayos crónicos

Estos bioensayos permiten la exposición de los organismos durante todo o parte de su ciclo de vida a los contaminantes ambientales, tienen como objetivo estimar la mayor concentración no efectiva o segura de los agentes tóxicos ensayados. Estos “niveles de efectos adversos no observados” son utilizados para establecer los límites de tolerancia para la presencia de tóxicos en agua, suelo, aire, ambiente laboral, etc (Esclapés, 1999).

Bioestimulación

Con este tipo de bioensayos se pretende estimular el crecimiento, proliferación y desarrollo de algas también con la bioestimulación se puede determinar los problemas que provoca la eutrofización acelerada, por la descarga de nutrientes en altas concentraciones a fuentes de agua. Pueden ser desarrollados a nivel de laboratorio que a nivel de medio receptor (FAO, 1981).

Bioacumulación

Poblaciones de plantas y de organismos acuáticos tiene la capacidad de acumular en sus tejidos concentraciones altas de sustancias tóxicas por un determinado periodo de tiempo sin sufrir ningún tipo de detrimento.

Bioensayo de repelencia

Básicamente estos bioensayos se efectúan en laboratorios para medir de manera controlada los efectos de contaminantes en organismos acuáticos. Con estos ensayos se ha determinada la existencia de organismos que son atraídos a los contaminantes y por el contrario otro tipo de organismos no soportan ni sienten afinidad hacia estos contaminantes (FAO, 1981).

3.3.1.2 Bioensayos de respuesta indirecta

Ensayos organolépticos

Personas experimentadas comprueban las características apreciables con los sentidos, es decir el olor, sabor, color y textura (FAO, 1981).

Ensayos de bioestimulación

Este tipo de ensayos comprueba el grado en el cual se presenta un crecimiento en la población expuesta a cada concentración de nutriente con respecto al control (FAO, 1981).

3.4 Índices de toxicidad

Estos índices son una medida cuantitativa de la toxicidad de una sustancia determinada experimentalmente en animales de laboratorio. 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 valores de estos parámetros son los que se comparan con las dosis suministradas que se estiman en los estudios de exposición a tóxicos ambientales.

Los índices de toxicidad están basados en pruebas experimentales en donde se observa los efectos de exposiciones de contaminantes controlados sobre animales de laboratorio. Existen varios parámetros utilizados para determinar la toxicidad durante bioensayos. Posteriormente se especifican los parámetros habituales durante las pruebas:

Concentración efectiva (CE_x): Se refiere a la concentración de un efluente que trae consecuencias negativas apreciables en un porcentaje "x" de una población establecida.

Concentración efectiva media (CE_{50}): El CE_{50} o EC_{50} , se puede describir como la concentración efectiva que afecta al 50 % de la población dada de organismos bajo condiciones definidas.

Concentración letal (CL_x): Se refiere a la concentración de un contaminante en un efluente que produce la muerte de un porcentaje "x" de la población de ensayo en un periodo de tiempo decretado.

Concentración Letal Media (CL_{50}): Se representa con las siglas CL_{50} o LC_{50} , que indica la concentración letal que mata al 50 % de la población dada de organismos bajo un conjunto específico de condiciones experimentales.

Dosis letal absoluta: Denotada por DL_{100} , muestra la cantidad o concentración más baja de una sustancia potencialmente tóxica que mata a 100% de los animales bajo prueba en condiciones estipuladas.

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

CENO (concentración de efectos no observables): Es la mayor concentración continuada medida de un efluente para la cual no produce efectos crónicos en las especies experimentales después de 48 horas de exposición.

MCEO (menor concentración que produce efectos observables): Se determina por consecuencias que se encuentren en una población de

organismos causadas por la menor concentración de un efluente. Se establece con técnicas de análisis de varianzas¹⁴.

3.5 Evaluación estadística de los bioensayos

3.5.1 Tipo de pruebas o de bioensayos

Para que las pruebas realizadas tengan validez y exactitud es necesario utilizar un sistema estadístico desde la planificación hasta la ejecución para posteriormente realizar un correcto análisis de los resultados. El criterio primordial es seleccionar un método estadístico que se ajuste a las condiciones experimentales y que permita obtener resultados válidos.

Desde el punto de vista estadístico, encontramos tres tipos de variables: variable cualitativa, variables cuantitativa discreta y variable cuantitativa continua. La primera se refiere a la relación muerto-vivo, ausente-presente, la segunda indica el número de muertos o el porcentaje de muertos y la tercera se refiere a la reducción del crecimiento en extensión o peso después de realizar pruebas.

Las variables cualitativas, son variables que categorizar, clasifica o describen una cualidad que no puede medirse pero se puede expresar cualitativamente. Este tipo de variables es empleado en estudios

¹⁴ METCALF & EDDY, INC. Ingeniería de aguas residuales. Mc Graw Hill. 3ª Edición (1995)

toxicológicos, registro de mortalidad de organismos en experimentos donde se desea conocer como muerto (1) o vivo (0) en condiciones especiales, etc.

Con las variables cuantitativas discretas se deben obtener valores numéricos fijos, es decir no aceptan valores que se encuentren en intermedios de un rango; para la gran mayoría de estudios e investigaciones que se trabaja con este tipo de variable se utilizan números enteros.

Las variables cuantitativas continuas son las más utilizadas en estudios experimentales en donde se estudia, el peso, la longitud, las concentraciones entre otras, pues tiene la posibilidad de tomar un valor numérico infinito entre dos números¹⁵.

3.6 Metales pesados

Los metales pesados son aquellos cuya densidad es 5 veces más alta que la densidad del agua, a pesar de que ciertos metales pesados son fundamentales para la vida se encuentran otros con una connotación de toxicidad por afectar a los seres humanos y a especies naturales, teniendo en cuenta que la concentración que puede llegar a causar daño a una especie puede ser diferente a la concentración del mismo tóxico que puede llegar a perjudicar otra especie. Habitualmente los metales pesados se hallan en concentraciones muy bajas, pero la actividad

¹⁵ CASTILLO MORALES, Gabriela, editora. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua, 2004.

humana a generado el aumento de concentraciones de estos metales pesados en aguas fluviales, océanos y sedimentos por: residuos mineros, extracción de petróleo y gas, industrias (pesticidas, pinturas, cuero, tejidos, fertilizantes, medicamentos), procesos de galvanotecnia, vertidos domésticos, residuos agrícolas, etc.

Para una especie animal o vegetal existen metales pesados que pueden ser esenciales para su sobrevivencia, pero así como para estas son esenciales, para otro grupo de especies puede ser tóxico. A continuación se mencionaran los criterios para determinar si un metal determinado es indispensable para el desarrollo y crecimiento correcto de una especie:

- ☛ Cuando en una población determinada, la especie de estudio no puede crecer ni puede completar su ciclo biológico sin una proporción adecuada del metal.
- ☛ Los beneficios del metal frente a la especie de estudio, no pueden ser suplidos por otro metal.
- ☛ El metabolismo adecuado de la especie no es el correcto por la deficiencia del metal.

3.6.1 Metales pesados en el agua

En el desarrollo de las diversas civilizaciones, los metales han jugado un papel muy importante gracias a su resistencia y multifuncionalidad. Actualmente, el agua es uno de los factores mas utilizados he

importantes en casi todas los procesos productivo, esto indica, que la calidad del agua disminuye en cada operación que se realiza produciendo cambios fisicoquímicos. En la producción de galvanotecnia, se incrementa las concentraciones de metales pesados en sus vertimientos, perjudicando los diferentes ecosistemas a los cuales llega este vertimiento si se realiza de forma directa.

El ser humano es vulnerable al contacto con este tipo de tóxicos, pues las plantas absorben el metal a través de la raíz y a su vez las especies animales lo hacen al alimentarse de aquellas. La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables, algunas especies almacenan estos contaminantes en sus tejidos provocando serias lesiones en su desarrollo normal, la parte del toxico que no es acumulado en tejidos animales o vegetales, persisten en el ambiente durante cientos de años.

La actividad humana incrementa el contenido de estos metales en el ambiente en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas.

3.6.2. Toxicidad

Podría definirse la toxicidad como "el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos mortales ocasionados por agentes químicos o físicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos y la aplicación de estos

estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles" (Hayes, 1975). El término cualitativo se refiere al tipo de órgano u organismo afectado, en comparación con otras sustancias conocidas, mientras que el término cuantitativo se refiere a la relación dosis-respuesta.

La toxicidad se puede definir como la capacidad que tiene una sustancia para causar daños a un individuo completo en su desarrollo físico, La toxicidad suele resultar:

- ☛ Cuando el organismo se ve sometido a una concentración excesiva del metal durante un periodo prolongado.
- ☛ Cuando el metal se presenta en una forma bioquímica.
- ☛ Cuando el organismo lo absorbe por vía inusitada.

Ha ido aumentando la exposición del hombre a contaminantes metálicos introducidos en su medio ambiente por la producción industrial.

Para el estudio de la toxicidad se encuentra una rama muy importante que es la toxicología en la cual la toxicidad resulta de una interacción entre la sustancia química y el organismo, esta relación cambia según la especie, el tiempo de exposición, la edad, el sexo, la vía de administración y la concentración (dosis).

3.6.3 Aluminio

El aluminio es uno de los metales más utilizados pues es abundante en el mundo teniendo como ventajas que es liviano, resistente, electropositivo y muy reactivo. Este metal tiene una característica especial, tiene la capacidad de desarrollar una película de óxido de aluminio en la que no puede ningún agente corrosivo en las superficies expuestas, no está sometido a problemas de corrosión atmosférica. El aluminio puro es blando y tiene poca resistencia mecánica, es maleable y puede modelarse, con todas las técnicas habituales, pero puede formar aleaciones con otros elementos para aumentar su resistencia y adquirir varias propiedades útiles. Las aleaciones de aluminio son ligeras, pueden ser rígidas o elásticas, especialmente sólidas y resistentes a la corrosión, permitiendo adaptar el aluminio a una amplia gama de necesidades. Por sus propiedades físicas, químicas y metalúrgicas, el aluminio se ha convertido en el metal no ferroso de mayor uso. El aluminio metálico se maneja más comúnmente como una aleación con otros metales para mejorar alguna de sus características.

Los principales usos industriales de las aleaciones metálicas de aluminio son:

- ☛ Como material estructural en aviones, automóviles, tanques, en buques y bicicletas.
- ☛ Papel de aluminio, latas, etc.

- ☛ Puertas, ventanas, cierres, armarios, etc.
- ☛ Recipientes criogénicos (hasta -200 °C), ya que contrariamente al acero no presenta temperatura de transición dúctil a frágil. Por ello la tenacidad del material es mejor a bajas temperaturas.
- ☛ Calderería¹⁶.

Los compuestos no metálicos de aluminio como el óxido de aluminio, también llamado alúmina, (Al_2O_3) es un producto intermedio de la obtención de aluminio a partir de la bauxita. Se utiliza como revestimiento de protección y como adsorbente para purificar productos químicos. El óxido de aluminio cristalino se llama corindón y se utiliza principalmente como abrasivo. El corindón transparente se llama rubí cuando es rojo y zafiro en los otros casos, utilizándose en joyería y en los emisores de rayos láser. El rubí y el zafiro también pueden ser producidos artificialmente¹⁷.

3.6.3.1 Propiedades Fisicoquímicas

Generalidades:

¹⁶ RODRIGUEZ MOSQUERA, Martín Emilio. Aislamiento y caracterización de secuencias de genes expresados diferencialmente en *Brachiaria decumbens* Sttapff cv. Basilisk, asociados a la resistencia al estrés por aluminio (Al^{+3}) en suelos ácidos. Facultad de ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional (2008).

¹⁷ LENNTECH BV, Water treatment solutions. Disponible en internet: <http://www.lennotech.es/periodica/elementos/al.htm#ixzz0bHINSXWq>

Tabla N° 3. Propiedades Químicas de aluminio.

Nombre	Aluminio
Símbolo	Al
Número	13
Serie Química	Metales del bloque p
Grupo	13
Periodo	3
Bloque	P
Densidad	2698,4 kg/m ³

Propiedades físicas:

Tabla N°4. Propiedades físicas del aluminio.

Estado ordinario	Sólido
Punto de fusión	933,47 K
Punto de ebullición	2792 K
Entalpía de vaporización	293,4 kJ/mol
Entalpía de fusión	10,79 kJ/mol
Presión de vapor	2,42 × 10 ⁻⁶ Pa a 577 K
Punto de fusión	660 °C (933 <u>K</u>)
Punto de ebullición	2.467 °C

Propiedades atómicas:

Tabla N° 5. Propiedades atómicas del aluminio.

Densidad	26,9815386(8) u
Radio medio	125 pm
Radio atómico (calc)	118 pm (Radio de Bohr)
Radio covalente	118 pm
Configuración electrónica	[Ne]3s²3p¹
Electrones por nivel de energía	2, 8, 3
Estado(s) de oxidación	3
Óxido	Anfótero
Estructura cristalina	cúbica centrada en las caras

El aluminio tiene características anfóteras, esto quiere decir que se disuelve tanto en ácidos (formando sales de aluminio) como en bases fuertes (formando aluminatos con el anión [Al (OH)₄]⁻) liberando hidrógeno. El principal y casi único estado de oxidación del aluminio es +3 como es de esperarse por sus tres electrones en la capa de valencia¹⁸.

¹⁸ MAYA MONTOLLA, Juan Guillermo. 2004. Efectos de la temperatura elevada en las propiedades mecánicas en los conectores de alta tensión Universidad Nacional de Colombia

3.6.3.2 Toxicidad del Aluminio

La toxicidad por aluminio depende básicamente de dos factores importantes:

- El tiempo de exposición
- La concentración

La toxicidad por aluminio se da cuando un organismo está expuesto e inhala cantidades elevadas de aluminio que se encuentran en el aire o almacena altos niveles de aluminio en el cuerpo.

La toxicidad del aluminio en los organismos y en los sistemas biológicos depende de la disponibilidad biológica de este elemento. Esta disponibilidad del metal está influida por muchos y muy variados parámetros incluidos tanto factores físicos, por ejemplo las membranas fosfolipídicas, como factores químicos, por ejemplo el pH. El aluminio es un metal de alta toxicidad para organismos acuáticos, siendo ésta mayor cuando el compuesto se halla en forma monomérica (Al^{3+}). La toxicidad del aluminio en organismos acuáticos, depende de las características físico-químicas del agua, especialmente del pH. Si se encuentran valores altos de pH, el aluminio precipita como hidróxido, el cual puede

flocular en el agua. El aluminio floculado es mucho menos tóxico y es semejante al suspendido en los sólidos (Svobodová *et al.*, 1993)¹⁹.

3.6.3.3 Riesgos para la salud humana

Los seres humanos están expuestos a elementos como el aluminio, pues prácticamente se puede encontrar concentraciones de este en alimentos, agua, aire, suelo, teniendo efectos indeseables cuando:

- ☛ Consumen alimentos con concentraciones altas de aluminio
- ☛ Inhalan polvo de aluminio que esta presente en el aire
- ☛ Residen en lugares donde se extrae o procesa aluminio
- ☛ Se encuentran frecuentemente cerca a sitios de desechos peligrosos.

Cuando el ser humano presenta intoxicación por causa de concentraciones de aluminio, se pueden presentar los siguientes síntomas: Debilidad muscular, dolor en los huesos, fracturas que no se curan, especialmente en las costillas y la pelvis, estado mental alterado, prematura osteoporosis, anemia, absorción dañada de hierro, inmunidad dañada, ataques, demencia, retraso del crecimiento en niños, deformidades espinales: escoliosis o quifosis.

¹⁹ SVOBODOVÁ, Z.; R. LLOYD; J. MÁCHOVÁ & B. VYKUSOVÁ. 1993. Water quality and fish health

A pensar que la exposición a bajos niveles de aluminio a través de los alimentos, el aire, el agua, o contacto con la piel no parece causar daño a la salud, el aluminio no es una sustancia necesaria para el organismo y en grandes cantidades puede ser peligroso o tener efectos adversos²⁰.

3.6.3.4 Efectos Ambientales del aluminio en organismos

Las concentraciones de aluminio que se encuentran en vertimientos no controlados, degenera el ambiente ya que:

- ☛ Interfieren en el equilibrio ecológico dañando especies y ecosistemas que no necesitan de este elemento para su sobrevivencia.
- ☛ Al realizar el proceso de la cadena alimentaria se destaca el gran impacto que este tipo de contaminantes hace a todo un sistema, pues las concentraciones de aluminio son absorbidas por las plantas y si estas son consumidas por el hombre, puede causar intoxicaciones o dermatitis, si no es consumida directamente se presentan los consumidores de primer orden como son los herbívoros que finalmente llegan al consumo humano causando grandes perjuicios en la salud.
- ☛ Contribuyen a la contaminación del agua, cuando se infiltran hacia aguas subterráneas que surten a ríos y lagos

²⁰ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, División de Toxicología, Disponible en Internet: <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/Entrega.asp?identrega=1030>

El aluminio se encuentra en muchos tipos de ecosistemas pues se adhiere a partículas en el aire, dependiendo de las características del agua, se puede disolver en lagos, arroyos y ríos, cuando estos minerales se disuelven, según las condiciones químicas, es posible precipitar el aluminio en forma de arcillas minerales, hidróxidos de aluminio o ambos., el agua de lluvia con características acídicas puede disolver al aluminio del suelo y rocas sobre todo en las ígneas, que contienen aluminio en forma de minerales de alúmino silicato y puede ser incorporado por algunas plantas desde el suelo.

Los primeros impactos del aluminio sobre organismos se encuentran desde de la producción de aluminio, comenzando con el procesamiento del mineral extraído, incluyen la eliminación del lodo rojo (una mezcla de arcillas y soda cáustica, altamente corrosiva), emisiones de la quema de combustibles, emisiones del proceso de electrólisis del aluminio, y corrientes de desechos líquidos y lechadas. El lodo rojo puede degradar las aguas superficiales o freáticas que lo reciben. Este lodo rojo no puede ser descargado en los ríos, sino que tienen que ser almacenado en tierra de tal manera que no puedan contaminarse los ríos o agua freática por causa de la infiltración o el lixiviado²¹.

3.6.5 Arsénico

El Arsénico es uno de los metales pesado que se encuentra de forma considerable en la naturaleza, los minerales con mayores

²¹ Lbid

concentraciones son los arseniuros de cobre, plata, plomo, oro y sulfuros de arsénico.

Se conocen compuestos de arsénico desde la antigüedad, siendo tóxico, aunque se emplean como componentes en algunos medicamentos. El arsénico es usado para la fabricación de semiconductores y como componente de semiconductores III-V como el arseniuro de galio. Uno de los subproductos más utilizados a nivel industrial es el trióxido de arsénico, que queda después de la fundición de minerales de cobre y plomo.

El arsénico puede llegar a fuentes de agua potable ya que las arcillas o la materia orgánica del suelo puede disolver y adsorber/absorber el arsénico siendo mezclado con corrientes de agua utilizadas para la captación y uso humano²².

3.6.5.1 Propiedades Fisicoquímicas

Generalidades:

²² BARBALACE, Kenneth. Periodic Table of Elements - Arsenic - As. EnvironmentalChemistry.com. 1995 - 2010. Disponible en línea : <http://EnvironmentalChemistry.com/yogi/periodic/As.html>

Tabla N°6. Propiedades químicas del arsénico.

Nombre	Arsénico
Símbolo	As
Número	33
Serie Química	Metaloides
Grupo	15
Periodo	4
Bloque	P
Densidad	5727 kg/m³

Propiedades físicas:

Tabla N°7. Propiedades físicas del arsénico.

Masa atómica	74,92160 u
Radio medio[†]	115 pm
Radio atómico calculado	114 pm
Radio covalente	119 pm
Radio de Vander Waals	185 pm
Configuración electrónica	[Ar]3d¹⁰ 4s² 4p³
Estados de oxidación (óxido)	+3,5 (levemente ácido)
Estructura cristalina	Romboédrico
Punto de ebullición	615° (sublima)
Punto de Fusión (a 37 atm)	817° C
Presión de vapor en milibar: (a 372°C)	1,333
Solubilidad en agua	Insoluble

Propiedades atómicas:

Tabla N°8. Propiedades atómicas del arsénico.

Masa atómica	74,92160 u
Radio medio[†]	115 pm
Radio atómico calculado	114 pm
Radio covalente	119 pm
Radio de Vander Waals	185 pm
Configuración electrónica	[Ar]3d¹⁰ 4s² 4p³
Estados de oxidación (óxido)	+3,5 (levemente ácido)
Estructura cristalina	Romboédrico

El arsénico presenta tres estados alotrópicos (un mismo elemento se presenta con estructuras moleculares diferentes), gris o metálico, amarillo y negro²³.

Arsénico gris metálico (forma α): A pesar de ser mal conductor eléctrico, es muy utilizado pues es un excelente conductor de calor. En condiciones normales es la forma estable y tiene estructura romboédrica, su densidad es de 5,73 g/cm³, es frágil y pierde el lustre metálico expuesto al aire.

Arsénico amarillo (forma γ): es una forma cristalina metaestable que se oxida a temperatura ambiente por la acción del aire y revierte al gris por la acción de la luz. Este tipo de arsénico se obtiene cuando el vapor de

²³ Lbid

arsénico se enfría rápidamente. Este alotrópico es excepcionalmente volátil y más reactivo que el arsénico metálico y presenta fosforescencia a temperatura ambiente. El gas esta formado por moléculas tetraédricas de As_4 de forma análoga al fósforo y el sólido formado por la condensación del gas tiene estructura cúbica, es de textura jabonosa y tiene una densidad aproximada de $1,97 \text{ g/cm}^3$.

Arsénico negro (forma β): Este alotrópico puede conseguirse por condensación lenta del vapor en atmósfera inerte en otras palabras por enfriando lento del vapor de arsénico y por la descomposición térmica de la arsina. El arsénico negro tiene una estructura hexagonal y densidad $4,7 \text{ g/cm}^3$, tiene propiedades intermedias entre los estados alotrópicos explicados.

El arsénico amarillo y negro carece de lustre metálico y tienen muy baja conductividad eléctrica por lo que el elemento se comportará como metal o no metal en función, básicamente, de su estado de agregación.

A presión atmosférica el arsénico sublima a 613°C , y a 400°C arde con llama blanca formando el sesquióxido As_4O_6 . Reacciona violentamente con el cloro y se combina, al calentarse, con la mayoría de los metales para formar el arseniuro correspondiente y con el azufre. No reacciona con el ácido clorhídrico en ausencia de oxígeno, pero sí con el nítrico caliente, sea diluido o concentrado y otros oxidantes como el peróxido de hidrógeno, ácido perclórico, etc.

Los estados de oxidación más comunes de arsénico inorgánico en el agua son: arsénico trivalente [As(III), arsenito], encontrado en aguas subterráneas anaerobias y arsénico pentavalente [As(V), arsenato], que prevalece en aguas superficiales. El As(V) se presenta como H_3AsO_4 y sus correspondientes productos de disociación ($H_2AsO_4^-$, $HAsO_4^{2-}$ y AsO_4^{3-}). El As(III) aparece como H_3AsO_3 y sus correspondientes productos de disociación ($H_4AsO_3^+$, $H_2AsO_3^-$, $HAsO_3^{2-}$ y AsO_3^{3-}), y es considerado el más tóxico (Cullen and Reimer, 1989).

3.6.5.2 Toxicidad del arsénico

La toxicidad del arsénico depende de:

- El estado de oxidación
- La estructura química
- La solubilidad en el medio biológico

La escala de toxicidad del arsénico decrece en el siguiente orden:

Arsina (H_3As) > As^{+3} inorgánico (arsenito) > As^{+3} orgánico > As^{+5} inorgánico (arsenato) > As^{+5} orgánico > compuestos arsenicales y arsénico elemental.

La arsina es considerada la forma más tóxica, seguida del arsenito, de arsenatos y los compuestos orgánicos de arsénico. La dosis letal para adultos está en el rango de 1-4 mg /kg del peso corporal (trióxido de diarsénico). La toxicidad del arsenito es 10 veces superior a la del

arsenato. La dosis letal 50 de trióxido de arsénico (As_2O_3) es de 2 a 3 microgramos por kilo de peso corporal, aunque en ocasiones cantidades considerablemente mayores no han causado la muerte debido a su expulsión inmediata por medio de vómitos originados por la gran irritación gástrica. El alto índice de toxicidad del arsénico se clasifican dos tipos: La toxicidad aguda y toxicidad crónica.

La toxicidad aguda es la consecuencia de la ingesta (vía digestiva) de alto contenido de arsénico en un tiempo corto puede ser horas o minutos causando dolores abdominales, vómitos, diarreas profusas y deshidratación. También pueden aparecer alteraciones del sistema nervioso central en forma de letargia, delirio, convulsiones y coma.

La toxicidad crónica es el resultado del consumo por vía digestiva de cantidades bajas de arsénico en un largo periodo de tiempo. Por lo general este tipo de toxicidad se presenta en comunidades donde se encuentran concentraciones indeseables de arsénico en el agua de consumo humano²⁴.

3.6.5.3 Efectos del arsénico sobre la salud humana

La exposición crónica del arsénico en el agua de consumo humano causa lesiones y los niveles de concentración de arsénico en orina, sangre, cabello y uñas se consideran como marcadores de exposición.

²⁴ ARGUELLO, Matías, Monografía: Arsénico, Universidad Católica de Salta.

La cuantificación del arsénico en la orina es el mejor de estos indicadores. El tiempo de vida media del arsénico inorgánico en el ser humano es de 2 a 40 días.

Los seres humanos pueden verse afectado por este elemento a través de la ingesta e inhalación. El arsénico es acumulable en algunos órganos como el tracto intestinal pues son absorbidos rápidamente los compuestos solubles de arsénico, mientras que otros órganos como los riñones eliminan rápidamente y completamente el As^{+5} y arsénico orgánico. Asimismo puede ocasionar además de enfermedades cutáneas como eritema, pápulas, vesículas, úlceras, verrugas, hiperpigmentación (melanodermia arsenical) y epitelomas, afecta las vías respiratorias altas, produciendo perforación del tabique nasal, ocasionar alteraciones digestivas en forma de náuseas, vómitos, diarreas y dolores abdominales de tipo cólico, lesiones cardíacas y vasculopatías periféricas y también es cancerígeno pulmonar, hepático, de riñón, hígado y vejiga.

Algunos estudios de toxicidad del arsénico indican que muchas de las normas actuales basadas en las guías de la OMS son muy altas, y plantean la necesidad de reevaluar los valores límites basándose en estudios epidemiológicos.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) clasifica al arsénico como cancerígeno en el grupo A debido a la

evidencia de sus efectos adversos sobre la salud. La exposición a 0,05 mg/l puede causar 31,33 casos de cáncer de piel por cada 1.000 habitantes. La USEPA ha considerado bajar el límite máximo de aceptación de 0,050 mg/l, a 0,010-0,020 mg/l.²⁵

3.6.5.4 Efectos Ambientales del arsénico en organismos

El Arsénico es un elemento que a bajas concentraciones se localiza fácilmente de forma natural en la tierra, pero al ser un elemento volátil permite y facilita concentraciones en el aire y por disolución especialmente durante escorrentías o en agua que se filtra a través del suelo, se puede hallar en fuentes hídricas principalmente en forma de arseniuros y arseniatos en los sistemas acuáticos.

En los microorganismos, plantas y animales se produce la metilación y reducción de los compuestos del arsénico y de este modo se produce una cantidad de compuestos de arsénico físico-química y biológicamente estables (KOCH, 1989).

Cuando se encuentran concentraciones de arsénico en el ambiente, causan una descompensación en los ecosistemas ya que los animales, plantas y organismos contaminados por el almacenamiento en sus tejidos de este elemento, generan y aumenta las posibilidades de alterar

²⁵ GREEN FACTS, informe de la OMS, Efectos del arsénico sobre la salud. 2004.

el material genético por las altas cargas contaminantes emitidas por la industrialización. En consecuencia se presenta una cadena destructiva entre los seres vivos, pues el agua con concentraciones inadecuadas de arsénico es fácilmente absorbida por las plantas estas a su vez son alimento de especies acuáticas que son consumidas por aves. Por cualquier factor involucrado en el ambiente, llegan al consumo humano, es decir, por el agua, plantas o animales²⁶.

Generalidades del arsénico en el Ambiente:

- ☛ El arsénico no puede ser destruido en el ambiente, únicamente puede transformarse.
- ☛ La lluvia y la nieve permiten que precipiten el arsénico que se localizan en partículas de polvo que se encuentran en el aire.
- ☛ Muchos compuestos comunes de arsénico pueden disolverse en agua.
- ☛ La mayor parte del arsénico en el agua terminará eventualmente en el suelo o el sedimento.²⁷

²⁶ GIL, Martín. "Problemática planteada por la presencia de niveles elevados de arsénico en el Acuífero de Los Arenales (sur del Duero)". Tecnoambiente, 2002.

²⁷ MINISTERIO FEDERAL DE COOPERACIÓN ECONÓMICA Y DESARROLLO (BMZ), Guía de protección ambiental, Disponible en línea: <http://144.16.65.194/energy/HC270799/HDL/spanish/envsp/begin3.htm>

4. INDUSTRIA DE GALVANOTECNIA

La galvanotecnia es una técnica que consiste en la transformación de una superficie que puede ser o no metálica mediante un recubrimiento metálico.

En general, los procedimientos tienen como finalidad modificar las propiedades de la superficie de los metales y estas pueden estar asociadas a motivos decorativos o funcionales. Los metales de uso más corriente para recubrir superficies son la plata, níquel, cromo y cobre para fines decorativos, siendo el cromado el revestimiento más extendido debido a su duración así como a su resistencia a la abrasión y al empañado²⁸.

4.1 Generalidades de la Industria.

La industria FUNDICIONES LINARES Ltda es una industria galvánica ubicada en la carrera 3 este N°23b – 61 Soacha, distrito capital, Bogotá. En esta empresa se conto con la colaboración del señor Jorge Linares, quien es el gerente de dicha industria.

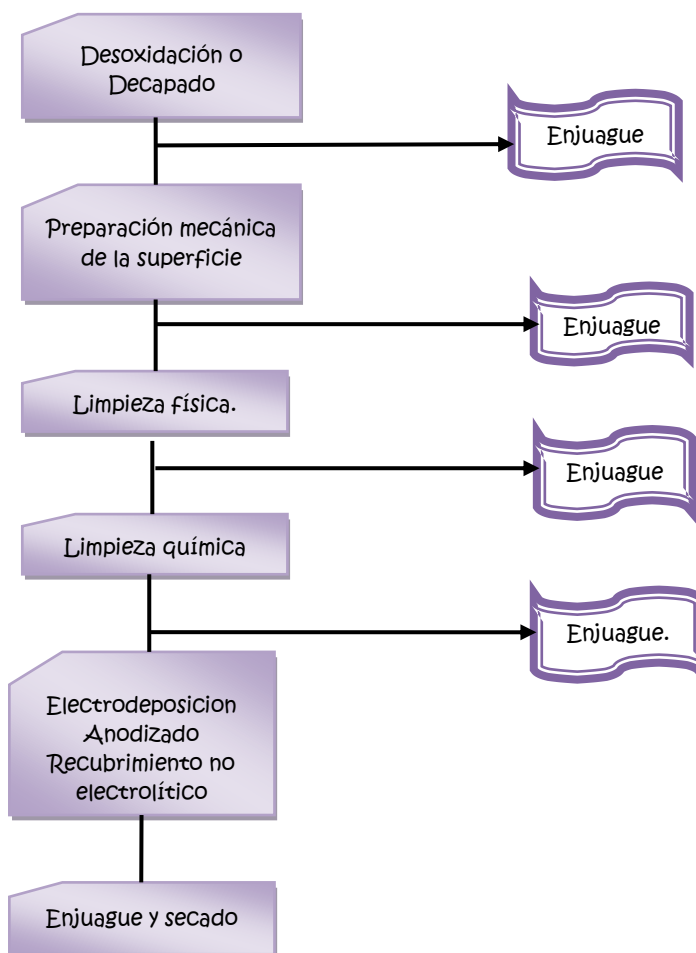
4.2 Descripción general del proceso

La galvanotecnia consiste en ciertas técnicas de obtención, por vía electrolítica, de depósitos metálicos en la superficie de los metales,

²⁸GREGORIO G., Oscar R. Dpto. Galvanoplastia de Laboratorio. Técnico de Desarrollos Técnicos GETRI, S. I. (libro en línea). Disponible en Internet: <http://www.getri.es/librogalv.htm>.

aleaciones y cuerpos no metálicos. A continuación se presenta un cuadro donde se describe el proceso de galvanotecnia:

Esquema N° 1. Proceso industrial de galvanotecnia.



Fuente:

<http://www.esi.unav.es/Asignaturas/ecologia/informes/residuos/sgalvano.htm>.

Para que una pieza esté correctamente galvanizada, es necesario que la superficie del hierro o acero se limpie a fondo, hasta la obtención de una superficie brillante, de tal forma que el hierro puede reaccionar con el metal fundido. Por este motivo, las piezas que han de ser galvanizadas,

son sometidas a una serie de pre-tratamientos previos que por lo general consisten en:

4.2.1 Desengrase.

Normalmente es necesario realizar un tratamiento de desengrase (por lo general alcalino) para eliminar los residuos de aceites y grasas, tales como aceites de corte procedentes de procesos de fabricación anteriores (laminado en frío, embutición, mecanizado). No es recomendable la realización de un desengrase con disolventes ya que redistribuye el contaminante como una película fina continua de grasa sobre la pieza²⁹.

4.2.2 Desengrase ácido.

Los baños de desengrase ácidos se componen de ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico y/o o-fosfórico, solubilizantes y agentes anticorrosivos. Este tipo de baños forman emulsiones de aceite estables, por lo que no es posible la separación de aceites y grasas para su eliminación periódica del baño. De la misma forma tampoco son adecuadas las instalaciones de ultrafiltración, ya que los agentes tensoactivos empleados en este caso, debido a su tamaño molecular, se separan junto con los aceites y grasas emulsionados, disminuyendo bastante la calidad del baño, siendo necesario la adición de estos

²⁹ Ibid., p.68

tensoactivos, por lo que la instalación no sería rentable. La temperatura de trabajo de los baños de desengrase de este tipo suele ser relativamente baja, entre 20° C y 40° C³⁰.

4.2.3 Desengrase alcalino.

El proceso de desengrase más común y efectivo utilizado en el galvanizado es una solución alcalina en caliente. Se distingue entre los desengrases alcalinos de alta temperatura (alrededor de 85° C) y los de baja temperatura (a partir de 40° C).

La composición básica de los baños de desengrase es el hidróxido sódico al que suelen añadirse otras sustancias con propiedades alcalinas como carbonato sódico, silicatos sódicos, fosfatos alcalinos, bórax, etc. Asimismo, se añaden agentes tensoactivos específicos (jabones), emulsionantes y dispersantes que facilitan la limpieza³¹.

4.2.4 Desengrase decapante.

La utilización de este tipo de baños está restringida a aquellos casos en los que las piezas a galvanizar tengan pequeñas cantidades de aceites y grasas adheridas a su superficie. En este caso se añaden al propio baño de decapado sustancias desengrasantes, teniendo lugar ambos procesos de forma simultánea. Su utilización suele ser problemática,

³⁰ Ibid.,pág.68

³¹ Ibid.,pág.69

tanto en lo que respecta a su eficacia, como a la hora de valorizar los baños, debido a la presencia de aceites y grasas emulsionados.

Al ser menor el poder de desengrase, pueden aparecer los aceites y grasas incluso en la fase de galvanizado, en donde por efecto de las altas temperaturas serán captados por los sistemas de aspiración de humos, no siendo recomendable la aparición de compuestos orgánicos en este tipo de sistemas³².

4.2.5 Mantenimiento de la capacidad del baño de decapado.

La actividad del baño de decapado va disminuyendo al aumentar su concentración en hierro, por lo que es necesario realizar adiciones periódicas de ácido para mantenerla.

También, será necesario reponer las pérdidas producidas tanto por evaporación como por arrastre de las piezas, compensándose estas pérdidas mediante la adición de agua. Este sistema puede mantenerse así hasta que se alcanza el límite de solubilidad del cloruro ferroso ($FeCl_2$) en el propio ácido clorhídrico, por lo que una vez que se ha llegado a este límite ya no será posible seguir decapando. Igualmente, si el contenido de hierro de la solución de decapado es superior a los 140-

³² Ibid., p. 69.

150 g/L, el baño de decapado estará agotado, siendo necesaria su renovación³³.

4.2.6 Desgalvanizado.

En las piezas mal galvanizadas o aquéllas cuyo recubrimiento de zinc debe ser renovado es necesario que, previamente a su introducción en el baño de zinc, su superficie metálica esté brillante, por lo que será necesario eliminar esta capa de zinc en el baño de decapado. Por lo general, tanto las piezas previamente galvanizadas como las no galvanizadas se decapan en el mismo baño, por lo que los baños de decapado agotados también contendrán cantidades no despreciables en zinc (a veces pueden incluso superar los 60 g/l). La valorización y eliminación de estos baños de decapado agotados es más complicada que la del resto de baños similares, debido a los contenidos en zinc, el cual suele ser limitante a la hora de realizar una serie de procesos de valorización (por ejemplo, para la producción de cloruro férrico). Asimismo, en los procesos de valoración de los baños de decapado agotados con alto contenido en zinc, el contenido en hierro está limitado³⁴.

4.2.7 Segundo Lavado.

Seguido del baño de decapado es necesario realizar una etapa de lavado de las piezas, con el fin de evitar que éstas arrastren ácido y

³³ Documento en línea: <http://www.istas.net/fitema/att/li4.htm>.

³⁴ Ibid..

sales de hierro a las etapas posteriores de mordentado y al baño de zinc. Teóricamente, por cada gramo de hierro que se arrastre y llega al baño se forman 20 gramos de trazas de zinc, por lo que es indispensable que esta etapa de lavado sea lo suficientemente eficaz. Estos baños de lavado pueden utilizarse en la preparación de nuevos baños de decapado, (normalmente) o de desengrase.

4.2.8 Mordentado.

El mordentado es necesario para disolver y absorber cualquier resto de impurezas que queden sobre la superficie metálica y para asegurar que la superficie limpia de hierro o acero se pone en contacto con el zinc fundido. La función del mordentado es la eliminación de las últimas impurezas y mantener limpia la superficie hasta que la pieza se sumerja en el baño de zinc. Los mordientes, que contienen cloruro de amonio, también provocan un efecto de decapado suplementario sobre la superficie de la pieza.

Normalmente suelen utilizarse mordientes a base de cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y cloruro de amonio (NH_4Cl), con una proporción del 60% de $ZnCl_2$ y el 40% de NH_4Cl , siendo el contenido en sales de estos baños de unos 400 g/L ³⁵.

³⁵ Ibid., anexo E.

4.3. Impacto ambiental que produce la galvanotecnia

La industria galvánica involucra consumo de agua en los baños de proceso, en las etapas de lavado y enjuague. Las descargas de estas aguas residuales están compuestas por efluentes que se caracterizan por su carga contaminante tóxica en términos de su contenido de cianuro, metales pesados como el cromo hexavalente, ácidos, álcalis. El proceso de recubrimiento metálico en general, es muy poco efectivo ya que sólo una pequeña cantidad de las sustancias utilizadas de éste se deposita en la pieza. Hasta un 90% de las sustancias pueden evacuarse a través de las aguas residuales³⁶.

Los vertimientos líquidos pueden presentar características ácidas o básicas según donde provengan. También pueden contener altas cantidades de sólidos en suspensión, sustancias tóxicas disueltas y grasa proveniente de los baños de desengrase; si se utilizan baños ácidos de cobre, níquel, plata entre otros. Las aguas ácidas generadas contienen los metales correspondientes en concentraciones de trazas, más los diversos compuestos asociados a productos anexos agregados al baño. Los principales compuestos disueltos que deben ser controlados son: cromo hexavalente, estaño bivalente, iones de paladio, cobre, níquel, plata, sodio, aluminio y potasio³⁷.

³⁶ <http://www.conama.cl/rm/568/article-908.html>. pag 56

³⁷ Manual de minimización, tratamiento y disposición. Concepto de manejo de residuos peligrosos para el giro de la galvanoplastia. 1998.

5. MARCO LEGAL

Cuadro N°3. Normatividad

Ley, decreto o norma	Definición									
Decreto 1594 de 1984 Artículo 74	La concentración para el control de la carga de las sustancia de interés sanitario para este proyecto, es: Arsénico: 0.5 mg / L									
Decreto 1019 de 2009 Artículo 5º	Establece las funciones de la Secretaría Distrital de Ambiente donde esta el ejercer el control y vigilancia del cumplimiento de las normas de protección ambiental y manejo de recursos naturales, emprender las acciones de policía que sea pertinentes al efecto, y en particular adelantar las investigaciones e imponer las sanciones que correspondan a quienes infrinjan dichas normas.									
Resolución 3957 de 2009	<p>El objeto de la resolución es establecer la norma técnica para el control y manejo de los vertimientos de aguas residuales realizadas al sistema de alcantarillado público de Bogota D.C., al tiempo que fija las concentraciones o estándares para su vertido.</p> <p>Valores de referencia para los vertimientos realizados a la red de alcantarillado:</p> <table><tr><th>Parámetro</th><th>Unidad</th><th>Valores</th></tr><tr><td>Aluminio total</td><td>mg/L</td><td>10</td></tr><tr><td>Arsénico total</td><td>mg/L</td><td>0.1</td></tr></table>	Parámetro	Unidad	Valores	Aluminio total	mg/L	10	Arsénico total	mg/L	0.1
Parámetro	Unidad	Valores								
Aluminio total	mg/L	10								
Arsénico total	mg/L	0.1								
Convenio de cooperación Nº 045 de 2007	La Secretaría Distrital de Ambiente mediante el convenio de cooperación No 045 de 2007 adelantó el estudio "Concentraciones de referencia para los vertimientos industriales realizados a la red de alcantarillado y de los vertimientos industriales y domésticos efectuados a cuerpos de agua de la ciudad.									
Decreto 3956 de 2009	El objeto del decreto es establecer la norma técnica, para el control y manejo de los vertimientos realizados al cuerpo hídrico en el perímetro urbano en Bogotá D.C., al tiempo que fija los índices, factores, concentraciones ó estándares máximos para su vertido.									

Fuente: Autoras.

6. METODOLOGÍA

En el desarrollo de este trabajo se realizaron tres fases que son:

1. *Fase de mantenimiento.*

En esta fase se encuentra la preparación de agua reconstituida, preparación del medio Bristol y centrifugación de algas verdes *scenedesmus* y *chlorella*, alimentación de organismos prueba, aclimatación de los organismos prueba y mantenimiento del cultivo de los organismos *daphnia magna*.

2. *Fase: pruebas de toxicidad.*

En esta fase se realizó la preparación de soluciones, montaje de las pruebas de toxicidad (bioensayos), pruebas de toxicidad de sensibilidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia, pruebas preliminares de toxicidad con aluminio, pruebas preliminares de toxicidad con arsénico, pruebas definitivas con aluminio, pruebas definitivas con arsénico, toma y preservación de muestras ambientales para los ensayos de toxicidad y pruebas definitivas con el vertimiento de aluminio y arsénico de la industria tipo.

3. *Fase: análisis estadístico.*

En esta fase se obtuvieron el índice toxicológico, índice toxicológico del vertimiento y se determinó el CL_{50}^{48} del aluminio, arsénico y el vertimiento de cada uno de estos metales.

Con estas fases metodológicas se mostrará un proceso sistemático, organizado y objetivo destinado a dar respuesta a los objetivos propuestos. El diseño metodológico es la base para planificar todas las actividades que demanda el proyecto y para determinar los recursos requeridos.

A continuación se expondrá el conjunto de pasos, o etapas secuenciadas.

6.1 Diseño experimental

Los ensayos o bioensayos que se realizaron en el desarrollo del proyecto fueron planeadas para descubrir nuevos hechos, para confirmar o negar los resultados de investigaciones previas. Durante los experimentos se manipuló deliberadamente una variable independiente (supuesta causa) para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una variable dependiente (supuestos efectos), dentro de condiciones controladas.

El diseño experimental que se aplicó debe contar con las siguientes variables:

Cuadro N° 4. Variables diseño experimental.

VARIABLES	CARACTERÍSTICAS
Variable independientes	Concentración de los contaminantes tóxicos aluminio y arsénico para establecer el efecto sobre la <i>Daphnia magna</i> .
Variable dependientes	Concentración letal media (CL_{50}^{48}) de los metales tóxicos aluminio y arsénico en un tiempo de 48 horas de exposición del organismo prueba

(neonatos *Daphnia magna*) ya que el resultado depende de los efectos que los tóxicos producen a los organismos prueba.

Constantes

- ☞ Número de organismos utilizados: 20 neonatos de *Daphnia magna* por cada concentración.
- ☞ Tiempo de duración de los ensayos: 48 horas.
- ☞ Parámetros fisicoquímicos requeridos: pH, dureza, temperatura y oxígeno disuelto.

Fuente: Autoras.

6.2 Materiales y equipos de laboratorio

En la metodología a utilizar se mostrarán los materiales y equipos necesarios.

Cuadro N°5. Materiales de laboratorio.

Materiales de laboratorio		
☞ 16 peceras de 3 L de capacidad.	☞ Pipetas Pasteur de vidrio	☞ Manguera delgada para aireadores
☞ 1 acuario de 30 L de capacidad.	☞ Micropipeteadores 10-100 μ L y 100-1000 μ L	☞ Difusores
☞ Balón aforado de 100 , 250ml	☞ Pipeteadores	☞ Vidrio reloj
☞ 500 y 1000mL	☞ Probeta de 500 y 2000 mL	☞ Espátula
☞ Beaker de 2000 mL	☞ Lámpara luminiscente	☞ Papel Parafilm
☞ Pipetas graduadas y	☞ Papel Kraff	☞ Tubos de ensayo
	☞ Garrafón de veinte litros	☞ Copas blancas de 1 onz
		☞ Plástico
		☞ Estantería

volumétrica s de 1, 5 y 10 mL Pipeta Pasteur plásticas de 10mL		
--	--	--

Fuente: Autoras

Cuadro N°6. Equipos de laboratorio.

Equipos de laboratorio		
Pipeta DINAC II Centrifuge (Brand) cámara Neubauer Microscopio Autoclave o equivalente	Tituladores para dureza y alcalinidad Temporizador Refrigerador (4± 2 °C). Balanza analítica	Termómetro pHmetro Medidor de oxígeno disuelto Aireador

Fuente: Autoras

6.3 PRIMERA FASE

6.3.1 Preparación de agua reconstituida.

El medio empleado en la totalidad de los cultivos de *Daphnia Magna* y como blanco de las pruebas de toxicidad fue agua reconstituida con dureza conocida entre 160-180 mg / L de CaCO_3 . Posteriormente se mostrarán los reactivos y soluciones necesarias para la preparación adecuada del agua reconstituida:

Tabla N° 9. Soluciones agua reconstituida.

Compuestos		Soluciones estándar g/ L	Cantidad ml/L
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13.5	15
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20.5	6
Cloruro de potasio	KCl	10	7.5
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	10	20

Fuente: Autoras.

Estas soluciones se pueden mantener refrigeradas durante 6 meses a una temperatura entre $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los materiales que se emplean durante la preparación de agua reconstituida son los siguientes:

- ☞ Acuario de 30 Litros
- ☞ Probeta de 500 ml
- ☞ Aireadores de 1 salida
- ☞ Plástico para cubrir acuario

El agua reconstituida se prepara con el fin de aparentar el ambiente del hábitat de la *Daphnia Magna*, y se realiza a partir de los siguientes volúmenes de las soluciones:

Tabla N°10. Reactivos agua reconstituida.

Reactivos	ml /20L	ml /30 L
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	300	450
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	84	125
Cloruro de potasio (KCl)	150	225
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	400	600

Fuente: Autoras.

Dependiendo del volumen de pecera a utilizar (20 ó 30 Litros) se determina la composición del agua del cultivo y la cantidad de reactivo a diluir.

Imagen N° 2. Soluciones agua reconstituida



Fuente: Autoras.

Procedimiento

El agua dura reconstituida es necesaria para lograr un ambiente satisfactorio y óptimo para las pulgas acuáticas *Daphnia Magna*. Se procede de la siguiente manera para obtener 20 litros de agua dura:

1. En el acuario de 30 litros, agregamos 10 litro de agua destilada.
2. Se adicionan los volúmenes correspondientes a los 4 reactivos, Cloruro de Calcio ($CaCl_2$), Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$), Cloruro de potasio (KCl) y Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) como se indica en la tabla anterior.
3. Para la completa dilución de los reactivos se adiciona agua destilada hasta completar el volumen de 20 Litros en el acuario.
4. Se ubican dos aireadores de una salida para aumentar el oxígeno disuelto en el acuario (por un periodo mayor a 24 horas).
5. Para evitar la contaminación por factores externos, se cubre completamente el acuario con un plástico.
6. Después del periodo mínimo de oxigenación que son 24 horas, se miden los parámetros fisicoquímicos principales, que son los siguientes: pH, dureza, temperatura y oxígeno disuelto.
7. En caso de realizar la lectura y que la dureza sea mayor a 180 mg/L ($CaCO_3$ /L) se puede agregar agua destilada.
8. Si se realiza la lectura y la dureza es menor a 160 mg/L ($CaCO_3$ /L) se le agregaba Sulfato de magnesio heptahidratado.
9. Después de realizar la lectura fisicoquímica del agua reconstituida, se debe realizar una prueba de viabilidad que consiste en exponer 5 neonatos *Daphnia magna* en el agua reconstituida por un tiempo de 24 horas, estableciendo el porcentaje de mortalidad que debe ser menor al 10%, si se

supera este porcentaje se descarta el agua reconstituida como factor de mortalidad y se procede a preparar una nueva con las anteriores características.

Este procedimiento se ejecuta cada vez que se va a preparar agua dura reconstituida.

Imagen N°3. Acuario agua reconstituida



Fuente: Autoras.

Parámetros de Control

El agua reconstituida al término de su elaboración y antes de ser utilizada, se sometió a una prueba de calidad, para determinar su aptitud como medio de cultivo y de prueba para las pulgas de agua. La calidad del agua reconstituida antes de ser utilizada en cultivos y pruebas de toxicidad, se presenta en la siguiente tabla:

Tabla N°11. Parámetros de control del agua reconstituida.

Parámetros	Rangos
pH	7 - 8
Oxígeno disuelto	> 6 mg/L (O ₂)
Dureza	160- 180 mg/L (CaCO ₃ /L)
Temperatura	20+/- 2°C
Periodo de oxigenación	> 24 horas

Fuente: Autoras.

Para lograr un adecuado control de estas condiciones se recomienda llenar el siguiente formato:

Tabla N°12. Formato de control agua reconstituida.

ACUARIO #	pH	Oxígeno disuelto		Dureza	Oxígeno Disuelto	
		ODi	Fecha		ODf	Fecha

Ensayo de viabilidad: Consiste en poner algunos organismos en el agua reconstituida por un tiempo de 24 horas, determinando el porcentaje de mortalidad que debe ser menor al 10%, si se supera este porcentaje se descarta el agua reconstituida y se procede a preparar una nueva con las anteriores características.

6.3.2 Preparación del medio Bristol y concentración centrifugación de algas verdes *Selenastrum Capricornutum*, *Sscenedesmus Quadricauda*

Medio de cultivo Bristol para el cultivo de algas

Los cultivos de células en laboratorios (in vitro) son muy utilizados por la accesibilidad, facilidad de manejo y control y por que se encuentran varias clases de cultivo para una misma clase de célula u organismo. Es importante que el medio que se pretende simular cuente con las condiciones necesarias para el desarrollo correcto de las células como son los nutrientes y micronutrientes esenciales. También se puede controlar el aumento de otro tipo nutrientes adicionales, si se quiere maximizar su crecimiento, o por alguna otra razón. Además de los nutrientes necesarios para el crecimiento celular, existen otros aspectos a considerar. Las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentre son también importantes. Estos incluyen condiciones tales como pH, temperatura, niveles de CO₂, O₂, etc.

El medio Bristol se efectúa para aumentar las algas verdes en condiciones de laboratorio controladas por medio de la fotosíntesis. Para que esto se obtenga, se debe contar con una lámpara luminiscente que garantice un cubrimiento sobre todo el medio Bristol y que mantenga la temperatura entre un rango de 22 +/- 2°C y nutrientes necesarios específicos para la multiplicación óptima de las algas.

Los compuestos y las disoluciones se mezclan en un beacker como se muestra en la imagen N°4.

Tabla N° 13. Disoluciones medio Bristol.

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

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

Imagen N° 4. Preparación medio Bristol.

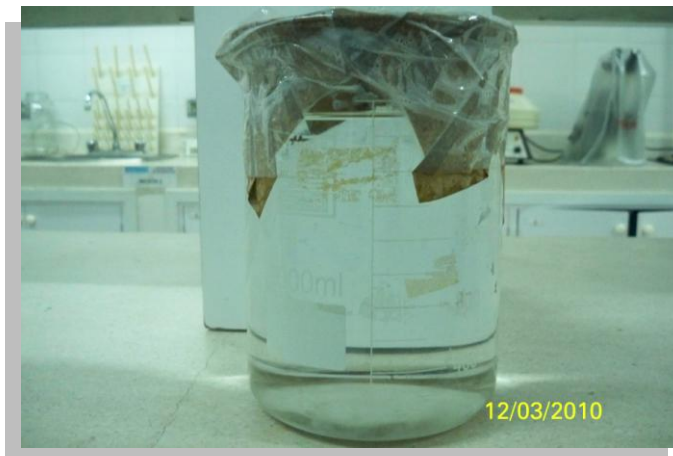


Fuente: Autoras.

Posteriormente se expondrá el procedimiento para la realización del medio Bristol:

1. Se utiliza un Beaker de 2000 ml para añadir las soluciones preparadas con los volúmenes según la cantidad de medio Bristol que se vaya a realizar.
2. Después de agregar todas las disoluciones de macro nutrientes y micro nutrientes completamos a 2000 ml el beaker con agua destilada.
3. A continuación el beaker es tapado en su totalidad con ayuda de papel aluminio o papel kraft, y sellada correctamente con cinta, como se muestra en la imagen N° 5.

Imagen N°5. Solución sellada.



Fuente: Autoras.

4. Se lleva la solución preparada a la autoclave con el fin de esterilizar el medio, durante 15 minutos, como se muestra en la imagen N°6.

Imagen N°6. Solución en autoclave.



Fuente: Autoras.

5. Al transcurrir estos 15 minutos se deja enfriar a temperatura ambiente.

6. Todos los cultivos de algas verdes *Scenedsmus Acutus* deben mantenerse estériles antes de la inoculación, y libres de contaminación.
7. Cuando el medio este a temperatura ambiente, se lleva a un frasco de vidrio y se le adiciona mediante una pipeta una alícuota de 2ml de cultivo de algas verdes *Scenedsmus Acutus* concentrada.
8. Para evitar contaminar el medio, se tapa correctamente y se refuerza con cinta, Se ubica un aireador de una salida para aumentar el oxígeno disuelto del medio y garantizar que no haya precipitación.
9. Se iluminar con una lámpara luminiscente de 20 vatios de manera continua (24 horas) durante un periodo aproximado de 12 a 15 días con el fin de optimizar el proceso de la fotosíntesis, como se muestra en la figura N° 7.

Imagen N°7. Medio Bristol.



Fuente: Autoras.

10. Transcurrido este periodo se realiza el proceso de centrifugación.

Con el último paso lo que se consigue es que precipiten células y moléculas de algas. La centrífuga somete la muestra a fuerzas de aceleración que obligan a las moléculas a concentrarse en el fondo del tubo centrífugo, separándolas del medio en que se encuentran, como se muestra en la imagen N°9. Con ayuda de Pipetas Pasteur de vidrio, se puede extraer aquella fase donde se encuentren las moléculas de interés, como se muestra en la imagen N°11.

Imagen N°8. Centrífuga



Imagen N° 9. Tubo centrifugado.



Fuente: Autoras.

Imagen N° 10. Alimento centrifugado.



Imagen N° 11. Extracción de algas



Fuente: Autoras.

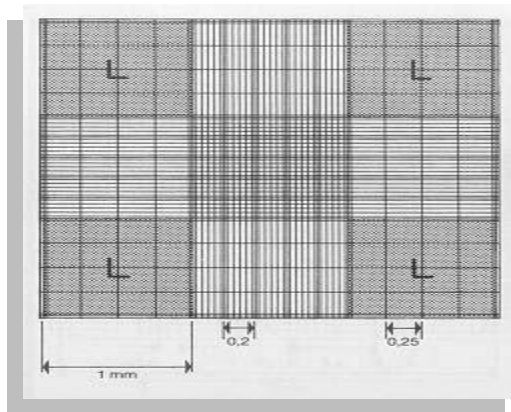
Después de obtener las algas verdes *Scenedsmus Acutus* se obtiene con la Cámara Neubauer el volumen a suministrar en cada pecera donde se encuentran los 20 organismos.

6.3.3 Conteo de algas por medio de la cámara Neubauer

La cuantificación de las células mediante una cámara de conteo (Neubauer) es a través de un microscopio óptico. En otras palabras el conteo de algas mediante una cámara Neubauer consistió en medir el crecimiento, aumento o multiplicación de un número de células de una muestra usando un diseño experimental. Esto se hizo por conteo directo al microscopio con cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer es una cámara de cuantificación adaptada al microscopio. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste difiere de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 micro litro.

Imagen N° 12. Cámara de conteo celular

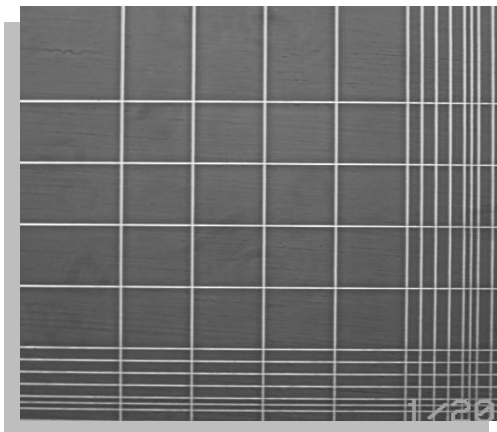


Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Si contamos las cuatro áreas sombreada (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será: concentración en la suspensión (células / mL) = 10000 (x/4)

En la siguiente imagen puedes observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado. Esta imagen ha sido tomada empleando un microscopio invertido de contraste de fases.

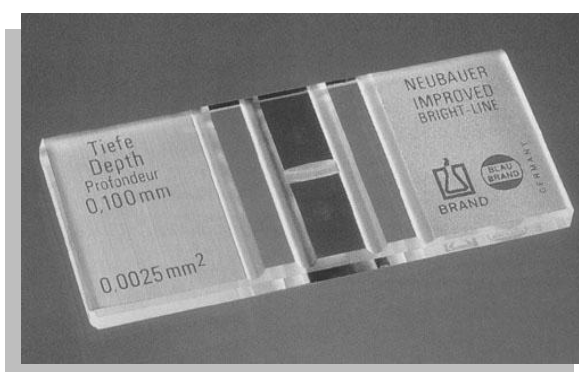
Imagen N° 13. Cámara de conteo celular, un cuadrante.



Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Existen numerosos modelos de cámaras de conteo celular adaptadas a su uso en microscopía. En la imagen puedes observar una cámara de Neubauer doble, como las que se utilizaron durante la investigación en el laboratorio de bioensayos de la Universidad de la Salle.

Imagen N° 14. Cámara de conteo celular



Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Procedimiento de uso:

- ☛ Limpie la cámara y la laminilla de cuarzo suavemente con alcohol.
- ☛ Revisar la laminilla de cuarzo para asegurar que no esté quebrada.
- ☛ Coloque la laminilla de cuarzo sobre la cámara en forma vertical, esta debe quedar centrada.
- ☛ Posteriormente se debe llenar la cámara. Este paso es muy significativo y contundente en la distribución de las células. Es recomendable llenarla con micropipeta pequeña ya que la

cámara se llena con una gota. El llenado debe ser continuo en un único ensayo.

- No se puede dejar la cámara inundada y tampoco se debe dejar partes de la cámara seca, esto se manifiesta a través de la observación ya que en los bordes de la cámara se ven fragmentos con líquido abundante o por el contrario que no tiene humedad.
- Se lleva la cámara al microscopio y se enfoca el cuadro de conteo. Se deben mover los tornillos macro y micrométrico hasta lograr observar una cuadrícula. Muchos cuadros pequeños perfectos.
- Se deben ubicar en la cuadrícula central y pasar al ocular de 40X.
- En esta cuadrícula se visualizan 25 cuadros, de los cuales se cuentan las células presentes en 5 campos, generalmente se cuentan los cuadros diagonales, desde el primer cuadro de la esquina superior izquierda hasta la esquina inferior derecha, también se puede realizar el conteo de los cuadros de las esquinas y el central, lo que garantiza un conteo aleatorio.
- Para realizar el conteo de los otros campos, con ayuda de el carro del microscopio se desplaza la cuadrícula hasta el primer campo, y se lee de la misma manera que el campo central, en este campo se visualizan 16 cuadros.
- Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el

momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células que no tocan la segunda línea son contables, si la tocan o están encima de ella no se incluyen.

- Después de contar las células se procede a calcular el número de células por unidad de volumen. Para esto se utiliza el área de cada cuadro, el espacio ocupado por el líquido en el que están las células que es el mismo espacio que hay entre la cuadrícula de la cámara y la laminilla de cuarzo.

Los cálculos que se debe realizar para obtener el volumen a suministrar a cada pecera se obtiene a través de las siguientes formulas:

1. Primero se debe multiplicar el número de algas que se contaron en cada campo por el número de cuadros totales, es decir:

- N° de células campo 1:

$(\text{Lectura cuadro 1} * 5) + (\text{Lectura cuadro 2} * 5) + (\text{lectura cuadro 3} * 5) +$
 $(\text{lectura cuadro 4} * 5) + (\text{lectura cuadro 5} * 5)$

- N° de células campo 2:

$(\text{Lectura cuadro 1} * 4) + (\text{Lectura cuadro 2} * 4) + (\text{lectura cuadro 3} * 4) +$
 $(\text{lectura cuadro 4} * 4)$

☞ N° de células campo 3:

(Lectura cuadro 1 * 4) + (Lectura cuadro 2 * 4) + (lectura cuadro 3 * 4) +
(lectura cuadro 4 * 4)

☞ N° de células campo 4:

(Lectura cuadro 1 * 4) + (Lectura cuadro 2 * 4) + (lectura cuadro 3 * 4) +
(lectura cuadro 4 * 4)

☞ N° de células campo 5:

(Lectura cuadro 1 * 4) + (Lectura cuadro 2 * 4) + (lectura cuadro 3 * 4) +
(lectura cuadro 4 * 4)

2. La sumatoria del número de células de los 5 campos es el total de células encontradas en la Cámara Neubauer que se representa como \sum de lecturas.

3. A la \sum de lecturas se debe sacar el promedio de células (\bar{X}) : \sum de lecturas / 5 campos

4. Como la cámara Neubauer tiene una capacidad de 1×10^{-4} ml, se determina con este valor la cantidad de células que se encuentran en 1 mililitro con la siguiente formula:

$$\frac{\bar{X}}{1 \times 10^{-4}} = \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{1 \text{ mL}}$$

5. Se obtiene un valor de dilución:

Primera dilución 2/10

6. se multiplica por el valor obtenido anteriormente, el N° de células por el factor de dilución:

$$N^{\circ} \text{ de células} * \text{Factor de dilución (5)} = \frac{\text{Células}}{1 \text{ mL}}$$

7. Por ultimo se obtiene el volumen que se debe aplicar a cada pecera:

$$V = \frac{A * B}{C}$$

Donde:

V= Volumen de alimento (algas) a suministrar en cada pecera

A= Número de *Daphnia Magna* por pecera (20)

B= Dosis recomendada ($4.5 * 10^6$ células por *D.Magna*/ día)

C= Concentración de algas (número de células/mL)

6.3.4 Inoculación de las algas en medio sólido (agar - agar)

Durante esta investigación se utilizó el método de inoculación de algas en medio sólido con el fin de mantener cultivos monoespecíficos (una sola especie) de algas verdes *Scenedsmus Acutus* en condiciones de esterilidad para evitar que se encuentren interferencias por

contaminantes o por diferentes microorganismos y también como provisión en caso de que se contamine el cultivo que se encuentra en medio líquido. Para garantizar que los cultivos son únicamente de algas se debe esterilizar el lugar en el cual se va a realizar el cultivo, los materiales que se van a utilizar como beaker, tubos de cultivo con su tapa de rosca, asada, etc.

La preparación del medio de cultivo sólido se lleva a cabo de la misma manera que la preparación del Medio de cultivo Bristol como se muestra en el numeral 6.3.2 hasta el paso 6, al medio que hemos obtenido tras realizar los pasos anteriores se le realizan los siguientes cambios:

- ☛ Se adiciona 10 g de Agar
- ☛ Se agita para disolver completamente el Agar y bajar un poco la temperatura
- ☛ Los tubos de cultivo se llenan a la mitad con el medio obtenido, como se muestra en la imagen N°15.
- ☛ Los tubos de cultivo son colocados en ángulo de 45 grados para la obtención del medio inclinado.
- ☛ Ya solidificado, se toma con un asa bacteriológica las algas cultivadas y realizando el método de estría ondulada (en forma de zigzag sobre la superficie del medio) se inocula el nuevo medio de cultivo y se tapan los tubos.
- ☛ Los medios inclinados deben estar a una temperatura entre 24 ± 2 °C con iluminación continua por un periodo entre 48 y 72 h

- Después de ese periodo se dejan en la nevera garantizando una temperatura entre 4 ± 2 °C y oscuridad para que de esta manera tengan un crecimiento lento.³⁸

Imagen N° 15. Agar solidificado.



Imagen N°16. Medio inoculado.



Fuente: Autoras.

6.3.5 Alimentación de organismo de prueba (algas verdes, *Scenedesmus Acutus*)

Las algas seleccionadas como alimento para el mantenimiento de los cultivos de *Daphnia magna*, son algas verdes, pertenecen a la clase Cenobio formado por dos células, un poco arqueadas, mide de 3 µm de ancho y 10 µm de largo cada célula³⁹. Estas se caracterizan por que presentan cloroplastos de color verde, puede encontrarse en forma unicelular o colonias no flageladas, microscópicas unicelulares, filamentosas simples o ramificadas y algunas formas desarrolladas. La mayoría forman parte del plancton y del bentos de agua dulce, las

³⁸ CASTILLO Gabriela, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.

³⁹ http://conabioweb.conabio.gob.mx/bancoimagenes/doctos/001_thumbs8-2.htm

especies marinas son de mayor tamaño, y constituyen en forma secundaria el plancton marino.

Imagen N° 17. Algas



Fuente: Autoras.

6.3.6 Aclimatación de los organismos prueba.

El cambio de grupo se realizó por 15 días. Se procedió de forma gradual a la adaptación de los organismos al nuevo grupo para evitar que estos fueran a sufrir estrés, nacieran efípidos o empezara a descender la población.

6.3.7 Cultivo y Mantenimiento de *Daphnia magna*.

El mantenimiento del cultivo de los organismos *Daphnia magna* se realizó según la metodología CETESB (L5.018), para conservar un cultivo masivo de 4 edades. (VER ANEXO E).

El cultivo se manejo en 4 peceras por semana obteniendo 16 peceras en el mes con un total de 320 organismos cultivados.

A continuación se menciona los pasos a seguir para el cultivo y mantenimiento de la *Daphnia magna*:

- Realizar test de viabilidad es decir en un recipiente plástico de 1 onza preferiblemente blanco tomar una muestra del agua dura y en este se introducen cinco (5) neonatos de *D. magna*, en 24 horas mínimo se observa que el 90% de la *Daphnias* estén vivas, en caso contrario hay que descartar esta.
- El cultivo de *Daphnia magna* se debe mantener en peceras con 2 litros de agua dura para el óptimo crecimiento de los individuos.
- En cada una de ellas se deben mantener 20 individuos, manejando la relación de 1/100 (1 individuo por cada 100ml de agua reconstituida), con la dureza total entre 160-180mg $CaCO_3$ para su desarrollo, utilizamos el kit de dureza como se muestra en la imagen N°18.

Imagen N°18. Kit dureza. Imagen N°19. Calculo dureza.



Fuente: Autoras.

- ☛ Cada pecera debe permanecer tapada para ello se puede utilizar plástico transparente evitando el polvo, sustancias químicas y vapores que puede afectar la calidad del agua y la alteración del cultivo al igual que permita el paso de la luz.
- ☛ Es necesario renovar el cultivo de la *Daphnia magna*, y manteniéndolas en peceras separados por edad desde 0 – 1 semana hasta cuatro semanas; eliminando los organismos mayores a cinco semanas y renovando el cultivo con neonatos que se obtuvieron ese día. (CETESB /L5.018, 1992).
- ☛ La iluminación es un factor que se debe tener en cuenta para llevar a cabo la cría de este crustáceo, Se debe manejar foto - periodo 16 de luz / 8 de oscuridad a y una intensidad lumínica de alrededor de 800 lux.

Imagen N°20. Temporizador.



Fuente: Autoras.

- La limpieza de las peceras se realiza lunes, miércoles y viernes, para retirar los caparazones de la *D. magna* y restos de comida encontrados en el fondo, (como se muestra en la imagen N° 21), claro está que a veces es necesario realizar esta limpieza diariamente según la necesidad.

Imagen N° 21. Limpieza de peceras.



Fuente: Autoras.

- El agua de las peceras con el cultivo es pasada a vasijas de color blanco para poder realizar la separación entre neonatos de 6 a 24 horas de nacidos y adultas (madres) en vasos plásticos color blanco, con ayuda de pipeta Pasteur de plástico. Esta separación es necesaria realizarla diariamente.
- El conteo de las madres se realiza para corroborar la cantidad de individuos presentes en las peceras, como se muestra en la imagen N°22.

Imagen N°22. Conteo de pulgas.



Fuente: Autoras.

- ☛ Las peceras se lavan con agua destilada y no se puede usar ningún tipo de detergente ya que esto puede influir sobre la *D. magna*.
- ☛ Se filtra el agua depositada en las vasijas blancas con un colador para recuperar el volumen de cada pecera.
- ☛ Con agua reconstituida (agua dura) nueva y fresca, se cambia una parte del volumen (1000ml) de las peceras todos los viernes.
- ☛ Se debe alimentar las *D. magna* una vez a la semana como mínimo, en nuestro caso se alimenta el lunes, miércoles y viernes teniendo en cuenta el número de algas contabilizado en la cámara de Neubauer. La alga que se utiliza es *Scenedesmus acutus* la cual fue donada por la Universidad Nacional de Colombia.

Imagen N° 23. Cultivo



Imagen N° 24. Pecera semana 2.



Fuente: Autoras.

6.3.8 Selección de neonatos de pruebas.

Diariamente se ejecutan la separación de los neonatos para realizar los ensayos de toxicidad, estos se pueden efectuar los días lunes, martes, miércoles, jueves y sábados según la demanda que exista, y teniendo en cuenta que los resultados de las pruebas se obtienen a las 48 horas. Los neonatos del día viernes son utilizados para la renovación del cultivo.

Los días viernes los neonatos son aprovechados para iniciar un nuevo cultivo cuando sea necesario.

6.4 Segunda fase.

6.4.1 Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad se realizaron a partir de concentraciones conocidas de dicromato de potasio y de los metales con los que se

realizó toda la investigación (aluminio y arsénico) y con vertimientos de la empresa Fundiciones Linares Ltda, esto con el fin de detectar, prevenir, controlar, reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre los organismos *Daphnia Magna* y de esta manera determinar la concentración letal media.

Imagen N° 25. Selección de neonatos



Fuente: Autoras.

Imagen N° 26. Pruebas.



Imagen N° 27. Pruebas cubiertas.



Fuente: Autoras.

Todas las pruebas se realizaron con neonatos de 6 a 24 horas de nacidos y se tuvieron bajo las mismas condiciones, como se muestra en la imagen N°25. (VER ANEXO E).

6.4.2 Preparación de soluciones

Una disolución no es más que la mezcla homogénea de dos o más sustancias. La especie que se encuentra en mayor proporción se conoce como disolvente (sustancia en la cual se disuelve otra) y la que se encuentra en menor proporción como solutos (sustancia que se disuelve en el disolvente), para que la mezcla y su concentración sea válida es pertinente que la solución sea totalmente homogénea.

$$\text{Solute} + \text{Disolvente} = \text{Solución}$$

Para las soluciones de dicromato de potasio se toma como base:

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/L}$$

$$1000 \text{ ppm} = 1 \text{ g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 / \text{L}$$

Para la realización de las soluciones tanto de aluminio como de arsénico se parte de una solución madre de 1000 ppm con agua reconstituida. Para la realización de las pruebas de toxicidad se elaboraron diez pruebas preliminares con concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10 mg/L tanto para el dicromato de potasio (pruebas de sensibilidad) como para el aluminio y el arsénico.

**Imagen N°28. Solución madre de Al.
Perkin Elmer Pure (1000 µg / mL)**



**Imagen N°29. Trióxido de As, PA.
R.A. Reactivo para análisis**



Fuente: Autoras.

Imagen N°30. Disoluciones de Al.



Imagen N° 31. Disoluciones As.



Fuente: Autoras.

Para las pruebas de toxicidad fue necesario preparar soluciones de concentraciones determinadas, a partir de una solución más concentrada. El volumen de una solución de concentración conocida se determina emplear otro volumen con una concentración menor, se razona que ambas soluciones tendrán el mismo peso de soluto, esto se llevó a cabo mediante la ecuación de dilución, como se muestra a continuación:

$$\text{Concentración}_1 \times \text{Volumen}_1 = \text{concentración}_2 \times \text{Volumen}_2,$$

En donde:

Concentración₁: concentración de la primera solución

Volumen₁: volumen de la primera solución

Concentración₂: concentración de la segunda solución

Volumen₂: volumen de la segunda solución

Las unidades que se trabajen deben ser las mismas para las dos soluciones.

6.4.3 Montaje de las pruebas de toxicidad (bioensayos)

Para un buen montaje de las pruebas de toxicidad es indispensable tener en cuenta:

Cuadro N° 7. Características en pruebas de bioensayos.

CARACTERÍSTICAS COMUNES EN PRUEBAS DE BIOENSAYOS			
Exposición de grupos de organismos:		Exposición a concentraciones graduadas del agente	
De la misma población en buenas condiciones físicas con aclimatación previa			
Mantenimiento de condiciones ambientales constantes y estandarizadas		Observación patológica de grupos control y tratados	
Observación de signos del efecto presentes		Análisis estadístico de resultados	
Grupos control adecuados		Medición y registro detallado de efectos biológicos en grupos control y tratados	

Fuente: Autoras.

Factores a considerar en el diseño de ensayos de toxicidad:

- ☛ Propiedades físico-químicas del contaminante
- ☛ Pureza química
- ☛ Presencia de impurezas
- ☛ Selección del organismo de prueba
- ☛ Variables ambientales
- ☛ Mantenimiento y manipulación de organismos de prueba
- ☛ Manipulación y almacenamiento de reactivos
- ☛ Espacio para el desarrollo de los ensayos

El laboratorio de bioensayos de la Universidad de La Salle, es uno de los factores de influencia más importantes sobre los ensayos de toxicidad. Este cuenta con equipamiento apropiado para realizar este tipo de pruebas. Ello implica que, además de los equipos necesarios para el control y mantenimiento de los cultivos, y para la realización óptima de las pruebas de toxicidad, el laboratorio cuenta con una infraestructura, con cuartos de preparación y almacenamiento de materiales y provisión de servicios (electricidad, gas, agua, filtrado de emisiones, ventilación, temperatura ambiente controlada) necesarios para cumplir los requerimientos de los ensayos a realizarse.

La asignación del espacio dentro del área de laboratorio evitó la contaminación de los ambientes, equipos, personal y sistema de prueba. En particular, la zona para el cultivo y mantenimiento de los organismos

está separada del área para preparación y conducción de las pruebas de toxicidad.

Todos los factores y características nombradas anteriormente, ayudan a realizar pruebas de toxicidad con resultados confiables. Los materiales que se utilizaron durante las pruebas son los siguientes:

- ☛ Pipetas volumétricas de 10 ml
- ☛ Pipeteador
- ☛ 120 Neonatos de 6 a 24 horas de nacidos por prueba.
- ☛ 24 tubos de ensayo en su respectiva gradilla
- ☛ Copas plásticas de 1 onza
- ☛ Soluciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)
- ☛ Sustancias de Aluminio y Arsénico
- ☛ Vertimientos de la industria tipo
- ☛ Bolsas de tela negra para cubrir la batería de ensayo

Durante las pruebas de sensibilidad y toxicidad se debe tomar un total de 120 neonatos, las pruebas se realizaron con 5 concentraciones diferentes, para cada concentración se efectuaron 4 réplicas. La solución control que se utilizó, era agua dura reconstituida y con esta también se realizaron cuatro replicas. Para cada una de las concentraciones se situaron 5 neonatos por vaso plástico de una onza con 4 réplicas, lo que quiere decir que se necesitaron 20 neonatos por concentración. Por concentración se agregó 10 mL, de igual manera se realizó con las réplicas. A continuación se cubren con las bolsas negras de tela para

evitar la luz directa sobre las pruebas para disminuir el margen de error en las pruebas, estas pruebas se obtienen después de 48 horas.

Después se realiza la lectura de las pruebas, teniendo en cuenta el número de organismos *Daphnia magna* muertos encontrados por concentración, reportando los datos obtenidos en el registro LB 001 “Registro de resultados por muestra analizada”.

Finalmente, para demostrar que el efecto de los tóxicos sobre los organismos expuestos se debía al efecto de las sustancias puras o al de los vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas, se realizó mediciones de los parámetros fisicoquímicos de control de forma aleatoria de una de las concentraciones.

6.5 Tercera Fase

6.5.1 Métodos estadísticos

Los métodos estadísticos nos permiten adquirir información de forma más sencilla y precisa, para este caso una muestra indicada que simbolice con precisión al total de la población, pero para llegar a esto se debe comenzar con información y datos acerca de la población y de los contaminantes he ir modificándolos basándose en los ensayos.

Para utilizar cualquier método estadístico se debe tener claro qué información y en qué cantidad se ha de adquirir y utilizar. Pero la base principal es determinar el número y tipo de la población que se va a

utilizar durante la investigación y de esta manera ir delimitando la información⁴⁰.

6.5.2 Diseño de experimentos

La secuencia, transcurso y seguimiento adecuado durante la investigación, aseguran y afianzan datos experimentales y de observación que permitan un análisis objetivo conduciendo a deducciones o supuestos válidos con respecto al problema establecido.

Se encuentran tres principios básicos del diseño de experimentos: reproducción o repetición, aleatorización y Control local.

Reproducción o repetición: Este es la reproducción o réplica del experimento básico. Este principio se aplica por que suministra una valoración al error experimental, entendiendo que a medida que aumentan las repeticiones se minimiza el margen de error y se logran datos más confiables que permiten resultados más precisos.

Aleatorización: El principio de aleatorización no se refiere al suministro de datos a través del azar o de forma aleatoria, por el contrario involucra la precisión con respecto al control de la muestra a estudiar, de manera que se tenga en cuenta la influencia de las variables. Esto permite que durante las investigaciones se cuantifique la influencia de estas variables al observarlas en los grupos de control.

⁴⁰ Ibid.

Control local: El Control local es indispensable para minimizar el margen de error experimental que puede encontrarse durante los ensayo⁴¹.

6.5.3 Establecimiento de la Relación Dosis – Efecto o Dosis – Respuesta

La relación Dosis – Efecto es la relación entre la concentración de un tóxico y la dimensión del efecto en un individuo, y La relación Dosis – respuesta es la concentración de un tóxico y la dimensión del efecto en una población, para ambos casos este efecto debe ser medible teniendo en cuenta que debe tener un valor de cero cuando la dosis es cero. Con esta relación se obtiene las variables que se van a aplicar en el modelo estadístico seleccionado (ANOVA) para determinar los valores de la variable *concentración de tóxico*, CL_{50}^{48} . El tipo de variable en la respuesta, condiciona el modelo a utilizar en el análisis⁴².

6.5.4 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza (ANOVA) es un instrumento estadístico clásico, de gran utilidad tanto en procesos industriales, para el control del mismo, como en laboratorios de análisis, para el control de métodos analíticos. Se encuentran grandes e importantes objetivos en la utilización del análisis de varianza: la comparación de múltiples

⁴¹ REYES ECHAVARRIA, Sara Guadalupe, Diseño de experimentos, red en línea disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos7/diex/diex.shtml>

⁴² CASTILLO MORALES, Gabriela, editora. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua, 2004.

columnas de datos, la estimación de los componentes de variación de un proceso, conocer diferencias o similitudes entre grupos de estudio en algunas variables en otras palabras se hace una comparación entre valores de un conjunto de datos numéricos y se determina si son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. Para emplear este método de análisis de varianza se requiere que el número de replicas por estudio sea superior a tres y que todos los ensayos tengan el mismo número de replicas. En el caso que las replicas sean menores de tres no se deberá proceder con una prueba hipótesis, precisamente porque el ANOVA es una técnica general que puede ser utilizado para probar la hipótesis de que los medios entre dos o más grupos son iguales, bajo el supuesto de que las poblaciones muestreadas se distribuyen normalmente.

Para la investigación que se ha realizado se utilizó un único factor (las concentraciones de contaminante) que es una variable de tratamiento independientes cuyos valores son controlados y variada por el experimentador. Las concentraciones de los contaminantes y el análisis de varianza que se va a utilizar para analizar el efecto de las concentraciones se llama de una sola vía o de un factor ANOVA.

Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

1. Cada conjunto de datos debe ser independiente del resto.
2. Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
3. Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa⁴³.

Procedimiento de análisis de varianza:

La hipótesis nula: no hay diferencia en la población de los medios de los distintos niveles del factor A (el único factor). Las medias de las poblaciones son iguales.

Hipótesis alterna: al menos una de las medias es diferente. Los medios no son los mismos.

6.5.5 Bases del análisis de varianza

Supónganse k muestras aleatorias independientes, de tamaño n , extraídas de una única población normal. A partir de ellas existen dos maneras independientes de estimar la varianza de la población s^2 .

- 1) Una llamada varianza dentro de los grupos (ya que sólo contribuye a ella la varianza dentro de las muestras), o varianza de error, o cuadrados medios del error, y habitualmente

⁴³ ILEANAM, la estadística de agropecuario 10 preguntas 10 respuestas. Disponible en internet: <http://www.monografias.com/trabajos19/estadistica-agropecuario/estadistica-agropecuarios.html#cuadodebo>

representada por MSE (Mean Square Error) o MSW (Mean Square Within) que se calcula como la media de las k varianzas muestrales (cada varianza muestral es un estimador centrado de s^2 y la media de k estimadores centrados es también un estimador centrado y más eficiente que todos ellos). MSE es un cociente: al numerador se le llama suma de cuadrados del error y se representa por SSE y al denominador grados de libertad por ser los términos independientes de la suma de cuadrados.

- 2) Otra llamada varianza entre grupos (sólo contribuye a ella la varianza entre las distintas muestras), o varianza de los tratamientos, o cuadrados medios de los tratamientos y representada por MSA o MSB (Mean Square Between). Se calcula a partir de la varianza de las medias muestrales y es también un cociente; al numerador se le llama suma de cuadrados de los tratamientos (se le representa por SSA) y al denominador $(k-1)$ grados de libertad.

MSA y MSE, estiman la varianza poblacional en la hipótesis de que las k muestras provengan de la misma población. La distribución muestral del cociente de dos estimaciones independientes de la varianza de una población normal es una F con los grados de libertad correspondientes al numerador y denominador respectivamente, por lo tanto se puede contrastar dicha hipótesis usando esa distribución.

Con base a este contraste se rechaza la hipótesis de que MSE y MSA estimen la misma varianza, se puede rechazar la hipótesis de que las k medias provengan de una misma población.

Aceptando que las muestras provengan de poblaciones con la misma varianza, este rechazo implica que las medias poblacionales son distintas, de modo que con un único contraste se contrasta la igualdad de k medias.

Existe una tercera manera de estimar la varianza de la población, aunque no es independiente de las anteriores. Si se consideran las kn observaciones como una única muestra, su varianza muestra también es un estimador centrado de s^2 :

Se suele representar por MST, se le denomina varianza total o cuadrados medios totales, es también un cociente y al numerador se le llama suma de cuadrados total y se representa por SST, y el denominador (kn -1) grados de libertad.

Los resultados de un ANOVA se suelen representar en una tabla como la siguiente:

Tabla N° 14. Formato ANOVA

Fuente de variación	G.L.	SS	MS	F
Entre grupos Tratamientos	k-1	SSA	SSA /(k-1)	MSA /MSE
Dentro Error	(n-1)k	SSE	SSE /k(n-1)	
Total	kn-1	SST		

Fuente: Libro Métodos Multivariantes en Bioestadística (1996)

Donde:

K: Muestras aleatorias independientes

n: Tamaño muestra

MSE: Varianza de error

SSE: Suma de cuadrados del error

MSA: Varianza de los tratamientos

GL: Grados de Libertad

SS: Suma de Cuadrados

MS: Promedio de Cuadrados

F: Realiza el contraste de la hipótesis de medias iguales. *F* se usa para realizar el contraste de la hipótesis de medias iguales. La región crítica para dicho contraste es $F > F_{\alpha(k-1, (n-1)k)}^{44}$.

⁴⁴ PEREZ DE VARGA, Abaira, Métodos Multivariantes en Bioestadística (1996). Fuente: http://www.hrc.es/bioest/Anova_2.html

6.5.6 Modelos de análisis de varianza

Modelo I o de efectos en el que la H_1 supone que las k muestras son muestras de k poblaciones distintas y fijas.

Modelo II o de efectos aleatorios en el que se supone que las k muestras, se han seleccionado aleatoriamente de un conjunto de $m > k$ poblaciones.

Resumiendo diremos:

Si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{teórico}} H_1$ (Existen diferencias entre los tratamientos)

Si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{teórico}} H_0$ (No existen diferencias entre los tratamientos)⁴⁵

6.5.7 Análisis de regresión y análisis PROBIT

El análisis de regresión es un modelo estadístico con el que podemos pronosticar, representar y valorar la relación entre una variable dada, que es la variable dependiente y una o más variables llamadas variables independientes. Los modelos del Análisis de regresión se utilizan para ayudarnos a predecir el valor de una variable desconocida, con otras variables con valores puedan ser predeterminados. La primera etapa del proceso es identificar la variable que debemos predecir (la variable relacionada). Entonces realizamos el análisis de regresión múltiple, centrándose en las variables que deseamos utilizar como predictores

⁴⁵ Lbid

(variables explicativas). El análisis de regresión múltiple entonces identificará la relación entre la variable relacionada y las variables explicativas. Entonces, finalmente esto se presenta como modelo (fórmula).

El análisis Probit ayuda a estimar la magnitud el impacto o efecto. La variable Probit es la medida del porcentaje de población vulnerable sometida a un fenómeno de intensidad, que recibe un daño determinado, en otras palabras es la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad de una población específica ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. La vulnerabilidad de la población específica se manifiesta como el número de individuos que alcanzan a afectarse con un indudable nivel de perjuicio procedente de un factor externo.

El análisis Probit normalmente se utiliza para el cálculo de los $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$. Generalmente para las pruebas de toxicidad aguda, encontramos las siguientes condiciones:

- ☛ 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 figura 5.1); de esta manera la distribución de p vs. X será de tipo normal. Posteriormente, mediante el programa 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:

$$X_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^{X_5} \quad 46$$

⁴⁶ DÍAZ BÁEZ, María Consuelo, PICA GRANADOS, Yolanda RONCO, Alicia. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Disponible en Internet: http://www.idrc.ca/openbooks/147-7/#page_65gs\bioensayos\Capítulo 5_ Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad Internacional

6.7 Pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Las pruebas de sensibilidad con el toxico de referencia, dicromato de potasio, pretenden determinar la toxicidad sobre la especie *Daphnia Magna* durante 48 horas, con el propósito de estudiar la susceptibilidad de estos organismos a diferentes concentraciones del compuesto.

Esto último se realiza con el fin de establecer la sensibilidad de las especies, frente a un tóxico de referencia. Esto último es con el fin de asegurar que la respuesta de los organismos frente a los tóxicos, es precisamente por estos y no por las variaciones de sensibilidad de los organismos. La precisión y exactitud se obtiene utilizando un químico llamado “tóxico de referencia” que permite precisar un rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados generados por el bioensayo.

Con el fin de establecer si la sensibilidad del cultivo de *Daphnia Magna* es apropiada antes de realizar las pruebas con los tóxicos, valorar el efecto de los organismos ante la exposición al tóxico de referencia. La concentración en la cual se produce la muerte del 50% de la población de neonatos (concentración letal media o CL_{50}) deberá encontrarse dentro del intervalos establecido. El rango o intervalos se debe obtener después de realizar 5 pruebas con el toxico de referencia.

Para llevar a cabo estos ensayos se empleó una serie de diluciones 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 ppm, lo cual permitió establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del tóxico de referencia.

Para que los datos obtenidos sean realmente validos y confiables se debe tener en cuenta las siguientes condiciones fisicoquímicas tanto del medio en el cual se encuentran los organismos, como las condiciones de los organismos durante los bioensayos de toxicidad agua:

- Los neonatos utilizados tienen entre 6 y 24 horas de nacidos
- No se debe suministrar alimento a los neonatos que van a ser utilizados durante las pruebas
- Los ensayos deben encontrarse a una temperatura entre $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- La dureza del agua dura reconstituida, utilizada para las diluciones de las concentraciones corresponde a un rango entre 160 y 180 mg /L CaCO_3 .
- El pH del agua reconstituida corresponde a un rango entre 7 - 8
- Las copas donde se realizaron las pruebas son blancas de una onza
- En cada copa se encuentra 5 organismos, por concentración es un total de 20, pues se realizan 4 replicas
- El volumen utilizado por concentración y en cada replica fue de 10 mL.

- Las pruebas de sensibilidad y toxicidad tiene una duración de 48 horas
- La valoración de la concentración letal media CL_{50}^{48} para los organismos *Daphnia magna* se estimó mediante el método Probit

Tabla N° 15. Pruebas definitivas de dicromato.

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Réplicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	1	0	0	2	15
1.0 ppm	2	3	2	2	45
1.5 ppm	4	4	4	3	75
2.0 ppm	5	4	5	5	95

Fuente: Autoras.

Con la realización de las pruebas preliminares se obtuvo el rango en el cual se realizaron las pruebas definitivas como se muestra en la tabla N° 15. En esta tabla se presentan los valores de mortalidad causados por las diferentes concentraciones a las cuales han estado expuestos los organismos *Daphnia magna*.

6.8 Pruebas preliminares de toxicidad con Aluminio y Arsénico

6.8.1 Pruebas preliminares de toxicidad con Aluminio

Para la realización adecuada de estas pruebas de toxicidad se realizó el control de los siguientes parámetros: pH, temperatura, concentración de oxígeno y dureza.

Las pruebas preliminares se ejecutaron utilizando rangos entre 10 y 0.001 mg/L de aluminio como se muestra en la tabla N°16, con una solución madre de 1000 ppm. Consecutivamente con los datos de los rangos obtenidos se empezó a delimitar el rango de concentraciones que dependía de la mortalidad encontrada en los organismos.

Tabla N°16. Pruebas preliminares de aluminio.

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001 ppm	0	0	0	0	0
0.01 ppm	0	0	0	0	0
0.1ppm	0	0	0	0	0
1 ppm	1	2	1	1	25
10 ppm	5	5	5	5	100

Fuente: Autoras.

Después de realizar varias pruebas preliminares (10 pruebas) y encontrar los rangos óptimos para la determinación de la concentración letal media, se establecieron los rangos con los cuales se ejecutaron las pruebas definitivas para este tóxico. Las concentraciones obtenidas para las pruebas definitivas fueron 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.5 ppm.

6.8.2 Pruebas preliminares de toxicidad con Arsénico

Este bioensayo es de tipo estático, sin renovación de la solución de prueba, así como todos los bioensayos realizados durante la investigación, con una duración total de 48 horas. Se realiza una evaluación preliminar que consiente en decretar si las concentraciones

analizadas genera toxicidad aguda en los organismos de prueba *Daphnia Magna*, pues como ya se ha mencionado anteriormente la intoxicación aguda es un efecto que se expresa en tiempos de exposición cortos (48 horas o menos, para invertebrados menores como es el caso de la *Daphnia magna*), y que conduce a la muerte o paralización de los individuos.

De acuerdo a esta prueba, en el caso de productos químicos se puede concluir *a priori* si el tóxico utilizado produce o no produce efectos tóxicos agudos, ya que varios protocolos internacionales consideran un límite de prueba máximo de 100 mg/L para determinar que un producto o sustancia produce efectos tóxicos agudos.

Si la muestra ensayada genera respuesta de intoxicación aguda, esto es, si el análisis anterior resulta positivo (con mas del 10% de mortalidad en la muestra), entonces esta parte del estudio tiene como intención precisar el intervalo de concentraciones o diluciones entre los que se puede ubicar la CL_{50} . Las pruebas preliminares se realizaron utilizando rangos entre 10 y 0.001 mg/L como se muestra en la tabla N° 17. Para precisar el rango que se utilizó en las pruebas definitivas fue necesario tomar como base los datos obtenidos de las pruebas preliminares.

Tabla N°17. Pruebas preliminares de arsénico.

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.0001	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	1	2	2	1	30
0.1	3	1	3	3	50
1	4	3	4	3	70

Fuente: Autoras.

Para la elaboración de las pruebas preliminares de toxicidad con arsénico se elaboró el mismo proceso que para las pruebas de aluminio, basándonos en los protocolos establecidos por CETESB.

6.9 Pruebas definitivas con Aluminio y Arsénico

Previo al bioensayo definitivo se realizaron los ensayos preliminares para determinar el rango de concentraciones que generan respuestas con y sin efecto letal. Las pruebas definitivas se efectuaron con 5 concentraciones en progresión geométrica más un control o blanco, con agua dura reconstituida.

De acuerdo al análisis anterior, este bioensayo permite establecer el cuadro de mortalidades a 48 horas de observación, que conduce al cálculo de la CL_{50} y su correspondiente intervalo de confianza.

6.9.1 Pruebas definitivas con Aluminio

Las pruebas definitivas de aluminio se realizaron utilizando el mismo protocolo que las otras pruebas de toxicidad, tanto para las preliminares como para las definitivas, con la única diferencia que estas últimas se realizan con un intervalo más exacto para la determinación de la concentración letal media.

Con base en los datos obtenidos de las pruebas preliminares con aluminio, se obtiene el rango de toxicidad, el cual permite establecer unos intervalos más exactos de concentraciones para obtener el resultado que conduce a la determinación de la concentración letal media. Esto se realizó con cinco concentraciones, las cuales permiten verificar un porcentaje de mortalidad entre 0-100 % como se muestra en la tabla N° 18 (ANEXO A).

Tabla N°18. Pruebas definitivas de aluminio.

Concentración nominal	N° de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1 ppm	0	0	0	0	0
0.5 ppm	3	3	1	0	35
1.0 ppm	4	2	3	3	60
2.0 ppm	3	4	4	4	75
2.5 ppm	5	5	5	4	95

Fuente: Autoras.

Las concentraciones utilizadas durante las pruebas definitivas de toxicidad por aluminio son las siguientes: 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.5 ppm, con estos valores se realizaron todas las pruebas y los valores obtenidos fueron los utilizados en el programa de Probit y ANOVA.

Los pasos a seguir para la realización de las pruebas definitivas están establecidas en la metodología descrita en el protocolo LB05 “Pruebas de Toxicidad” obteniendo la concentración letal media (CL_{50}^{48}) de aluminio con sus límites de confianza manejando la metodología descrita en el protocolo LB06 Análisis de Regresión y Análisis Probit y variando los resultados por medio de análisis de varianza (ANOVA), cuya metodología esta descrita en el protocolo LB07 Análisis de varianza. Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación del grupo de Bioensayos y se encuentran disponibles en la tesis de Bernal y Rojas (2007) y con el docente Químico Industrial Pedro Miguel Escobar Malaver, para su consulta.

6.9.2 Pruebas definitivas con Arsénico

Con base en los datos obtenidos de las pruebas preliminares con arsénico, se obtiene el rango de toxicidad, el cual permitió establecer unos intervalos más exactos de concentraciones para obtener el resultado que conduce a la determinación de la concentración letal media. Esto se realizó con cinco concentraciones, las cuales permiten

verificar un porcentaje de mortalidad entre 0-100 % como se muestra en la tabla N° 19 (ANEXO A).

La evaluación de la reacción de la pulga acuática *Daphnia magna* frente a las concentraciones con las que se realizaron las pruebas definitivas para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}^{48}), da como resultado:

Tabla N°19. Pruebas definitivas de arsénico.

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	1	0	0	5
0.01	0	1	2	1	20
0.1	2	3	2	2	45
1.0	4	4	3	4	75
1.5	5	5	4	5	95

Fuente: Autoras.

Las concentraciones utilizadas durante las pruebas definitivas de toxicidad por arsénico son las siguientes: 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 y 1.5 ppm, con estos valores se realizaron todas las pruebas y los valores obtenidos fueron los utilizados en el programa de Probit y ANOVA.

Dentro de las 5 concentraciones que se manejó la que mostró mayor toxicidad en este organismo de prueba fue la concentración de 1.5 ppm que para el ejemplo mostrado representa un porcentaje de mortalidad de 95%.

Los pasos a seguir para la realización de las pruebas definitivas están establecidas en la metodología descrita en el protocolo LB05 “Pruebas de Toxicidad” obteniendo la concentración letal media (CL_{50}^{48}) de arsénico con sus límites de confianza manejando la metodología descrita en el protocolo LB06 Análisis de Regresión y Análisis Probit y variando los resultados por medio de análisis de varianza (ANOVA), cuya metodología esta descrita en el protocolo LB07 Análisis de varianza. Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación del grupo de Bioensayos y se encuentran disponibles en la tesis de Bernal y Rojas (2007) y con el docente Químico Industrial Pedro Miguel Escobar Malaver, para su consulta.

6.10 Toma y preservación de muestras para los ensayos de toxicidad.

La recolección de las muestras ambientales se realizó en recipientes plástico de dos litros (2.0) de capacidad, tomando una muestra por metal.

El vertimiento de aluminio se tomó de una empresa galvánica durante el proceso de enfriamiento de la fundición de aluminio.

Ya que no fue posible encontrar una industria que empleara en este momento arsénico para su proceso productivo se decidió por medio del profesor Pedro Miguel Escobar, director de tesis, realizar un vertimiento sintético en el laboratorio de bioensayos, con el fin de simular un

vertimiento industrial en el cual utilicen arsénico y de esta manera realizar las pruebas.

El vertimiento sintético se realizó utilizando el agua residual de la Universidad de La Salle y adicionándole una concentración de arsénico que se determinó a partir de las pruebas definitivas realizadas con arsénico.

6.11 Tipo de análisis fisicoquímicos de los vertimientos.

A las muestras se le realizaron los análisis fisicoquímicos que se muestran a continuación:

Cuadro N°8. Análisis fisicoquímicos.

PARAMETRO	METODO Y LUGAR DE ANALISIS
Aluminio	Laboratorio ANALQUIM, ubicado en la Calle 73 # 36-09 barrio 7 de agosto a través del método de absorción atómica y utilizando el Standard Methods Edición 19, 1995, SM 3111B-Ag.
Arsénico	Laboratorio ANALQUIM, ubicado en la Calle 73 # 36-09 barrio 7 de agosto a través del método de absorción atómica y utilizando el Standard Methods Edición 19, 1995, SM 3111B-Ag.
Sólidos Totales	Análisis fisicoquímico. Con 100 mL de la muestra utilizándose el método 2540B. Sólidos totales a 103 – 105°C del estándar Methods, versión 19 AWWA en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.
DQO	La muestra fue preservada con Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) hasta obtener un pH ≥ 2. Se utilizó el método

	de reciclo cerrado, la lectura se realizó en el espectrofotómetro (Hach), Standard Methods Edición 19, 1995, 5220D- 2B. Se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.
Dureza	Se utilizó el método titulométrico de EDTA Standard Methods Edición 19, 1995, SM 2340-C. El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.
Conductividad	Se utilizó el método Standard Methods Edición 19, 1995, SM 2510-B. El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.
pH	Se utilizó el método Standard Methods Edición 19, 1995, SM 4500H. $\pm B$. El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.

Fuente: Autoras.

6.11.1 Condiciones fisicoquímicas

Las pruebas finales tienen la misma metodología que las pruebas preliminares. Se debe proceder a realizar la lectura de los organismos muertos después de las 48 horas siguientes a la siembra, adicionalmente se debe procede a medir el oxígeno disuelto, la dureza y el pH, en las dos concentraciones extremo de la batería, para corroborar que el efecto tóxico fue producido por un agente químico, en este caso el metal, y no por las constantes que se manejan en la prueba toxicológica.

De igual manera las pruebas definitivas son consideradas válidas según metodología CETESB, dentro de las siguientes condiciones:

- ☛ La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y preferiblemente no más que el 5%.
- ☛ Si la mortalidad en el control sobrepasa el 10%, esta prueba se considera no representativa, se descarta y se requiere la repetición de la misma.
- ☛ La concentración de oxígeno disuelto en las soluciones test durante el transcurso del ensayo debe ser mayor a 4mg/L.

6.11.2 Resultados esperados

El valor 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}^{48} con sus respectivos límites de confianza para ello se realizó el protocolo LB 06 “Análisis de regresión y Análisis Probit”. Después de tener este resultado se procede a realizar el análisis de varianza según el protocolo LB07 “Análisis de varianza” para comprobar que a diferentes concentraciones de la sustancia pura o vertimiento produce un diferente efecto en todos los organismos.

Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación de bioensayos y se encuentran disponibles en la tesis de Bernal y Rojas

(2007) y con el profesor Químico industrial Pedro Miguel Escobar Malaver, para su consulta.

6.12 Pruebas definitivas con el vertimiento de aluminio y arsénico.

Para lograr valores de 0 a 100% de mortalidad en estas pruebas definitivas se inicia con la preparación de soluciones del vertimiento diluidas con agua reconstituida manejando diferentes porcentajes de volumen de muestra.

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

6.13 Índice toxicológico.

Para el cálculo del índice toxicológico se contó con la información caudal del vertimiento industrial, Concentración Letal Media (CL_{50}^{48}) del vertimiento y carga tóxica del efluente.

Para el cálculo de la carga tóxica se utilizó la siguiente ecuación:

expresada en unidades tóxicas (UT).

$$c\ arg\ a\ t\acute{o}xica\ (UT) = \frac{100}{CL_{50}} * \bar{Q}$$

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

En donde:

- ☛ **CL₅₀:** Concentración letal media (Concentración del efluente que produjo la mortalidad del 50% de los organismos expuestos en un período de 48 horas).
- ☛ **Q:** Caudal promedio del efluente, el cual varía según la producción de la empresa evaluada.

6.13.1 Índice toxicológico del vertimiento.

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

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

Tabla N°20. Rangos de índices toxicológicos

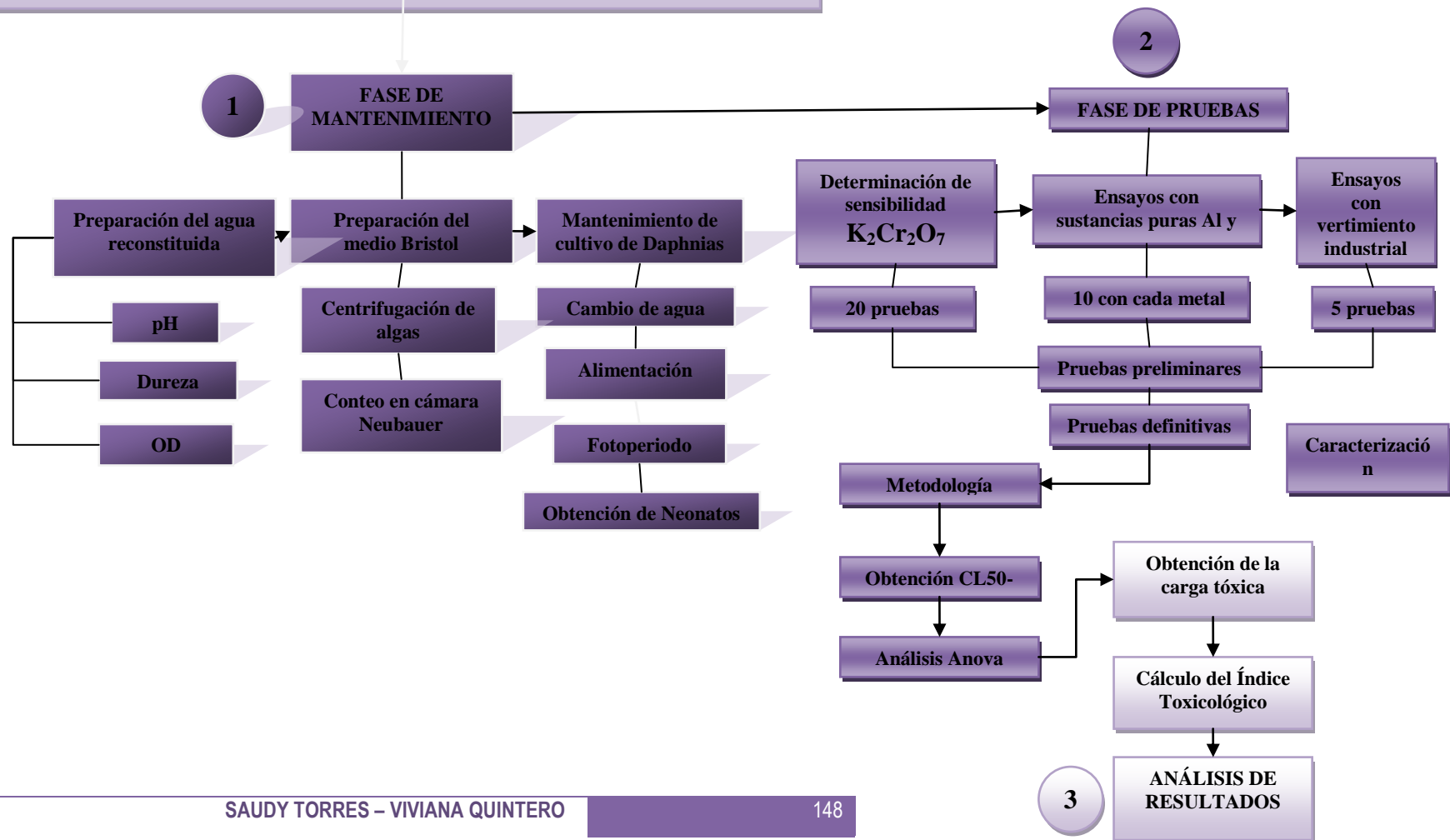
Rangos	Carga Tóxica
1 -1.99	Despreciable
2 - 2.99	Reducida
3 -3.99	Moderada
4 - 4.99	Considerable
> 5	Elevada

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

En el esquema N°2, se muestra la fase de mantenimiento, fase de pruebas de toxicidad y fase estadística, mostrando la secuencia de las partes de cada fase durante el desarrollo del proyecto

Esquema N°2. Fases del proyecto

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{50}^{48} DE ALUMINIO Y ARSENICO MEDIANTE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE *Daphnia Magna*.



7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de bioensayos de la Universidad de La Salle, con las condiciones fisicoquímicas controladas como son el pH, dureza, oxígeno disuelto, luz, temperatura, espacios separados para el mantenimiento de los cultivos, entre otros.

En esta etapa se dispone ya de un conjunto de datos organizados elaborados en las etapas anteriores. Los datos relevantes fueron la base principal para la toma de decisiones, como fue el caso de los datos obtenidos a través de las pruebas preliminares. Toda la información recolectada durante la investigación nos permite en esta fase verificar o refutar nuestra hipótesis, hacer interpretaciones de los resultados y llegar a conclusiones.

Un aspecto muy importante en el desarrollo de los bioensayos de toxicidad ha sido la reproducibilidad de estas pruebas, lo que consiste en obtener resultados similares con la misma sustancia química. Esto requiere que las pruebas sean estandarizadas de acuerdo a protocolos definidos. Los lineamientos generales presentados en este trabajo de investigación se desarrollaron a partir del documento “Manual Práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia*”, publicado por la Universidad e La Salle.

7.1 Ensayos de sensibilidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y obtención de la concentración letal media CI_{50}^{48} .

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad al dicromato de potasio sobre la *Daphnia magna* se muestran en la tabla 21. En el laboratorio de bioensayos de La Universidad de La Salle, se han llevado a cabo diversos bioensayos de toxicidad utilizando cultivos mantenidos en laboratorio, a las que se les añadieron distintas dosis de dicromato de potasio, un tóxico de referencia utilizado rutinariamente. Se encontraron diferencias poco significativas entre las pruebas realizadas con el químico de referencia.

Tabla N°21. Concentración de dicromato.

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				Total	% mortalidad
Replicas	1	2	3	4		
Blanco	0	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0	0
0.8 ppm	1	0	1	2	4/20	20
1.0 ppm	2	3	2	3	10/20	50
1.5 ppm	4	3	2	3	12/20	60
2.0 ppm	5	5	5	5	20/20	100

Fuente: Autoras.

La tabla N°21 es un ejemplo claro de los datos obtenidos durante las pruebas realizadas con el químico de referencia “Dicromato de potasio”.

Previo al estudio de las muestras fue necesario realizar un bioensayo con el tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) para comprobar la normal sensibilidad de los organismos de prueba.

En la anterior tabla se observa que en la concentración de 1.0 ppm existe un porcentaje de mortalidad de 50% con una mortalidad de 10 organismos *Daphnias magnas* muertas en un periodo de 48 horas, lo que nos da una idea, de el valor en donde se encuentra la concentración letal media CL_{50}^{48} , dato que se comprueba por medio del programa estadístico Probit. En la tabla N° 22 se presentan los valores obtenidos con el programa:

Tabla N°22. Datos Probit con dicromato de potasio.

FECHA	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
09/NOV/2009	1,1101	0,9587	1,2734
09/NOV/2009	1,0143	0,8304	1,2117
09/NOV/2009	1,2175	1,0439	1,4225
10/NOV/2009	1,0113	0,8536	1,1614
10/NOV/2009	0,9347	0,7688	1,1042
10/NOV/2009	1,0557	0,8824	1,2441
11/NOV/2009	0,8976	0,7377	1,0553
11/NOV/2009	0,9322	0,7570	1,1066
11/NOV/2009	1,0312	1,8741	1,1824
17/NOV/2009	0,9919	0,8031	1,1934
17/NOV/2009	0,9618	0,8230	1,0899
17/NOV/2009	1,0312	0,8741	1,1824
18/NOV/2009	1,0071	0,8476	1,1606
18/NOV/2009	0,8717	0,6995	1,0372
18/NOV/2009	1,0157	0,8363	1,2058
23/NOV/2009	0,9827	0,8229	1,1380
23/NOV/2009	0,9164	0,7780	1,0470
23/NOV/2009	1,0157	0,8363	1,2058

24/NOV/2009	0,9684	0,8110	1,1162
24/NOV/2009	0,9618	0,8230	1,0899
PROMEDIO	0,9964	0,8830	1,1613

Fuente Autoras.

Con estas pruebas se evidencia que la *Daphnia magna* es afectada por el tóxico y no por factores como la aplicación metodológica, pues el promedio CL_{50}^{48} fue de 0.9964 y todos los valores se encontraron en rangos muy cercanos que indica que los datos de dicromato de potasio son confiables.

Datos obtenidos fueron:

CL_{50}^{48} : 0,9964 mg/L

Intervalo de confianza: 95 %

Límite inferior promedio: 0,8830 mg/L

Límite superior promedio: 1,1613 mg/L

Los resultados obtenidos durante la investigación, se analizaron utilizando un método paramétrico para el cálculo de los valores de la concentración letal media (CL_{50}^{48}) con los individuos *Daphnia magna* y su intervalo de confianza mediante el programa estadístico Probit (US EPA, 1988).

A continuación se muestran los valores de CL_{50-48} con dicromato de potasio en *Daphnia magna* en otros países.

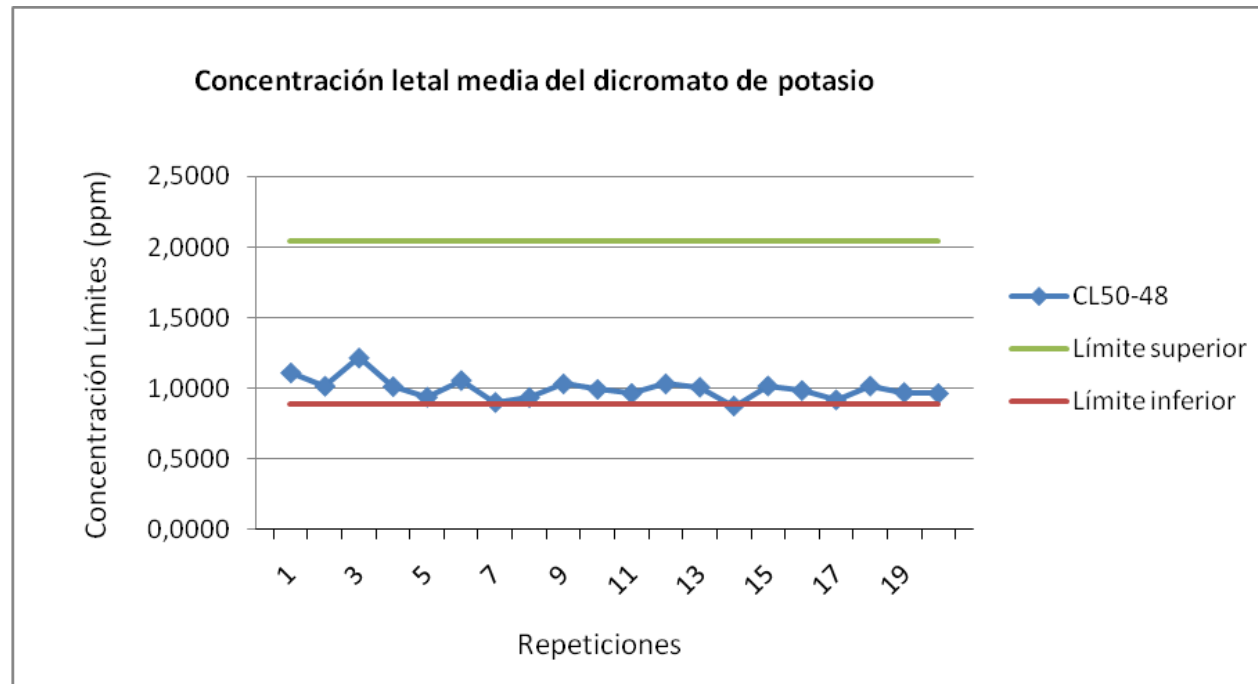
Tabla 23: Valores internacionales de CL_{50-48} en *Daphnia magna* con dicromato de potasio.

CL_{50-48} (ppm)	País	Autor/ Entidad	Documento
1,2	EEUU	Haley, M.V, Checkai,R.T.;kurnas , C.W.;Wentsel. R.S	Toxicity determination of explosive contaminated soil leachates to <i>Daphnia magna</i> using adapted toxicity characteristic leaching procedure.
0,9 - 2	Honduras	CESCCO (centro de estudios y control de contaminantes.	estudios de efluentes industriales

Fuente: Autoras.

Los valores de sensibilidad hallados en éste proyecto están dentro de los rangos de los datos internacionales encontrados.

Gráfica N° 1. Concentración letal media con dicromato de potasio.



Fuente: Autoras.

La gráfica N°1 permite observar el comportamiento de la *Daphnia magna* frente al tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), esto quiere decir que la sensibilidad se mantiene en los límites durante todo el desarrollo del proyecto, estos resultados se obtuvieron por las condiciones óptimas en las que se encontraba el cultivo.

En la tabla N° 24 se muestran los valores obtenidos durante el desarrollo de otras investigaciones realizadas en la Universidad de la Salle con *Daphnia Magna* durante las pruebas de sensibilidad con Dicromato de Potasio.

Tabla N°24. Comparación con otros proyectos.

Año	CL_{50}^{48} (ppm)	Referencia
2008	1.0925	GÁMEZ C. Y RAMÍREZ E.
2008	1.3723	ÁLVAREZ M. Y MONJE L.
2008	1.0540	SIERRA M. Y ZARATE A.
2010	0.9964	TORRES S. Y QUINTERO V.

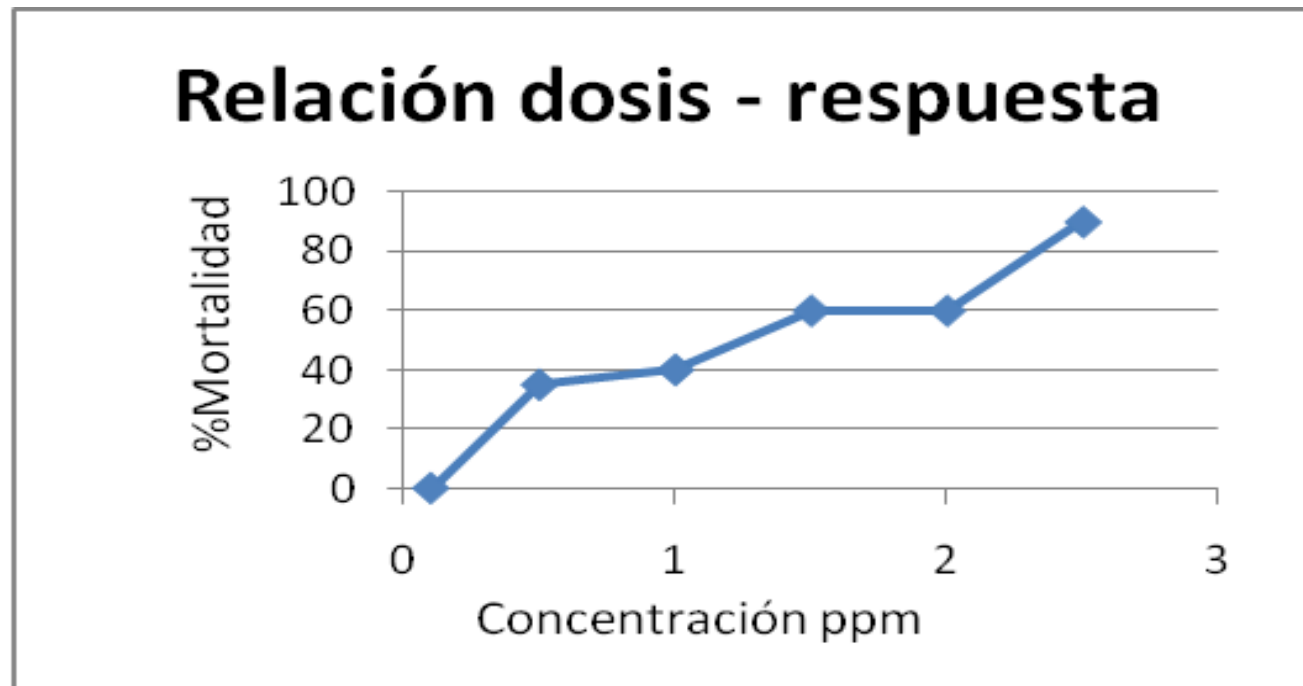
Fuente: Autoras

Los valores obtenidos de CL_{50}^{48} en el desarrollo de este proyecto muestran diferencias poco significativas con relación a investigaciones realizadas en la Universidad, manteniendo un rango con una diferencia máxima de 0.3 ppm en el rango de sensibilidad.

7.2 Obtención de la concentración letal media en ensayos con el tóxico aluminio.

Con el empleo de esta prueba se demuestra el grado de toxicidad del químico de prueba aluminio siendo estimado por la medición o cuantificación de la mortalidad de los organismos expuestos a concentraciones definidas anteriormente. Se observó que el porcentaje de mortalidad de las *Daphnia Magna* expuestas a las concentraciones de aluminio (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5) fue del 50%. Los resultados del bioensayo selectivo se muestran en la gráfica N°2 (gráfica de concentración vs mortalidad).

Gráfica N°2. Concentración vs %mortalidad



Fuente: Autoras.

La gráfica N° 2 de concentración – respuesta (concentración vs. porcentaje de mortalidad) demuestra la importancia que tiene el control de vertimientos para esta clase organismos, pues se comprueba que a pesar que las concentraciones trabajadas son bajas pueden afectar de gran manera esta población y poblaciones similares.

Los resultados mostraron que para las especies de las pulgas acuáticas *Daphnia Magna*, la concentración mínima con la cual se encuentra efectos de mortalidad es con 0.1 ppm como se demuestra en la curva concentración-respuesta. Como puede observarse, la mortalidad aumenta con el incremento de la concentración.

Al comparar el porcentaje de mortalidad durante las diferentes pruebas realizadas con aluminio tomando la misma concentración, no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Esto podría deberse al control fisicoquímico en el mantenimiento de los cultivos durante toda la investigación.

El análisis estadístico se realizó a través del método Probit, cuyo procedimiento se describe en el protocolo de bioensayos LB06 facilitados por la facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle, dándonos un margen de confiabilidad del 95%.

Con ayuda del software Probit determinamos la concentración letal media dando como resultado lo siguiente:

Tabla N°25. Datos Probit con aluminio.

FECHA	CL50-48	Limite inferior	Limite superior
15/02/2010	0,9897	0,6774	1,4224
15/02/2010	0,9012	0,6589	1,1704
15/02/2010	0,7182	0,5076	0,9528
16/02/2010	0,8890	0,6274	1,2033
16/02/2010	0,7223	0,5144	0,9679
16/02/2010	0,8469	0,5786	1,1770
17/02/2010	1,0520	0,7915	1,3409
17/02/2010	0,9074	0,6575	1,2081
17/02/2010	0,8147	0,5539	1,1310
17/02/2010	0,7528	0,5109	1,0363
PROMEDIO	0,8594	0,6078	1,1610

Fuente: Autoras.

El método Probit muestra el límite superior e inferior, de igual forma la concentración letal media (CL_{50}^{48}) durante 48 horas, dando para la *Daphnia Magna* los siguientes resultados:

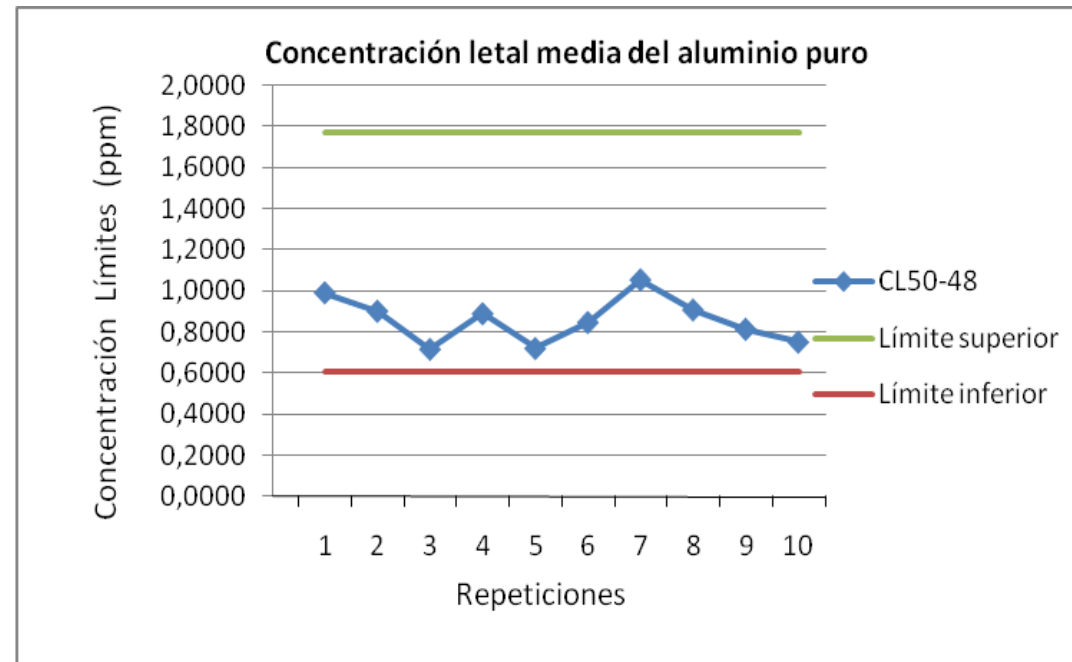
CL_{50}^{48} : 0,8594 mg/L

Intervalo de confianza: 95 %

Límite inferior promedio: 0,6078 mg/L

Límite superior promedio: 1,1610 mg/L

Gráfica N°3. Concentración letal media del aluminio



Fuente: Autoras.

En la gráfica N°3, se muestra el comportamiento de la *Daphnia Magna* frente al aluminio, presentando como límite inferior promedio un valor de 0.6078 ppm y límite superior promedio de 1.1610 ppm. Realizadas diez (10) pruebas confiables y en rangos más reducidos se obtuvo una concentración Letal Media CL_{50}^{48} de 0.8594 ppm donde la *D. magna* muestra su respuesta al tóxico aluminio.

Con estas pruebas se comprueba que la *Daphnia magna* es afectada por el tóxico y no por otros factores ó fallas metodológicas en la aplicación del método, determinando el rango de sensibilidad frente al tiempo de exposición.

Los datos obtenidos de CL_{50}^{48} con el programa Probit y los promedios de límites inferior y superior se realizó la gráfica N° 3 con el cual se puede ver que la CL_{50}^{48} determinada si está entre los límites, indicando la veracidad de los resultados.

7.4 Análisis de varianza de Aluminio con la sustancia pura.

La metodología a seguir para lograr un análisis de varianza adecuado fue seleccionada del protocolo LB07 “Análisis de Varianza”, que se encuentra en el Laboratorio de Bioensayos, Facultad de Ingeniería Ambiental.

El procedimiento a seguir es postular una hipótesis nula y una hipótesis de alternativas para la realización de la ANOVA de la siguiente manera:

Tabla N°26. Análisis ANOVA con aluminio.

Concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	4	4	4	17	4,25
2	3	4	4	3	14	2,25
1	3	2	3	2	10	2,5
0,5	2	1	1	2	6	1,5
0,1	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	48	10,75

Fuente: LB07 Análisis de varianza.

tratamientos	6
observaciones	4
Total	24

Fuente: LB07

Tabla N° 27. Resultado F calculado para aluminio.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	59,5	5	11,9	47,6	2,77
Dentro de Grupos	4,5	18	0,25		
Total	64	23			

Fuente: LB07 Análisis de varianza

Determinamos el valor de F para luego ser comparado con el F teórico y poder concluir, partiendo de dos hipótesis.

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

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

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

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

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

$$47,6 > 2,77$$

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

Tabla N° 28. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de Aluminio.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEÓRICO (FT)
15/FEB/2010	69,32	2,77
15/FEB/2010	47,6	
15/FEB/2010	27,9	
16/FEB/2010	59,2	
16/FEB/2010	22,8	
16/FEB/2010	55,06	
17/FEB/2010	56,7	
17/FEB/2010	49,6	
17/FEB/2010	49,9	
17/FEB/2010	27,6	

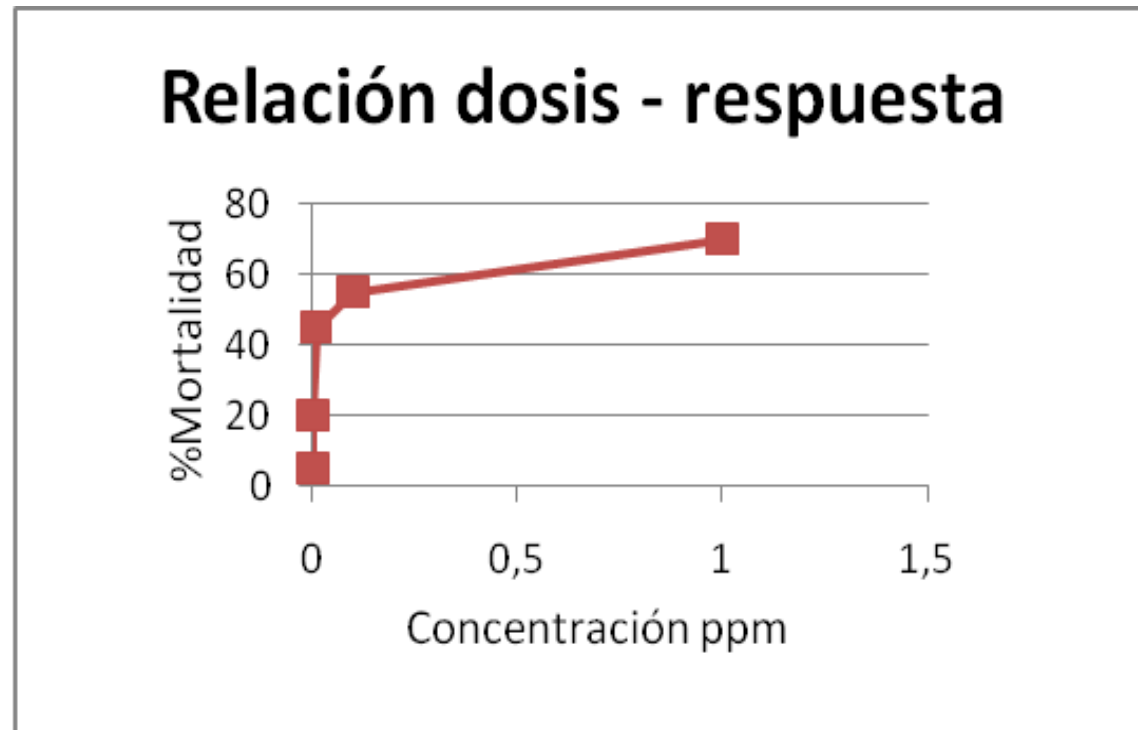
Fuente: Autoras.

En la tabla N° 28 se presenta los resultados del F calculado y el F teórico para las 10 pruebas definitivas de aluminio realizadas. Dando como resultado un F teórico mucho menor que el F calculado indicando que la variación de la concentración afecta a la población de *Daphnia Magna* de forma diferente.

7.4 Obtención de la concentración letal media en ensayo con el tóxico arsénico

Los resultados obtenidos en este estudio, permitieron determinar la concentración letal media del arsénico sobre las pulgas acuáticas *Daphnia* como se observa en la gráfica N°4 (gráfica de concentración vs mortalidad), resulta obvio interpretar que a mayor concentración también incrementa la mortalidad de los individuos a prueba.

Grafica N°4. Concentración vs mortalidad.



Fuente: Autoras.

La relación dosis-efecto no es tan definida con las concentraciones que se trabajaron para esta prueba pues son concentraciones muy altas y encontrando para esta población una distribución de respuestas con las concentraciones entre 0.5 a 1.0 ppm. En este caso como se muestra en la gráfica N° 4 el efecto que se mide no es la magnitud, se mide el porcentaje de la población de *Daphnia magna* que presenta una respuesta para cada dosis o concentración suministrada.

Tabla N°29. Datos Probit de arsénico.

FECHA	CL 50-48	Limite inferior	Limite superior
08/03/2010	0,0698	0,0289	0,1587
08/03/2010	0,0741	0,0360	0,1479
08/03/2010	0,0807	0,0381	0,168
09//03/2010	0,0597	0,0289	0,1186
09/03/2010	0,0709	0,0301	0,1574
09/03/2010	0,0650	0,0307	0,1333
09/03/2010	0,0740	0,0354	0,1502
10/03/2010	0,0540	0,0260	0,1070
10/03/2010	0,0597	0,0289	0,1186
10/03/2010	0,0632	0,0267	0,1399
PROMEDIO	0,0671	0,0309	0,1399

Fuente: Autoras.

Con los porcentajes de mortalidad obtenidos para las diferentes concentraciones y sus réplicas, se calculo la concentración letal media utilizando el método Probit como se muestra en la tabla N°29 generando los siguientes datos:

CL_{50}^{48} : 0.0671 mg/L

Intervalo de confianza: 95 %

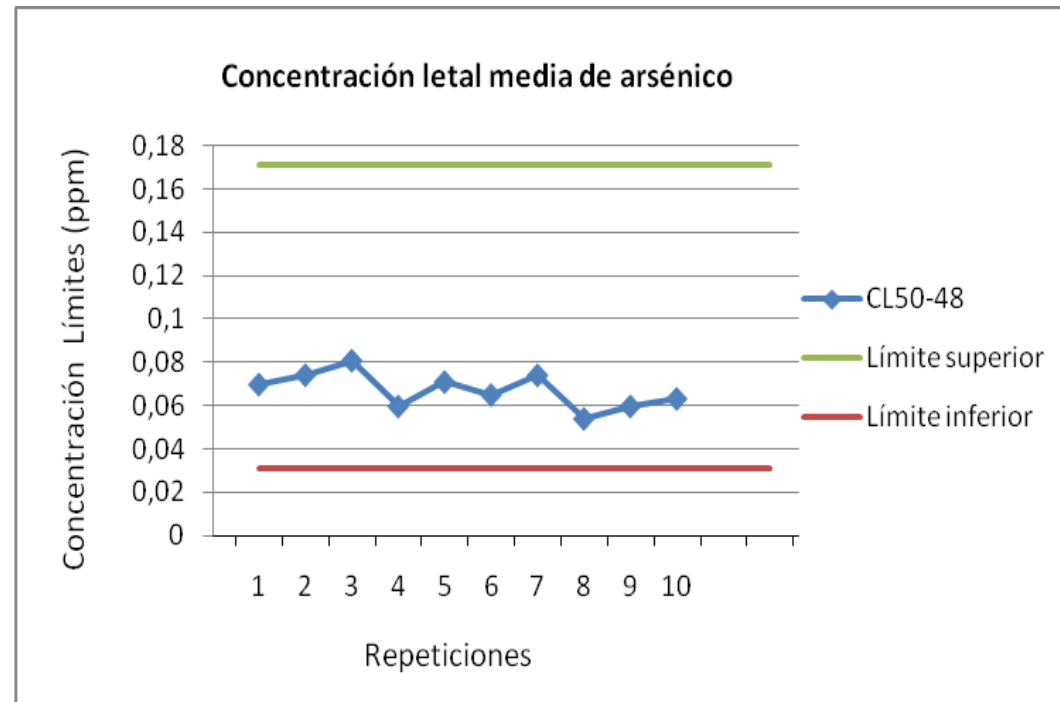
Límite inferior promedio: 0.0309

Límite superior promedio: 0.1399

Las 10 pruebas definitivas realizadas con aluminio nos arroja una concentración letal media de 0.0671 ppm. La confiabilidad de las pruebas se demuestra en los datos obtenidos en Probit, ya que los valores conservan valores con diferencias no relevantes.

Mediante esta tabla se puede concluir que si en un cuerpo de agua se vierte 0.0671 mg / L de arsénico, esto ocasiona la muerte al 50% de los organismos *Daphnia magna* y similares presentes en él.

Gráfica N°5. Concentración letal media de arsénico



Fuente: Autoras.

En la gráfica N°5, se muestra el comportamiento de la *Daphnia magna* frente al aluminio, presentando como límite inferior promedio un valor de 0.0309 ppm y límite superior promedio de 0.1399 ppm.

Los datos obtenidos durante los ensayos de toxicidad de la CL_{50}^{48} definitivas con el arsénico da un valor de 0.1 ppm y la CL_{50}^{48} obtenidas con el programa Probit es de 0.0671 ppm mostrando y comprobando la proximidad entre los dos valores.

El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de la población utilizada durante la investigación es un importante parámetro de caracterización con la que se consigue la concentración letal media (CL_{50}^{48}). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo es de 48 horas.

7.5 Análisis de varianza de arsénico con la sustancia pura.

La metodología a seguir para lograr un análisis de varianza adecuado fue seleccionada del protocolo LB07 “Análisis de Varianza”, que se encuentra en el Laboratorio de Bioensayos, Facultad de Ingeniería Ambiental.

El procedimiento a seguir es postular una hipótesis nula y una hipótesis de alternativas para la realización de la ANOVA de la siguiente manera:

Tabla N°30. Análisis de varianza del arsénico.

concentración (ppm)	Número de réplicas				Total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	4	5	19	4,75
1	3	4	4	4	15	3,75
0,1	4	3	2	1	10	2,5
0,01	2	0	2	2	6	1,5
0,001	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	51	12,75

Fuente: LB07. Análisis de varianza

Tratamientos	6
Observaciones	4
Total	24

Fuente: LB07.

Tabla N° 31. Resultado F calculado para arsénico.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	72,38	5	14,475	25,4	2.77
Dentro de Grupos	10,25	18	0,56944444		
Total	82,625	23			

Fuente: LB07. Analisis de varianza

Determinamos el valor de F para luego ser comparado con el F teórico y poder concluir, partiendo de dos hipótesis.

$$25,4 > 2.77$$

Como se puede 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.

A continuación se presentan el análisis de varianza de los resultados del F calculado y el F teórico para las 10 pruebas definitivas de arsénico realizadas en el laboratorio.

Tabla N°32. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de Arsénico.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEÓRICO (FT)
08/MAR/2010	25,4	2,77
08/MAR/2010	36,8	
08/MAR/2010	37,5	
09/MAR/2010	82,7	
09/MAR/2010	34,7	
09/MAR/2010	119,2	
09/MAR/2010	35,9	
10/MAR/2010	45	
10/MAR/2010	53,9	
10/MAR/2010	54	

Fuente: Autoras.

El análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la tabla N° 32 se determina para establecer si la mortalidad de los organismos está en función de la variación de las concentraciones del contaminante, donde el $F \text{ calculado} > F \text{ teórico}$, por lo que se acepta que la mortalidad obtenida está en función de la concentración del contaminante.

7.6 Ensayos definitivos con el vertimiento de aluminio y arsénico, y obtención de la concentración letal media CL_{50}^{48}

El vertimiento analizado de la industria galvánica Funciones Linares Ltda, resultó ser tóxica para la especie *Daphnia magna*, encontrando también que este vertimiento no cumple con los estándares establecidos por las autoridades Ambientales del país. Para el cálculo de la CL_{50} y sus respectivos límites de confianza al 95% se utilizan el método Probit. Se determinó la CL_{50}^{48} ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias.

El vertimiento sintético realizado en la universidad de la Salle para simular un vertimiento de una industria tipo de galvanotecnia se empleó para determinar el porcentaje de organismos muertos por la acción tóxica de los vertimientos que se transformaron a unidades Probit. Esta transformación permitió el ajuste a una línea de regresión, en la cual la concentración perteneciente al Probit, corresponde a la cantidad de sustancia capaz de generar la muerte a la mitad de la población.

7.6.1 Análisis fisicoquímicos del vertimiento con aluminio de la industria galvánica.

Los datos obtenidos del análisis fisicoquímico se obtuvieron a través del Laboratorio ANALQUIM, ubicado en la Calle 73 # 36-09 barrio 7 de

agosto a través del método de absorción atómica y utilizando el Standard Methods Edición 19, 1995, SM 3111B-Ag.

Dando como resultado:

Tabla N°33. Resultado análisis fisicoquímico del vertimiento de aluminio.

<i>Parámetro</i>	<i>Método según el Standard Métodos, edición 19. 1995</i>	<i>Valor</i>	<i>Unidades</i>
Aluminio	2573 Al-B Absorción atómica	945	mg/L Al
DQO	5220D-2B. Reflujo Cerrado, método espectrofotómetro	39	mg/L
Sólidos Totales	2540B. Sólidos totales secados a 103 – 105 C	81	mg/L
Conductividad	2510-B Conductímetro	10.38	µmhos/cm
pH	4500-H+ B Electrométrico	9.51	unidades

Fuente Autoras.

Según los datos obtenidos de los análisis fisicoquímicos se puede determinar que uno de los factores que afecta a las *Daphnia magna* es la concentración alta de aluminio, pero estos valores están influidos por los otros parámetros, que no se encuentran dentro de los rangos ideales de estos organismos.

7.6.2 Análisis fisicoquímico del vertimiento realizado en el laboratorio con arsénico.

La siguiente tabla muestra el método utilizado y los datos obtenidos del análisis fisicoquímico del vertimiento de arsénico.

Tabla N°34. Resultado análisis fisicoquímico del vertimiento de arsénico.

<i>Parámetro</i>	<i>Método según el Standard Métodos, edición 19. 1995</i>	<i>Valor</i>	<i>Unidades</i>
Arsénico	2573 Al-B Absorción atómica	5	mg/L Al
DQO	5220D-2B. Reflujo Cerrado, método espectrofotómetro	1230	mg/L
Sólidos Totales	2540B. Sólidos totales secados a 103 – 105 C	125	mg/L
Conductividad	2510-B Conductímetro	10.4	µmhos/cm
pH	4500-H+ B Electrométrico	6.3	unidades

Fuente: Autoras.

Los parámetros físico – químicos del vertimiento que se muestran en la tabla N° 34, indican que este vertimiento al ser domestico prácticamente, no presenta ningún efecto sobre las *Daphnia magna* pues este tipo de vertimientos no es tóxico, indicando que el único factor que afecta directamente a los organismos de *Daphnia magna* es la concentración de arsénico.

7.7 Ensayos del vertimiento con aluminio

Los resultados obtenidos indican que los cursos de agua estudiados representan en general alta toxicidad por causa del aluminio; los efluentes industriales de la empresa Fundiciones Linares descargados a cursos receptores presentan problemas en los ecosistemas a los cuales es vertida.

Para las pruebas de toxicidad con el efluente de la empresa, se realiza un ensayo preliminar con el fin de determinar el rango en el cual se deberían trabajar las concentraciones para el cálculo de la concentración letal media.

Las diluciones se obtuvieron realizando los siguientes cálculos:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

En donde.

V_1 : Volumen de la concentración.

C_1 : Concentración del análisis fisicoquímico de aluminio.

V_2 : Volumen de la muestra del vertimiento.

C_2 : Concentración obtenida de aluminio.

Todos los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$C_2 = \frac{V_1 C_1}{V_2}$$

$$C_2 = \frac{0.080L * 945^{mg/L}}{0.2L}$$

$$C_2 = 378^{mg/L}$$

Determinando las siguientes diluciones:

Tabla N° 35. Pruebas con el porcentaje de dilución del vertimiento con aluminio.

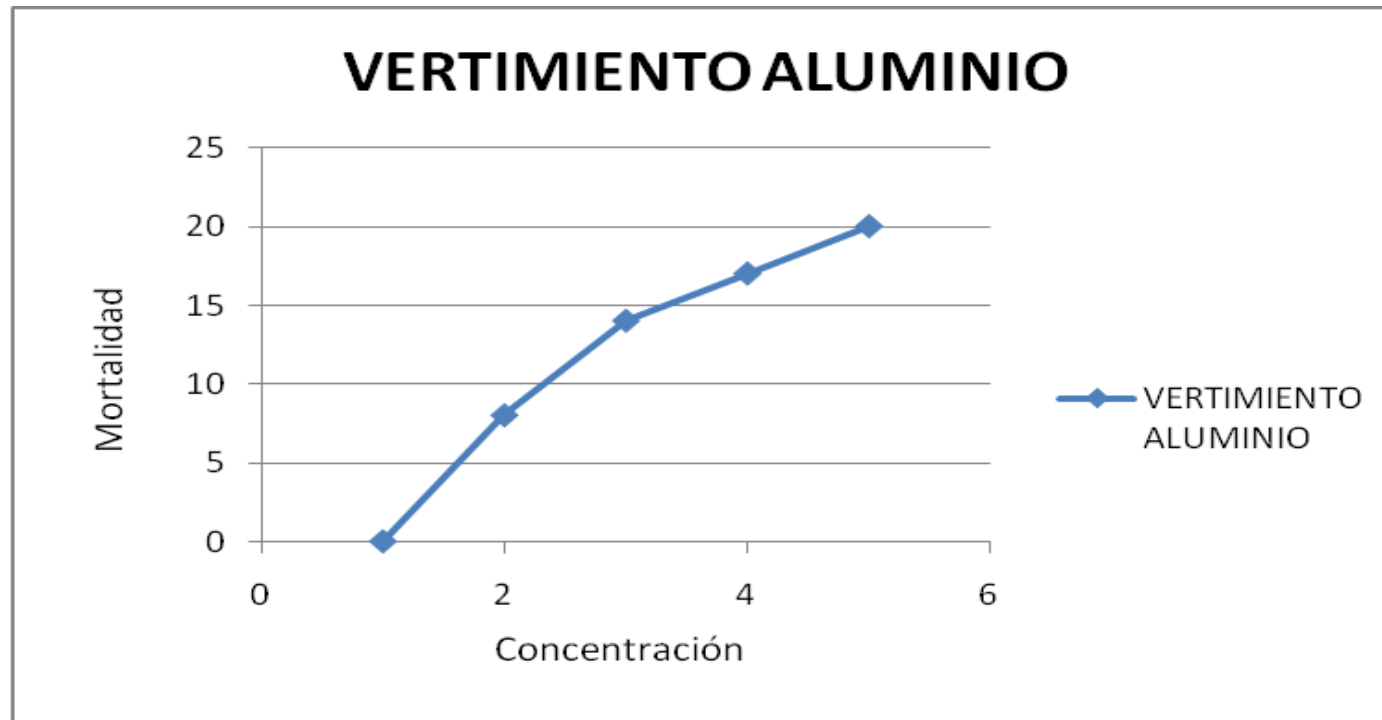
Concentración (%)	Concentración (mg/L)	Nº de organismos muertos				Mortalidad (%)
100	945	5	5	5	5	100
80	378	5	5	5	5	100
60	283.5	5	5	5	5	100
40	189	5	5	5	5	100
20	94.5	5	5	5	5	100
10	47.25	5	5	5	5	100
1	4.72	4	5	5	5	95
Blanco		0	0	0	0	0

Fuente: Autoras.

Con la tabla anterior se logró realizar la gráfica dosis - respuesta de los organismos frente al vertimiento de la industria galvánica, observando que la concentración es demasiado alta y un vertimiento de este tipo podría ocasionar la muerte inmediata del 100% de las *Daphnias magna*, si no se realiza un tratamiento para reducir la concentración de este contaminante.

Como se muestra a continuación en la gráfica N° 6 al cambiar el volumen de la concentración inicial de aluminio y aumentar el volumen del agua reconstituida, hay mayor posibilidad de sobre vivencia de la *Daphnia magna*.

Gráfica N°6. % Concentración vs mortalidad



Fuente: Autoras.

Como se muestra en la gráfica N° 6 a pesar de ser el aluminio un tóxico, las dosis bajas no representan un riesgo para los organismos *Daphnia magna*. Con el porcentaje de concentraciones obtenidas, se puede ver en la gráfica anterior que a menor concentración menor es la mortalidad encontrada. En ésta gráfica también se ve claramente el incremento de la mortalidad al estar sometidas a concentraciones mayores.

Las concentraciones definitivas utilizadas para las pruebas finales son las siguientes:

Tabla N°36. Concentraciones definitivas con el vertimiento de aluminio.

Concentración (%)	Concentración (mg/L)
5	23.62
3	14.17
1	4.72
0.5	2.36
0.1	0.47
Blanco	Blanco

Fuente: Autoras.

El análisis de los datos se realizó empleando la transformación Probit para encontrar la concentración letal media, los cuales fueron monitoreados, realizando el conteo de los organismos muertos después de 48 horas de exposición del vertimiento. Obteniendo la siguiente información:

Tabla N° 37. Datos Probit del vertimiento con aluminio.

FECHA	CL50-48	Limite inferior	Limite superior
10/03/2010	0,6823	0,4786	0,9381
10/03/2010	0,6557	0,4630	0,8948
10/03/2010	0,7167	0,5037	0,9850
11/03/2010	0,6557	0,4630	0,8948
11/03/2010	0,6986	0,482	0,9768
PROMEDIO	0,6818	0,4780	0,9379

Fuente: Autoras.

El método Probit muestra el límite superior e inferior, de igual forma la concentración letal media (CL_{50}^{48}) durante 48 horas, dando para la *Daphnia Magna* expuesta al vertimiento de la Empresa Fundiciones Linares los siguientes resultados:

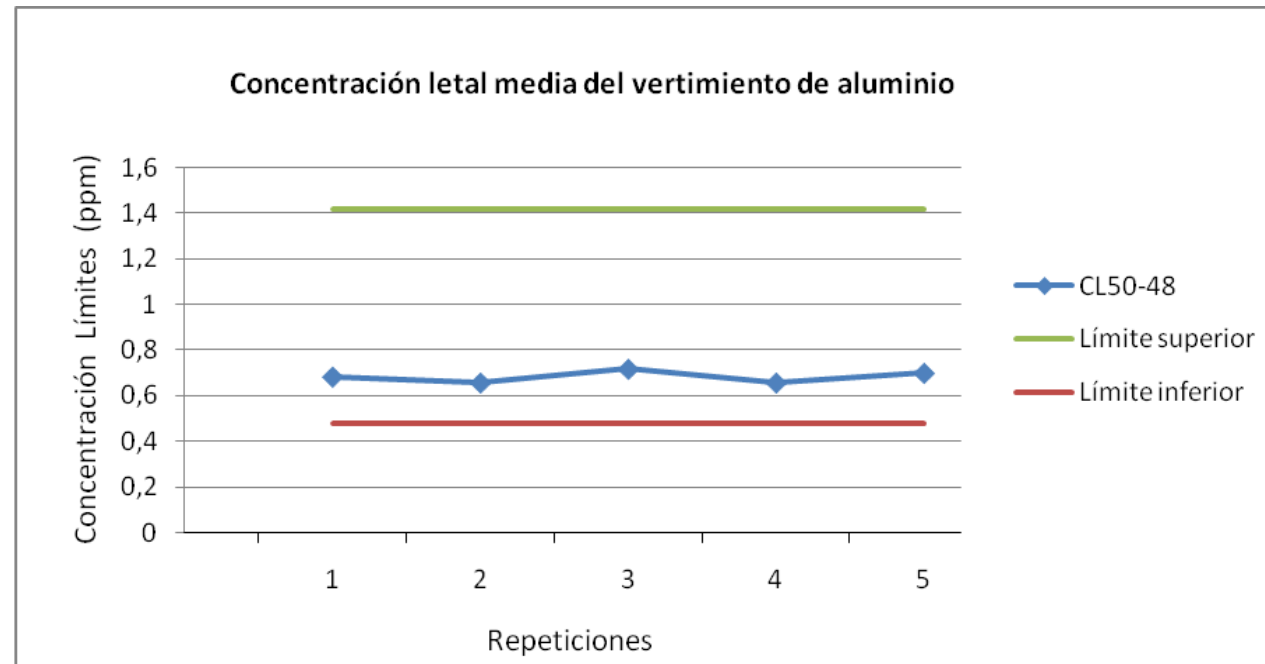
CL_{50}^{48} : 0.6818 mg/L

Intervalo de confianza: 95 %

Límite inferior: 0.4780 mg/L

Límite superior: 0.9379 mg/L

Gráfica N°7. Concentración letal media del vertimiento de aluminio.



Fuente: Autoras.

En la gráfica N° 7 podemos notar que la concentración letal media se encuentra entre los límites inferior y superior, esto quiere decir que los datos obtenidos mediante las pruebas son aceptables.

La concentración obtenida durante los ensayos de toxicidad de la CL_{50}^{48} definitivas con el aluminio fue de 1.0 ppm aprox. y la CL_{50}^{48} obtenidas con el programa Probit es de 0.6818 ppm.

7.8 Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de Aluminio.

Por medio del análisis de varianza y la ANOVA, se puede determinar una hipótesis nula o alterna comparando con el f teórico.

Tabla N° 38. Análisis de varianza del vertimiento de aluminio.

concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
5	5	5	5	5	20	5
3	4	4	5	4	17	2,25
1	4	3	4	3	14	3,5
0,5	1	1	3	3	8	2
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	59	12,75

Fuente: LB07. Análisis de varianza

Tratamientos	6
Observaciones	4
Total	24

Fuente: LB07.

Tabla N° 39. Resultado F calculado para el vertimiento con aluminio.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	92,2083333	5	18,4416667	57,7	2,77
Dentro de Grupos	5,75	18	0,32		
Total	97,9583333	23			

Fuente: LB07. Análisis de varianza

Determinamos el valor de F para luego ser comparado con el F teórico y poder concluir, partiendo de dos hipótesis.

$$57,7 > 2,77$$

Como se puede 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.

A continuación se presenta la tabla N°37 con los resultados del F calculado y el F teórico para las 5 pruebas definitivas realizadas con el vertimiento de Aluminio.

Tabla N° 40. F calculado vs F teórico. Pruebas vertimiento con aluminio.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
17/MAR/2010	57,7	2,77
17/MAR/2010	74,8	
17/MAR/2010	59,1	
18/MAR/2010	51,7	
18/MAR/2010	106,6	

Fuente: Autoras.

7.9 Ensayos del vertimiento con arsénico

Los resultados obtenidos indican que los cursos de agua estudiados representan en general alta toxicidad por causa del arsénico; los efluentes industriales descargados a cursos receptores presentan problemas en los ecosistemas a los cuales es vertida.

Para las pruebas de toxicidad utilizamos un vertimiento residual doméstico de la Universidad de La Salle y diluimos una concentración determinada de arsénico, teniendo en cuenta la concentración letal media establecida del arsénico puro en las pruebas anteriormente realizadas. Se ejecutó un ensayo preliminar con el fin de determinar el rango en el cual se deberían trabajar las concentraciones para el cálculo de la concentración letal media del vertimiento de arsénico realizado en el laboratorio. Determinando las siguientes diluciones:

Tabla N° 41. Porcentaje de diluciones del vertimiento de arsénico.

Concentración (%)	Concentración (%)	N° de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
100	5	5	5	5	5	100
80	2	5	5	5	5	100
60	1.5	5	5	5	5	100
40	1	4	4	5	4	85
20	0.5	3	4	3	2	60
10	0.25	2	2	2	1	35
1	0.025	0	0	1	0	5
Blanco		0	0	0	0	0

Fuente: Autoras.

Después de realizar las pruebas preliminares del vertimiento de arsénico hecho en el laboratorio, se procedió a realizar las pruebas definitivas con el rango obtenido, como se muestra a continuación:

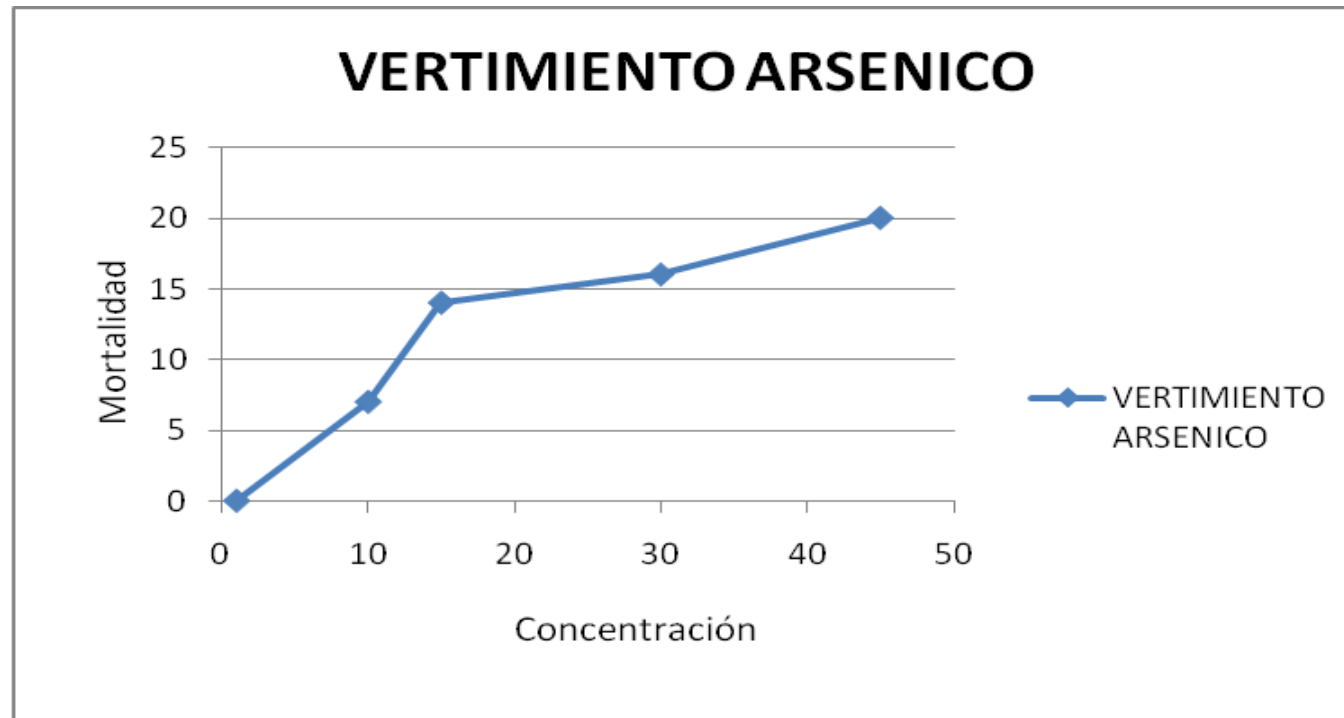
Tabla N°42. Concentraciones definitivas del vertimiento con arsénico.

Concentración (%)	Concentración (mg/L)
45	1.125
30	0.75
15	0.375
10	0.25
1	0.025
Blanco	Blanco

Fuente: Autoras.

Con las tablas anteriores se logró realizar la gráfica dosis respuesta de los organismos frente al vertimiento realizado en el laboratorio, como se muestra a continuación:

Gráfica N°9. Concentración vs mortalidad del vertimiento con arsénico



Fuente: Autoras.

Uno de los datos estándares que se obtuvo de los bioensayos realizados en esta investigación fue la concentración letal media del vertimiento residual doméstico realizado en la Universidad de La Salle, sobre la *Daphnia magna*, este dato representa la concentración del arsénico o dilución de este en una muestra, en la cual el 50% de los organismos muere en un periodo de 48 horas.

El análisis de los datos se realizó empleando el programa Probit para encontrar la concentración letal media, los cuales fueron monitoreados, realizando el conteo de los organismos muertos después de 48 horas de exposición del vertimiento. Obteniendo la siguiente información:

Tabla N°43. Datos en Probit con el vertimiento de arsénico.

FECHA	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
15/03/2010	12,1553	8,5198	15,4832
15/03/2010	11,1545	7,6398	14,3720
15/03/2010	11,8854	8,2702	15,0542
16/03/2010	11,8854	8,2702	15,0542
16/03/2010	11,8601	8,2848	15,2918
PROMEDIO	11,7881	8,1970	15,0511

Fuente: Autoras.

El método Probit muestra el límite superior e inferior, de igual forma la concentración letal media (CL_{50}^{48}) durante 48 horas, dando para la *Daphnia magna* expuesta al vertimiento de arsénico, arrojando los siguientes resultados:

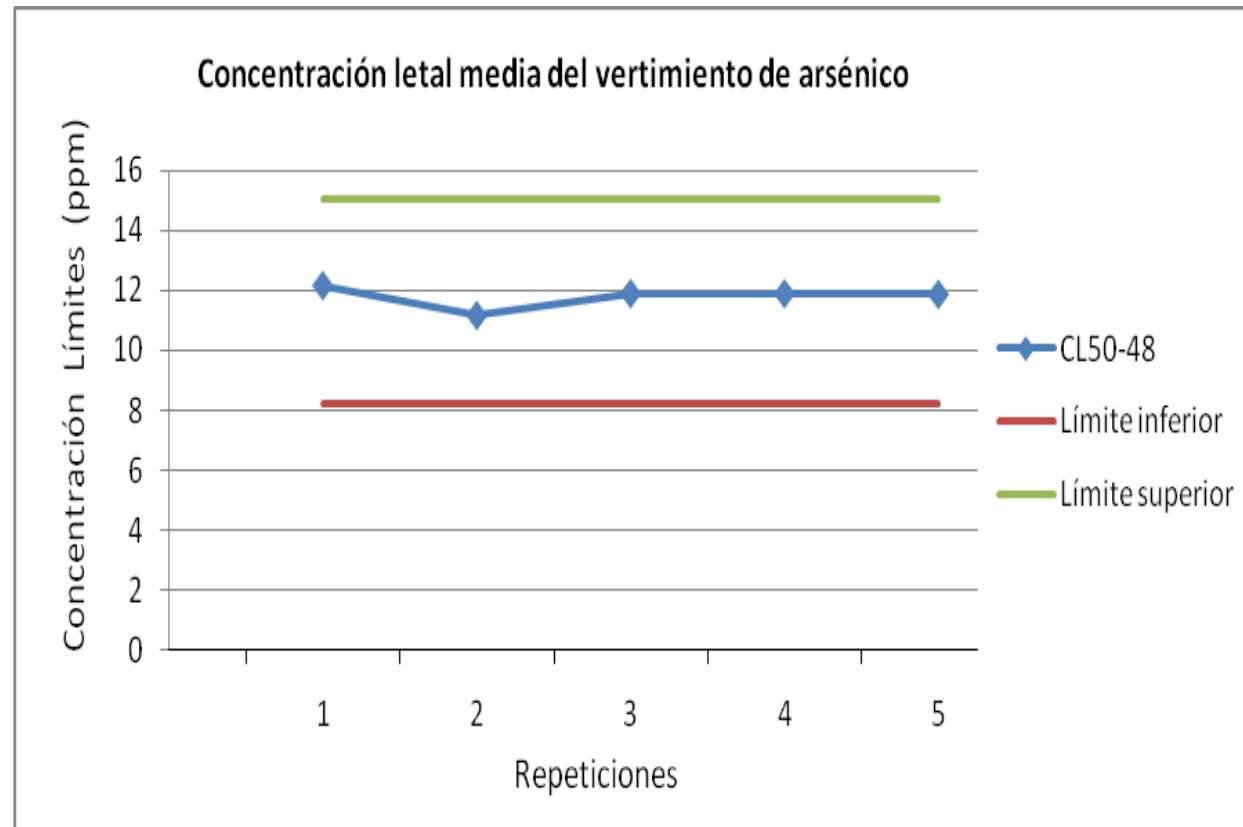
CL_{50}^{48} : 11.7881 mg/L

Intervalo de confianza: 95 %

Límite inferior: 8.1970 mg/L

Límite superior: 15.0511 mg/L

Gráfica N°10. Concentración letal media del vertimiento de arsénico.



Fuente: Autoras.

Si se realiza un vertimiento con una concentración letal media de 11.7881 ppm, como la que se puede observar en la gráfica N°10 se obtendría un 100% de mortalidad de las *Daphnia magna*.

La gráfica anterior muestra la concentración letal media y los límites tanto inferior como superior que con ayuda del programa Probit nos permite verificar la veracidad de los datos.

7.10 Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de Arsénico

Por medio del análisis de varianza y la ANOVA, se puede determinar una hipótesis nula o alterna comparando con el F teórico.

Tabla N°44. Análisis de varianza con el vertimiento de arsénico.

concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
45	5	5	5	5	20	5
30	4	4	4	4	16	2,25
15	4	4	3	3	14	3,5
10	1	2	3	1	7	1,75
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	57	12,5

Fuente: LB07. Análisis de varianza.

Tratamientos	6
Observaciones	4
Total	24

Fuente: LB07.

Tabla N° 45. Resultado F calculado del vertimiento con arsénico.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	89,875	5	17,975	86,3	2,77
Dentro de Grupos	3,75	18	0,20833333		
Total	93,625	23			

Fuente: LB07. Análisis de varianza.

Con estos datos determinamos el valor de F para luego ser comparado con el F teórico y poder concluir, partiendo de dos hipótesis.

$$86,3 > 2,77$$

Luego con estos datos se puede 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.

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

Tabla N°46. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva con el vertimiento de Arsénico.

FECHA	FCALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
15/MAR/2010	86,3	2,77
15/MAR/2010	75,9	
15/MAR/2010	45,1	
16/MAR/2010	59,1	
16/MAR/2010	47,1	

Fuente: Autoras.

El análisis de varianza (ANOVA) se determina para establecer si la mortalidad de los organismos está en función de la variación de las concentraciones del efluente, donde el F calculado > F teórico, por lo que se acepta que la mortalidad obtenida está en función de la concentración del efluente.

7.11 Obtención de la carga tóxica e índice toxicológico

La obtención de la carga tóxica está orientado a determinar los factores de peligro que presenta la actividad industrial con las descargas a las diferentes fuentes de agua, a través de la evaluación por bioensayos y de esta manera registrar los aportes de sustancias que potencialmente pueden producir un efecto no deseado sobre la estructura y dinámica del ecosistema.

La calidad del agua está sujeta a variables que condiciona su uso a por su potencial riesgo a diferentes organismos, ecosistemas y a la salud

humana, en especial cuando tiene contacto con vertimientos con cargas tóxicas.

El fin de obtener la carga tóxica e índice toxicológico es determinar, medir y registrar tras la exposición del organismo o grupos de organismos de *Daphnia Magna* a distintas concentraciones de la muestra problema que para esta investigación es el vertimiento de la empresa Fundiciones Linares con un caudal con un valor de 5 m³/ mes en promedio.

7.11.1 Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de aluminio

$$Carg a tóxica (UT) = \frac{100}{CL_{50}} * \bar{Q}$$

$$Carg a tóxica (UT) = \frac{100}{0.9257} * 0.005L / mes$$

$$Carg a tóxica (UT) = 0.540$$

$$Indice de toxicidad (I T) = Log (1 + UT)$$

$$Indice de toxicidad (I T) = Log (1 + 0.540)$$

$$Índice de toxicidad (I T) = 0.187$$

Con los valores correspondientes tanto de la carga tóxica como del índice toxicológico de la muestra de aluminio se clasifica la empresa

como una industria que presenta vertimiento con una carga toxica reducida.

7.11.2 Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de arsénico

El vertimiento de arsénico es sintético, realizado en el laboratorio por esta razón no se tiene un caudal verídico pero para efectos de análisis se toma un caudal de referencia de 5 m³/mes.

$$Carg a tóxica (UT) = \frac{100}{CL_{50}} * \bar{Q}$$

$$Carg a tóxica (UT) = \frac{100}{11.5881} * 0.005L / mes$$

$$Carg a tóxica (UT) = 0.042$$

$$Indice de toxicidad (I T) = Log (1 + UT)$$

$$Indice de toxicidad (I T) = Log (1 + 0.042)$$

$$\text{Índice de toxicidad (I T)} = 0.017$$

Con los valores correspondientes tanto de la carga tóxica como del índice toxicológico de la muestra del vertimiento de arsénico realizada en el laboratorio este vertimiento se podría clasificar como un vertimiento moderado.

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

8.2 Comparación de los resultados.

Las concentraciones letales medias de aluminio y arsénico, que se obtuvieron durante esta investigación, se compararon con otros resultados encontrados en pruebas de toxicidad realizados en laboratorios de investigación de Colombia y el exterior, para validar los resultados obtenidos.

Tabla N°47. Valores comparativos de la con especies de *Daphnia* expuestos a aluminio en el exterior.

Especie de crustáceo	CL 50 $\mu\text{g/L}$	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Pulex</i>	0,02	48	Neonatos	Dulce	Ingersoll and Winner (1982)
<i>Daphnia Magna</i>	0.3	48	Neonatos	Dulce	Chapman et al. Manuscript

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

Tabla N°48. Valores comparativos con especies de *Daphnias* expuestos a aluminio en Colombia.

Especie de crustáceo	CL 50 $\mu\text{g/L}$	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Magna</i>	0,4	48	Neonatos	Dulce	Hoyos (1995)
<i>Daphnia dubia</i>	0.2	48	Neonatos	Dulce	Molano (1993)
<i>Daphnia Magna</i>	0.2	48	Neonatos	Dulce	Obregón (1995)

Fuente: Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería; Unidad académica de ambiental y Facultad de Biología; área de investigación. Corporación tecnológica de Bogotá.

Tabla N°49. Valores comparativos de la con especies de *Daphnia* expuestos a arsénico en el exterior.

Especie de crustáceo	CL 50 $\mu\text{g/L}$	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Magna</i>	0,5	48	Neonatos	Dulce	Dirección Nacional de Medio Ambiente Uruguay(2002)
<i>Daphnia optusa.</i>	6.1	24	Neonatos	Dulce	Departamento de Biología y Ciencias Ambientales Chile (2007).
<i>Daphnia Magna</i>	270	24	Neonatos	Dulce	Antofagasta (2005)

En las anteriores comparaciones podemos observar que en Colombia han sido realizados varios estudios con *Daphnia magna* acerca de la concentración letal media de aluminio.

Los estudios realizados en Colombia de bioensayos con la concentración letal media de arsénico han sido con especies diferentes a la *Daphnia* como es el caso de las ratas, a diferencia de los estudios realizados en el exterior, ya que se han hecho estudios no solo con *Daphnia magna* si no también con *Daphnia Optusa*.

9. ALTERNATIVAS DE MANEJO PARA METALES PESADOS

El tratamiento de aguas residuales industriales es una parte fundamental de la gestión ambiental en cualquier industria. Debe ser asumida en su doble faceta de obligación medioambiental con la sociedad y como parte del proceso de producción.

9.1 Alternativas de remoción de aluminio y arsénico.

En general, el tratamiento de agua está orientado a remover color, turbiedad y microorganismos. Esta remoción se logra a través de una combinación adecuada de procesos: coagulación-floculación-sedimentación-filtración y desinfección. Pero cuando se desea remover elementos químicos del agua, como el arsénico, es necesario recurrir a métodos más complejos. A continuación se describen algunos métodos para remover arsénico:

OXIDO / REDUCCIÓN

Durante el proceso de reducción de arsénico mediante el método de Oxido – reducción se oxida el arsenito a arsenato para mejorar su remoción en procesos complementarios. Se puede usar cloro, dióxido de cloro, ozono y permanganato de potasio. La oxidación catalítica del As^{+3} es posible en presencia de óxido de cobre, carbón activado y radiación UV. Uno de los inconvenientes de este proceso es el tiempo de reacción. También es posible su oxidación biológica (Madiéc, Cepero, Mozziconacci, 2000) y por medio de la acción catalítica de la luz (Clido, Nieto, Ponce, Rodríguez, Solís y Estrada, 2003).

SEPARACIÓN SÓLIDOS / LÍQUIDOS

Para lograr la separación de sólidos se maneja un proceso muy utilizado y conocido, como lo es el proceso de precipitación. Los procesos de precipitación, co-precipitación, adsorción e intercambio iónico pueden transferir el arsénico de la fase disuelta a la fase sólida. En algunos casos el sólido que provee la superficie de adsorción es grande y fijo, por ejemplo, granos de resina de intercambio iónico, por lo cual se requiere una separación adicional. Los sólidos formados in situ (a través de precipitación o coagulación) deben separarse del agua por sedimentación ó filtración.

Precipitación: El arsénico disuelto es transformado en un sólido de baja solubilidad y removido por sedimentación y filtración.

Adsorción e intercambio iónico: Diversos materiales sólidos incluidos flóculos de hidróxido de hierro y aluminio pueden adsorber el arsénico por un mecanismo de adsorción de las superficies y de esta manera ser removidos del agua. El intercambio iónico involucra el desplazamiento reversible de un ión ligado a una superficie sólida por los iones As^{+5} y As^{+3} . Puede considerarse como una forma especial de adsorción, aunque con frecuencia se examina en forma separada.

ABLANDAMIENTO CON CAL

El ablandamiento con cal es un proceso similar a la coagulación con sales metálicas. La cal $Ca(OH)_2$ se hidroliza y reacciona con el ácido carbónico para formar carbonato de calcio, el cual actúa como el agente adsorbente en la remoción de arsénico. Este proceso es típicamente usado solo con aguas muy duras y con tratamiento a pH en el rango de 10 a 12 (Johnston, Heinjnen, Wurzel, 2001) Esta técnica no es apropiada para sistemas pequeños debido al alto costo (EPA, 1997).

La remoción (pruebas de jarras) de arsénico As^{+5} del agua con una concentración desde 0,1 a 20 mg/L es de 40-70%. Se obtiene las siguientes eficiencias de remoción indicándolas como baja o alta remoción, dependiendo del pH:

Tabla N°50. Rangos de pH.

pH	Eficiencias
9-10	Remoción media 50%
10.6 – 11.4	Alta remoción de 95%

Con estos valores se observa que a mayor pH la eficiencia de remoción es alta y es menor la remoción a pH bajos.

Tabla N° 51. Eficiencia de remoción.

pH >11	Mayor eficiencia
pH < 10	Menor eficiencia

COAGULACIÓN-FILTRACIÓN-ADSORCIÓN

Para obtener mejores resultados en la eliminación o remoción del arsénico se pueden emplear varios métodos de absorción, como es el caso de la coagulación que puede usarse combinando la filtración y/o con adsorción, este tipo de asociaciones se realizan dependiendo la frecuencia y la concentración de arsénico que se vierte.

COAGULACIÓN-FILTRACIÓN

En las plantas de tratamiento de agua, el As^{+5} puede ser removido en forma efectiva tanto por coagulación con sulfato de aluminio o hierro, como por los procesos de ablandamiento con cal y soda. Los coagulantes señalados se hidrolizan formando hidróxidos, sobre los cuales el As^{+5} se adsorbe y coprecipita con otros iones metálicos.⁴⁷

9.2 Remoción de aluminio

PRECIPITACION

El agua puede ser pasa a un depósito de sedimentación donde se depositan materiales, que son retirados para su eliminación. El proceso de sedimentación puede reducir de un 20 a un 40% la DBO_5 y de un 40 a un 60% los sólidos en suspensión.

La tasa de sedimentación se incrementa en algunas plantas de tratamiento industrial incorporando procesos llamados coagulación y floculación químicas al tanque de sedimentación. La coagulación es un proceso que consiste en añadir productos químicos como el sulfato de aluminio, el cloruro férrico o polielectrolitos a las aguas residuales; esto altera las características superficiales de los sólidos en suspensión de

⁴⁷ RUIZ, PG *Filtración directa para el tratamiento de aguas subterráneas con arsénico*. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Santiago, Chile 1992. Disponible en línea: <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/cd51/remocion-agua.pdf>

modo que se adhieren los unos a los otros y precipitan. La floculación provoca la aglutinación de los sólidos en suspensión. Ambos procesos eliminan más del 80% de los sólidos en suspensión.

PRECIPITACIÓN QUÍMICA DEL ALUMINIO

El sistema propuesto consiste en el tratamiento del baño de decapado agotado con un reactivo alcalino ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), para eliminar el aluminio presente por precipitación en forma de aluminato insoluble, y recuperar la solución de soda para su reutilización en el baño de decapado.

De acuerdo con varios autores, el sistema elimina un 90% del aluminio y recupera una solución alcalina con el 50% de la soda del baño inicial. Para obtener un rendimiento óptimo, es necesario que se eliminen de la formulación inicial del baño de decapado los reactivos acomplejantes del aluminio. Adicionalmente, por medio de este proceso se reduce a la mitad la cantidad de lodos que deben gestionarse externamente, lo que supone un ahorro económico adicional.

Se pueden realizar ensayos a escala de laboratorio para verificar la eficiencia mediante el uso de un test de jarras y la posterior sedimentación de las soluciones. Luego de los ensayos se podría realizar un balance de masa de soda (NaOH) y aluminio, que es la base para el dimensionamiento del sistema. En forma adicional, para realizar dicho balance, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- ☛ La tasa de disolución de aluminio en el baño corresponde al 6% de pérdida en peso de las piezas que entran diariamente al baño.
- ☛ El arrastre equivale aproximadamente al 15% del volumen diario del baño.
- ☛ Las condiciones que se estima mantener constantes con el sistema de precipitación fueron establecidas teniendo en cuenta las relaciones que deben mantenerse entre la soda, el aluminio y el aditivo del baño. Incluyen la concentración de NaOH (100 g/L) y la concentración de aluminio (50 g/L).
- ☛ La humedad esperada de los lodos resultantes de la precipitación es del 70%.

ÓSMOSIS INVERSA

En el proceso de ósmosis inversa se requiere de una membrana semipermeable (cuando están en contacto con la solución, permite el paso de pequeñas moléculas de disolvente y bloquea el paso de moléculas o iones de mayor tamaño como el soluto) que solamente permita el paso del agua. Cuando una solución acuosa (por ejemplo, agua con iones minerales) se separa del agua mediante una membrana semipermeable, el agua fluye hacia la solución y debido a esto la concentración de iones en solución disminuye. Este es el fenómeno de la ósmosis y a la presión necesaria para evitar que se presente el fenómeno de la ósmosis se le llama presión osmótica de la solución. Sin embargo, este proceso puede invertirse mediante la aplicación de una

presión sobre la solución con lo cual el agua es forzada a fluir de la solución hacia la otra parte del sistema (el agua dulce) provocando así la concentración de los iones. A este fenómeno se le conoce con el nombre de ósmosis inversa.

De las alternativas propuestas y explicadas anteriormente, se seleccionaron los siguientes tratamientos como alternativas para el manejo de los metales ya que estas que presentan una alta eficiencia de remoción.

Tabla N°52. Ventajas y desventajas de tratamientos.

TRATAMIENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
COAGULACIÓN , FILTRACIÓN, ABSORCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tiene una alta eficiencia en remociones de aluminio y arsénico, compuestos disueltos y suspendidos del agua (turbiedad, hierro, manganeso, fosfato y flúor). ○ Con este método también se puede obtener reducciones significantes de olor, color y precursores de trihalometanos. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Debido a la dificultad de remover As^{+3} por coagulación, se requiere de su oxidación a As^{+5} (Johnston, Heinjnen, Wurzel, 2001).
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tecnología de primer nivel, "Tratamiento Limpio" ya que casi hace desaparecer el uso de químicos en la operación. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Las unidades de Ósmosis inversa requieren una gran inversión económica. ○ Las bajas tasas de

ÓSMOSIS INVERSA	<ul style="list-style-type: none"> ○ Reduce importantes costos de operación y disposición. ○ Producción de sistemas automatizados, mediciones más controladas y confiables, espacios reducidos, flujos y calidades constantes. ○ Es adaptable y apropiada todos tipos de aplicaciones: Agua Residual, para Proceso, Pura, Ultrapura, Potable, Sanitaria, Biológica, y otros usos 	<p>recuperación de agua (10-20%), la necesidad de operar a presiones bastante altas, costos de operación altos, el agua tratada tiene muy bajos niveles de sólidos disueltos, lo que le confiere características corrosivas y bajos niveles de micronutrientes importantes para la salud humana (Johnston, Heinjnen, Wurzel, 2001).</p>
PRECIPITACIÓN QUÍMICA DEL ALUMINIO	<ul style="list-style-type: none"> ○ Gran tolerancia a concentraciones altas de contaminantes ○ Alta calidad del efluente 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Para mayor eficiencia en la precipitación se necesitaría de otra etapa de precipitación con lo que se incrementan los costos y el tiempo de procesamiento

Fuente: Autoras.

CONCLUSIONES

- Se encontró como concentración Letal media (CL_{50-48}) de Aluminio un valor de 0.8147 ppm y para el arsénico un (CL_{50-48}) de 0.0671 ppm mostrando que la toxicidad entre estos metales el mas tóxico es el arsénico.
- Se determinó la presencia de aluminio en el vertimiento de la industria galvánica por medio de 2573 Al-B Absorción atómica obteniendo así una concentración de 945 mg/L de Al, esto nos indica que este tipo de vertimiento causa la mortalidad del 100% de la Daphnia magna.
- Se encontró como concentración Letal media (CL_{50-48}) de Aluminio un valor de 0.8147 ppm y para el arsénico un (CL_{50-48}) de 0.0671 ppm mostrando que la toxicidad entre estos metales el mas toxico es el arsénico.
- Se obtuvo como índice toxicológico de aluminio un valor de 0.187 y de arsénico 0.017, presentando un alto nivel toxico el aluminio ya que este muestra una mayor concentración de este metal.
- Durante el cultivo y mantenimiento durante el laboratorio los organismos mantuvieron una alta tasa reproductiva, sin embargo,

se presentaron periodos en los cuales su reproducción disminuyó por los factores ambientales en el Laboratorio (mantenimiento laboratorio).

- Una de las alternativas con mayor eficiencia en la remoción de aluminio encontrada es el método de coagulación-filtración con un porcentaje de remoción 85%, siendo útil en el proceso de galvanizado.

RECOMENDACIONES

- ☛ Con los resultados de la presente tesis se debe generar una propuesta para reformar la normatividad en materia de vertimientos, con el fin de hacerla más restrictiva.
- ☛ Es conveniente controlar factores externos frente a la realización de pruebas, esto con el fin de que agentes ajenos a la investigación, modifiquen o alteren el resultado esperado, o que los resultados obtenidos sean poco confiables.
- ☛ Los sistemas de tratamiento diseñados y los comúnmente usados tienen eficiencias efectivas para cierto tipo de sustancias, sin embargo es conveniente no generalizar este resultado a todos los vertimientos, ya las eficiencias dependen directamente de los contaminantes, el tipo de industria y el proceso productivo.
- ☛ Para la realización de los ensayos se deben utilizar reactivos que no estén expuestos a la manipulación de diferentes personas, debido a que pueden contaminar el mismo, afectando los resultados de los mismos.
- ☛ Manejar para cada tóxico material independiente, para evitar la contaminación de los mismos y garantizar la veracidad de los datos.

- ☞ Verificar como mínimo cada semana la sensibilidad del cultivo mediante la carta de control, para asegurar que la mortalidad de los organismos, no la causen factores ajenos al metal.
- ☞ Se debe garantizar que el laboratorio sea de uso exclusivo para bioensayos, ya que cualquier cambio en el ambiente puede causar alteraciones en los cultivos así como en los resultados de los experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- ☛ Bernal paredes, Alba Janneth. Rojas avellana, Andrea Paola, Determinación De La Concentración Letal Media CL_{50-48}^{50} del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia pulex*, 2007, Universidad De La Salle, Facultad De Ingeniería Ambiental Y Sanitaria.
- ☛ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMÁS TECNICAS Y CERTIFICACION. Gestión ambiental: agua. Guía para la realización de ensayos de toxicidad en organismos acuáticos (Bioensayos). Bogotá: ICONTEC., 2000.
- ☛ Contreras Cardona, Lourdes marcela, evaluación preliminar de la toxicidad aguda de strctos vegetales utilizando *Daphnia magana* hidra attenuata y allium sepa, 1982, Universidad Nacional De Colombia, área de química y farmacéutica.
- ☛ Álzate, Adriana, guía de producción más limpia para el sector de recubrimientos electrolíticos en Colombia, universidad pontificia bolivariana, grupo de estudios ambientales.
- ☛ Escobar Malaver, Pedro Miguel; GARCIA, Eduardo. Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando *Daphnia magna*. Universidad de la

Salle; Facultad de ciencias de la educación; departamento de Química y Biología. Bogotá D.C., 1993. Anexo 4.

- Escobar Malaver, Pedro Miguel; Londoño Pérez, Rubén Darío. Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del genero daphnia. Universidad de la Salle. Bogota D.C., 2009.
- BUSTOS LOPEZ, Martha Cristina; DIAZ BAEZ, María Consuelo; ESPINOSA RAMIREZ, Adriana Janneth. Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, sección de Ingeniería Ambiental. Bogotá
- D. CIID. Manual de Procedimiento para la Ejecución de Bioensayos de Toxicidad en el Agua. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Montevideo, Uruguay. 1998. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos12/neon/>
- Decreto 1594 de 1984 Por el cual se reglamenta parcialmente el título I de la Ley 9 de 1979, así como el capítulo II del título VI - parte III - libro II y el título III de la parte III – libro I - del Decreto 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos. Junio 26 de 1984. Bogotá D.C.

- Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes al aluminio. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Aluminio. República Argentina. Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación. Diciembre de 2005.

ANEXO A

RESULTADOS DE PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

PRUEBAS DEFINITIVAS DE DICROMATO ($K_2Cr_2O_7$).

Fecha: 09/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	1	0	1	2	20
1.0 ppm	2	3	2	3	50
1.5 ppm	4	3	2	3	60
2.0 ppm	5	5	5	5	100

Fecha: 09/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	1	0	0	0	5
0.8 ppm	2	0	1	2	30
1.0 ppm	3	3	2	3	55
1.5 ppm	4	4	2	3	65
2.0 ppm	5	5	5	4	95

Fecha: 09/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	1	0	0	2	15
1.0 ppm	2	3	2	2	45
1.5 ppm	3	3	2	3	55
2.0 ppm	5	4	4	5	90

Fecha: 10/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	0	1	2	25
1.0 ppm	3	3	3	3	60
1.5 ppm	4	4	4	3	75
2.0 ppm	5	5	5	4	95

Fecha: 10/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	1	0	0	0	5
0.8 ppm	2	2	1	2	35
1.0 ppm	3	3	2	3	55
1.5 ppm	4	4	3	3	70
2.0 ppm	5	5	5	5	100

Fecha: 10/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	1	1	2	30
1.0 ppm	2	3	3	3	55
1.5 ppm	4	4	2	3	65
2.0 ppm	5	5	4	4	90

Fecha: 11/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	1	0	0	0	5
0.8 ppm	2	1	2	2	35
1.0 ppm	4	3	2	3	60
1.5 ppm	4	4	4	3	75
2.0 ppm	5	5	5	5	100

Fecha: 11/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	1	0	5
0.8 ppm	2	2	1	1	30
1.0 ppm	3	3	3	3	60
1.5 ppm	4	4	3	4	75
2.0 ppm	5	5	5	4	95

Fecha: 11/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	0	1	2	25
1.0 ppm	3	3	2	3	55
1.5 ppm	4	4	4	3	75
2.0 ppm	5	5	5	4	100

Fecha: 17/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	1	0	0	0	5
0.8 ppm	2	0	1	2	25
1.0 ppm	3	2	2	3	50
1.5 ppm	4	4	3	3	70
2.0 ppm	5	5	4	4	90

Fecha: 17/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	1	1	2	30
1.0 ppm	3	3	3	3	60
1.5 ppm	4	4	4	4	80
2.0 ppm	5	5	5	5	100

Fecha: 17/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	0	1	2	2	25
1.0 ppm	3	3	2	3	55
1.5 ppm	4	4	4	3	70
2.0 ppm	4	5	5	5	95

Fecha: 18/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	2	2	0	30
1.0 ppm	3	3	2	3	55
1.5 ppm	4	4	4	3	75
2.0 ppm	5	5	4	5	95

Fecha: 18/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	1	0	5
0.8 ppm	2	2	2	2	40
1.0 ppm	4	3	2	3	65
1.5 ppm	4	4	4	4	80
2.0 ppm	5	5	5	4	95

Fecha: 18/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	1	0	5
0.8 ppm	2	1	0	2	25
1.0 ppm	3	2	2	3	50
1.5 ppm	4	4	2	4	70
2.0 ppm	5	5	5	4	95

Fecha: 23/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	2	1	2	35
1.0 ppm	2	3	3	3	55
1.5 ppm	4	3	4	4	75
2.0 ppm	4	5	5	5	95

Fecha: 23/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	2	1	2	35
1.0 ppm	3	3	4	3	65
1.5 ppm	4	4	4	4	80
2.0 ppm	5	5	5	5	100

Fecha: 23/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	1	0	5
0.8 ppm	2	2	1	0	25
1.0 ppm	3	2	2	3	50
1.5 ppm	4	3	3	4	70
2.0 ppm	5	4	5	5	95

Fecha: 24/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	2	1	2	35
1.0 ppm	3	2	3	3	55
1.5 ppm	4	4	4	4	80
2.0 ppm	5	5	4	5	95

Fecha: 24/11/2009

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.3 ppm	0	0	0	0	0
0.8 ppm	2	1	1	2	30
1.0 ppm	3	3	3	3	60
1.5 ppm	4	4	4	4	75
2.0 ppm	5	5	5	5	100

PRUEBAS DEFINITIVAS DE ALUMINIO

Fecha: 15 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	1	0	0	5
0.5	2	1	2	2	35
1.0	3	3	3	2	55
2.0	4	4	4	3	75
2.5	5	5	4	5	95

Fecha: 15 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	1	0	0	5
0.5	2	1	1	2	30
1.0	3	2	3	2	50
2.0	3	4	4	3	70
2.5	5	4	4	4	85

Fecha: 15 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	1	5
0.5	0	2	0	2	20
1.0	2	3	2	2	45
2.0	4	4	4	2	70
2.5	4	5	5	5	95

Fecha: 16 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	1	0	0	0	5
0.5	1	0	2	1	20
1.0	3	2	3	2	50
2.0	4	3	4	3	70
2.5	5	5	5	5	100

Fecha: 16 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	1	0	0	0	5
0.5	2	0	3	1	30
1.0	1	3	2	2	40
2.0	4	3	3	3	65
2.5	5	4	5	4	90

Fecha: 16 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	2	1	2	1	30
1.0	3	3	2	2	50
2.0	4	4	4	3	75
2.5	5	5	4	5	95

Fecha: 17 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	1	0	0	5
0.5	1	1	2	2	30
1.0	2	4	3	3	60
2.0	4	4	4	4	80
2.5	5	5	5	5	100

Fecha: 17 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	1	5
0.5	2	1	1	2	30
1.0	3	3	3	3	60
2.0	4	4	4	3	75
2.5	5	5	4	4	90

Fecha: 17 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	1	0	0	5
0.5	1	2	1	1	25
1.0	2	2	2	3	45
2.0	4	4	4	3	75
2.5	5	5	4	5	95

Fecha: 17 /02/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	2	1	3	2	40
1.0	4	3	4	2	65
2.0	4	4	4	4	80
2.5	5	4	4	5	90

PRUEBAS DEFINITIVAS DE ARSENICO

Fecha: 08 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	1	0	0	0	5
0.01	2	0	2	2	30
0.1	4	3	2	1	50
1.0	3	4	4	4	75
1.5	5	5	4	5	95

Fecha: 08 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	2	1	2	0	25
0.1	4	3	3	1	55
1.0	4	3	4	4	75
1.5	5	5	5	5	100

Fecha: 08 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	1	2	1	1	25
0.1	4	3	3	1	55
1.0	4	3	3	4	75
1.5	5	5	4	5	95

Fecha: 09 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	2	1	2	1	30
0.1	3	3	3	2	55
1.0	4	3	5	4	80
1.5	5	5	5	5	100

Fecha: 09 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	1	5
0.01	1	0	2	2	25
0.1	3	2	4	2	55
1.0	4	3	4	4	75
1.5	5	5	4	5	95

Fecha: 09 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	1	2	2	1	30
0.1	3	2	3	3	55
1.0	3	4	4	4	75
1.5	5	5	5	5	100

Fecha: 09 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	1	1	3	0	25
0.1	3	4	2	2	55
1.0	4	4	4	4	80
1.5	4	5	5	5	95

Fecha: 10 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	0	2	2	2	30
0.1	2	3	4	3	60
1.0	3	5	4	4	80
1.5	5	5	5	5	100

Fecha: 10 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0
0.01	1	2	2	1	30
0.1	3	2	2	4	55
1.0	5	4	3	4	80
1.5	5	5	5	5	100

Fecha: 10 /03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	1	5
0.01	1	1	3	1	30
0.1	3	2	2	3	50
1.0	4	4	4	5	85
1.5	5	5	4	5	95

PRUEBAS DE ALUMINIO CON EL VERTIMIENTO

FECHA: 17/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	1	1	3	3	40
1	4	3	4	3	70
3	4	4	5	4	85
5	5	5	5	5	100

FECHA: 17/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	2	2	3	2	45
1	4	3	4	2	65
3	4	5	4	5	90
5	5	5	5	5	100

FECHA: 17/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	2	1	2	3	40
1	3	2	4	4	65
3	5	4	4	4	85
5	5	5	5	5	100

FECHA: 18/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	3	2	3	1	45
1	3	4	4	2	65
3	4	5	4	5	90
5	5	5	5	5	100

FECHA: 18/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0
0.5	1	2	2	3	40
1	4	3	4	3	70
3	4	4	4	4	80
5	5	5	5	5	100

PRUEBAS DE ARSENICO CON EL VERTIMIENTO

FECHA: 15/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
10	1	2	3	1	35
15	4	4	3	3	70
30	4	4	4	4	80
45	5	5	5	5	100

FECHA: 15/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
10	2	2	3	2	45
15	3	4	4	2	65
30	4	4	5	4	85
45	5	5	5	5	100

FECHA: 15/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
10	3	1	2	2	40
15	4	2	4	3	65
30	5	4	4	4	85
45	5	5	5	5	100

FECHA: 16/03/2010

Concentración (%)	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
10	3	1	2	2	40
15	2	3	4	4	65
30	4	5	4	4	85
45	5	5	5	5	100

FECHA: 16/03/2010

Concentración nominal	Nº de organismos muertos				% Mortalidad obtenida
Replicas	1	2	3	4	
Blanco	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
10	2	1	3	2	40
15	3	2	4	4	65
30	4	4	4	4	80
45	5	5	5	5	100

ANEXO B

RESULTADOS CON EL PROGRAMA PROBIT

RESULTADOS PRUEBAS FINALES CON DICROMATO POTASIO CON EL PROGRAMA PROBIT.

FECHA	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
09/11/2009	1,1101	0,9587	1,2734
09/11/2009	1,0143	0,8304	1,2117
09/11/2009	1,2175	1,0439	1,4225
10/11/2009	1,0113	0,8536	1,1614
10/11/2009	0,9347	0,7688	1,1042
10/11/2009	1,0557	0,8824	1,2441
11/11/2009	0,8976	0,7377	1,0553
11/11/2009	0,9322	0,7570	1,1066
11/11/2009	1,0312	1,8741	1,1824
17/02/2009	0,9919	0,8031	1,1934
17/02/2009	0,9618	0,8230	1,0899
17/02/2009	1,0312	0,8741	1,1824
18/11/2009	1,0071	0,8476	1,1606
18/11/2009	0,8717	0,6995	1,0372
18/11/2009	1,0157	0,8363	1,2058
23/11/2009	0,9827	0,8229	1,1380
23/11/2009	0,9164	0,7780	1,0470
23/11/2009	1,0157	0,8363	1,2058
24/11/2009	0,9684	0,8110	1,1162
24/11/2009	0,9618	0,8230	1,0899
PROMEDIO	0,9964	0,8830	1,1613

RESULTADOS PRUEBAS FINALES CON ALUMINIO CON EL PROGRAMA PROBIT.

FECHA	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
15/02/2010	0,9897	0,6774	1,4224
15/02/2010	0,9012	0,6589	1,1704
15/02/2010	0,7182	0,5076	0,9528
16/02/2010	0,8890	0,6274	1,2033
16/02/2010	0,7223	0,5144	0,9679
16/02/2010	0,8469	0,5786	1,1770
17/02/2010	1,0520	0,7915	1,3409
17/02/2010	0,9074	0,6575	1,2081
17/02/2010	0,8147	0,5539	1,1310

17/02/2010	0,7528	0,5109	1,0363
PROMEDIO	0,8594	0,6078	1,1610

RESULTADO PRUEBAS CON EL VERTIMIENTO CON ALUMINIO EN EL PROGRAMA PROBIT.

FECHA	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
10/03/2010	0,6823	0,4786	0,9381
10/03/2010	0,6557	0,4630	0,8948
10/03/2010	0,7167	0,5037	0,9850
11/03/2010	0,6557	0,4630	0,8948
11/03/2010	0,6986	0,482	0,9768
PROMEDIO	0,6818	0,4780	0,9379

RESULTADO PRUEBAS FINALES CON ARSENICO CON EL PROGRAMA PROBIT.

FECHA	CL 50-48	Límite inferior	Límite superior
08/03/2010	0,0698	0,0289	0,1587
08/03/2010	0,0741	0,0360	0,1479
08/03/2010	0,0807	0,0381	0,168
09//03/2010	0,0597	0,0289	0,1186
09/03/2010	0,0709	0,0301	0,1574
09/03/2010	0,0650	0,0307	0,1333
09/03/2010	0,0740	0,0354	0,1502
10/03/2010	0,0540	0,0260	0,1070
10/03/2010	0,0597	0,0289	0,1186
10/03/2010	0,0632	0,0267	0,1399
PROMEDIO	0,0671	0,0309	0,1399

RESULTADO PRUEBAS CON EL VERTIMIENTO CON ARSENICO EN EL PROGRAMA PROBIT.

FECHA	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
15/03/2010	12,1553	8,5198	15,4832
15/03/2010	11,1545	7,6398	14,3720
15/03/2010	11,8854	8,2702	15,0542
16/03/2010	11,8854	8,2702	15,0542
16/03/2010	11,8601	8,2848	15,2918
PROMEDIO	11,7881	8,1970	15,0511

ANEXO C

RESULTADOS CON EL PROGRAMA ANOVA

PRUEBAS CON EL PROGRAMA ANOVA DICROMATO DE POTASIO

FECHA: 09/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	5	20	5
1,5	4	3	2	3	12	3
1	2	3	2	3	10	2,5
0,8	1	0	1	2	4	1
0,3	0	0	0	0	0	0
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	76,8333333	5	15,3666667	55,32	2,77
Dentro de Grupos	5	18	0,27777778		
Total	81,8333333	23			

FECHA: 09/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	4	19	4,75
1,5	4	4	2	3	13	3,25
1	3	3	2	3	11	2,75
0,8	2	0	1	2	5	1,25
0,3	1	0	0	0	1	0,25
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	69,2083333	5	13,8416667	32,14	2,77
Dentro de Grupos	7,75	18	0,43055556		
Total	76,9583333	23			

FECHA: 09/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	4	4	5	18	4,5
1,5	3	3	2	3	11	2,75
1	2	3	2	2	9	2,25
0,8	1	0	0	2	3	0,75
0,3	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	63,7083333	5	12,7416667	43,68	2,77
Dentro de Grupos	5,25	18	0,29166667		
Total	68,9583333	23			

FECHA: 10/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	4	19	4,75
1,5	4	4	4	3	15	3,75
1	3	3	3	3	12	3
0,8	2	0	1	2	5	1,25
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					51	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	80,375	5	16,075	68,08	2,77
Dentro de Grupos	4,25	18	0,23611111		
Total	84,625	23			

FECHA: 10/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	5	20	5
1,5	4	4	3	3	14	3,5
1	3	3	2	3	11	2,75

0,8	2	2	1	2	7	1,75
0,3	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	1	0	1	0,25
	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	70,5	5	14,1	63,45	2,77
Dentro de Grupos	4	18	0,22222222		
Total	74,5	23			

FECHA: 10/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	4	4	18	4,5
1,5	4	4	2	3	13	3,25
1	2	3	3	3	11	2,75
0,8	2	1	1	2	6	1,5
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				48	12

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	66,5	5	13,3	43,52	2,77
Dentro de Grupos	5,5	18	0,30555556		
Total	72	23			

FECHA: 11/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	5	20	5
1,5	4	4	4	3	15	3,75
1	4	3	2	3	12	3
0,8	2	1	2	2	7	1,75
0,3	1	0	0	0	1	0,25
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	78,7083333	5	15,7416667	66,67	2,77
Dentro de Grupos	4,25	18	0,23611111		
Total	82,9583333	23			

FECHA: 11/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	4	19	4,75
1,5	4	4	3	4	15	3,75
1	3	3	3	3	12	3
0,8	2	2	1	1	6	1,5
0,3	0	0	1	0	1	0,25
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	74,7083333	5	14,9416667	82,75	2,77
Dentro de Grupos	3,25	18	0,18055556		
Total	77,9583333	23			

FECHA: 11/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	4	19	4,75
1,5	4	4	4	3	15	2,25
1	3	3	2	3	11	2,75
0,8	2	0	1	2	5	1,25
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				50	11

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	78,8333333	5	15,7666667	56,76	2,77

Dentro de Grupos	5	18	0,27777778	
Total	83,8333333	23		

FECHA: 17/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	4	4	18	4,5
1,5	4	4	3	3	14	2,25
1	3	2	2	3	10	2,5
0,8	2	0	1	2	5	1,25
0,3	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				48	10,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	65,5	5	13,1	36,27	2,77
Dentro de Grupos	6,5	18	0,36111111		
Total	72	23			

FECHA: 17/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	5	20	5
1,5	4	4	4	4	16	2,25
1	3	3	3	3	12	3
0,8	2	1	1	2	6	1,5
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				54	11,75

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	315	2,77
Dentro de Grupos	1	18	0,05555556		
Total	88,5	23			

FECHA: 17/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	4	5	5	5	19	4,75
1,5	4	4	4	3	15	2,25
1	3	3	2	3	11	2,75
0,8	0	1	2	2	5	1,25
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					50	11

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	78,8333333	5	15,7666667	56,76	2,77
Dentro de Grupos	5	18	0,27777778		
Total	83,8333333	23			

FECHA: 18/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	4	5	19	4,75
1,5	4	4	4	3	15	2,25
1	3	3	2	3	11	2,75
0,8	2	2	2	0	6	1,5
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					51	11,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	77,375	5	15,475	53,05	2,77
Dentro de Grupos	5,25	18	0,29166667		
Total	82,625	23			

FECHA: 18/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	4	19	4,75
1,5	4	4	4	4	16	2,25
1	4	3	2	3	12	3
0,8	2	2	2	2	8	2
0,3	0	0	1	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	56	12,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	75,8333333	5	15,1666667	78	2,77
Dentro de Grupos	3,5	18	0,19444444		
Total	79,3333333	23			

FECHA: 18/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	4	19	4,75
1,5	4	4	2	4	14	2,25
1	3	2	2	3	10	2,5
0,8	2	1	0	2	5	1,25
0,3	0	0	1	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	49	11

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	70,7083333	5	14,1416667	30,85	2,77
Dentro de Grupos	8,25	18	0,45833333		
Total	78,9583333	23			

FECHA: 23/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		

2	4	5	5	5	19	4,75
1,5	4	3	4	4	15	2,25
1	2	3	3	3	11	2,75
0,8	2	2	1	2	7	1,75
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					52	11,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	76,3333333	5	15,2666667	91,6	2,77
Dentro de Grupos	3	18	0,1666667		
Total	79,3333333	23			

FECHA: 23/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	5	5	20	5
1,5	4	4	4	4	16	2,25
1	3	3	4	3	13	3,25
0,8	2	2	1	2	7	1,75
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					56	12,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	87,8333333	5	17,5666667	210,8	2,77
Dentro de Grupos	1,5	18	0,08333333		
Total	89,3333333	23			

FECHA: 23/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	4	5	5	19	4,75
1,5	4	3	3	4	14	2,25
1	3	2	2	3	10	2,5
0,8	2	2	1	0	5	1,25
0,3	0	0	1	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0

	total	49	11
--	-------	----	----

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	70,7083333	5	14,1416667	40,728	2,77
Dentro de Grupos	6,25	18	0,34722222		
Total	76,9583333	23			

FECHA: 24/11/2009

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2	5	5	4	5	19	4,75
1,5	4	4	4	4	16	2,25
1	3	2	3	3	11	2,75
0,8	2	2	1	2	7	1,75
0,3	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				53	11,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	79,7083333	5	15,9416667	127,5	2,77
Dentro de Grupos	2,25	18	0,125		
Total	81,9583333	23			

PRUEBAS CON EL PROGRAMA ANOVA ALUMINIO

FECHA: 15/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	5	4	5	19	4,75
2	4	4	4	3	15	2,25
1	3	3	3	2	11	2,75
0,5	2	1	2	2	7	1,75
0,1	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				53	11,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	72,21	5	14,4416667	69,32	2,77
Dentro de Grupos	3,75	18	0,20833333		
Total	75,958	23			

FECHA: 15/02/2010

Concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	4	4	4	17	4,25
2	3	4	4	3	14	2,25
1	3	2	3	2	10	2,5
0,5	2	1	1	2	6	1,5
0,1	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				48	10,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	59,5	5	11,9	47,6	2,77
Dentro de Grupos	4,5	18	0,25		
Total	64	23			

FECHA: 15/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	4	5	5	5	19	4,75
2	4	4	4	2	14	2,25
1	2	3	2	2	9	2,25
0,5	0	2	0	2	4	1
0,1	0	0	0	1	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				47	10,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	71,7083333	5	14,3416667	27,90	2,77

Dentro de Grupos	9,25	18	0,51388889	
Total	80,9583333	23		

FECHA: 16/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	5	5	5	20	5
2	4	3	4	3	14	2,25
1	3	2	3	2	10	2,5
0,5	1	0	2	1	4	1
0,1	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				49	11

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	78,2083333	5	15,6416667	59,27	2,77
Dentro de Grupos	4,75	18	0,26388889		
Total	82,9583333	23			

FECHA: 16/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	4	5	4	18	4,5
2	4	3	3	3	13	2,25
1	1	3	2	2	8	2
0,5	2	0	3	1	6	1,5
0,1	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				46	10,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	60,3333333	5	12,0666667	22,86	2,77
Dentro de Grupos	9,5	18	0,52777778		
Total	69,8333333	23			

FECHA: 16/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	5	4	5	19	4,75
2	4	4	4	3	15	2,25
1	3	3	2	2	10	2,5
0,5	2	1	2	1	6	1,5
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	1	1	0	2	0,5
total					52	11,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	68,8333333	5	13,7666667	55,06	2,77
Dentro de Grupos	4,5	18	0,25		
Total	73,3333333	23			

FECHA: 17/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	5	5	5	20	5
2	4	4	4	4	16	2,25
1	2	4	3	3	12	3
0,5	1	1	2	2	6	1,5
0,1	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	1	1	0	2	0,5
total					57	12,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	74,875	5	14,975	56,74	2,77
Dentro de Grupos	4,75	18	0,26388889		
Total	79,625	23			

FECHA: 17/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	5	4	4	18	4,5

2	4	4	4	3	15	2,25
1	3	3	3	3	12	3
0,5	2	1	1	2	6	1,5
0,1	0	0	0	1	1	0,25
Blanco	0	1	0	1	2	0,5
total					54	12

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	62	5	12,4	49,6	2,77
Dentro de Grupos	4,5	18	0,25		
Total	66,5	23			

FECHA: 17/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	5	4	5	19	4,75
2	4	4	4	3	15	2,25
1	2	2	2	3	9	2,25
0,5	1	2	1	1	5	1,25
0,1	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	1	0	1	2	0,5
total					51	11,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	65,875	5	13,175	49,92	2,77
Dentro de Grupos	4,75	18	0,26388889		
Total	70,625	23			

FECHA: 17/02/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
2,5	5	4	4	5	18	4,5
2	4	4	4	4	16	2,25
1	4	3	4	2	13	3,25
0,5	2	1	3	2	8	2
0,1	0	0	0	0	0	0

Blanco	1	0	0	2	3	0,75
	total				58	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	65,3333333	5	13,0666667	27,67	2,77
Dentro de Grupos	8,5	18	0,47222222		
Total	73,8333333	23			

PRUEBAS CON EL PROGRAMA ANOVA ARSENICO

FECHA: 08/03/2010

concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	4	5	19	4,75
1	3	4	4	4	15	3,75
0,1	4	3	2	1	10	2,5
0,01	2	0	2	2	6	1,5
0,001	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				51	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	72,38	5	14,475	25,4	2,77
Dentro de Grupos	10,25	18	0,56944444		
Total	82,625	23			

FECHA: 08/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	5	5	20	5
1	4	3	4	4	15	3,75
0,1	4	3	3	1	11	2,75
0,01	2	1	2	0	5	1,25
0,001	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				51	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	84,375	5	16,875	36,8	2,77
Dentro de Grupos	8,25	18	0,46		
Total	92,625	23			

FECHA: 08/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	4	5	19	4,75
1	4	3	3	4	14	3,5
0,1	4	3	3	1	11	2,75
0,01	1	2	1	1	5	1,25
0,001	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	75,7083333	5	15,1416667	37,59	2,77
Dentro de Grupos	7,25	18	0,40277778		
Total	82,9583333	23			

FECHA: 09/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	5	5	20	5
1	4	3	5	4	16	4
0,1	3	3	3	2	11	2,75
0,01	2	1	2	1	6	1,5
0,001	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	86,2083333	5	17,2416667	82,76	2,77

grupos			
Dentro de Grupos	3,75	18	0,20833333
Total	89,9583333	23	

FECHA: 09/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	4	5	19	4,75
1	4	3	4	4	15	3,75
0,1	3	2	4	2	11	2,75
0,01	1	0	2	2	5	1,25
0,001	0	0	0	1	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				51	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	74,875	5	14,975	34,78	2,77
Dentro de Grupos	7,75	18	0,43055556		
Total	82,625	23			

FECHA: 09/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	5	5	20	5
1	3	4	4	4	15	3,75
0,1	3	2	3	3	11	2,75
0,01	1	2	2	1	6	1,5
0,001	0	0	0	0	0	0
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	82,8333333	5	16,5666667	119,28	2,77
Dentro de Grupos	2,5	18	0,13888889		
Total	85,3333333	23			

FECHA: 09/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	4	5	5	5	19	4,75
1	4	4	4	4	16	4
0,1	3	4	2	2	11	2,75
0,01	1	1	3	0	5	1,25
0,001	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					51	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	82,375	5	16,475	35,94	2,77
Dentro de Grupos	8,25	18	0,45833333		
Total	90,625	23			

FECHA: 10/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	5	5	20	5
1	3	5	4	4	16	4
0,1	2	3	4	3	12	3
0,01	0	2	2	2	6	1,5
0,001	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	45	2,77
Dentro de Grupos	7	18	0,38888889		
Total	94,5	23			

FECHA: 10/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	5	5	20	5
1	5	4	3	4	16	4
0,1	3	2	2	4	11	2,75
0,01	1	2	2	1	6	1,5
0,001	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	86,2083333	5	17,2416667	53,9	2,77
Dentro de Grupos	5,75	18	0,31944444		
Total	91,9583333	23			

FECHA: 10/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	4	5	19	4,75
1	4	4	4	5	17	4,25
0,1	3	2	2	3	10	2,5
0,01	1	1	3	1	6	1,5
0,001	0	0	0	1	1	0,25
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	96,4285714	6	16,0714286	54	2,77
Dentro de Grupos	6,25	21	0,29761905		
Total	102,678571	27			

RESULTADOS DEL PROGRAMA ANOVA CON LOS DATOS DEL VERTIMIENTO DE ALUMINIO

FECHA: 10/03/2010

concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
5	5	5	5	5	20	5
3	4	4	5	4	17	2,25
1	4	3	4	3	14	3,5
0,5	1	1	3	3	8	2
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					59	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	92,2083333	5	18,4416667	57,7	2,77
Dentro de Grupos	5,75	18	0,32		
Total	97,9583333	23			

FECHA: 10/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
5	5	5	5	5	20	5
3	4	5	4	5	18	2,25
1	4	3	4	2	13	3,25
0,5	2	2	3	2	9	2,25
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					60	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	93,5	5	18,7	74,8	2,77
Dentro de Grupos	4,5	18	0,25		
Total	98	23			

FECHA: 10/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
SAUDY TORRES – VIVIANA QUINTERO						249

5	5	5	5	5	20	5
3	5	4	4	4	17	2,25
1	3	2	4	4	13	3,25
0,5	2	1	2	3	8	2
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					58	12,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	90,3333333	5	18,0666667	59,13	2,77
Dentro de Grupos	5,5	18	0,30555556		
Total	95,8333333	23			

FECHA: 11/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
5	5	5	5	5	20	5
3	4	5	4	5	18	2,25
1	3	4	4	2	13	3,25
0,5	3	2	3	1	9	2,25
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					60	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	93,5	5	18,7	51,78	2,77
Dentro de Grupos	6,5	18	0,36111111		
Total	100	23			

FECHA: 11/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
5	5	5	5	5	20	5
3	4	4	4	4	16	2,25
1	4	3	4	3	14	3,5
0,5	1	2	2	3	8	2
0,1	0	0	0	0	0	0

Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	58	12,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	88,8333333	5	17,7666667	106,6	2,77
Dentro de Grupos	3	18	0,1666667		
Total	91,8333333	23			

RESULTADOS DEL PROGRAMA ANOVA CON LOS DATOS DEL VERTIMIENTO DE ARSENICO

FECHA: 15/03/2010

concentración (ppm)	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
45	5	5	5	5	20	5
30	4	4	4	4	16	2,25
15	4	4	3	3	14	3,5
10	1	2	3	1	7	1,75
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	57	12,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	89,875	5	17,975	86,3	2,77
Dentro de Grupos	3,75	18	0,20833333		
Total	93,625	23			

FECHA: 15/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
45	5	5	5	5	20	5
30	4	4	5	4	17	2,25
15	3	4	4	2	13	3,25
10	2	2	3	2	9	2,25
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0

	total	59	12,75
--	-------	----	-------

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	89,7083333	5	17,9416667	75,99	2,77
Dentro de Grupos	4,25	18	0,23611111		
Total	93,9583333	23			

FECHA: 15/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	Promedio
	R1	R2	R3	R4		
45	5	5	5	5	20	5
30	5	4	4	4	17	2,25
15	4	2	4	3	13	3,25
10	3	1	2	2	8	2
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	1	0	1	2	0,5
	total				60	13

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	81,5	5	16,3	45,14	2,77
Dentro de Grupos	6,5	18	0,36111111		
Total	88	23			

FECHA: 16/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	Promedio
	R1	R2	R3	R4		
45	5	5	5	5	20	5
30	4	5	4	4	17	2,25
15	2	3	4	4	13	3,25
10	3	1	2	2	8	2
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				58	12,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	90,3333333	5	18,0666667	59,13	2,77
Dentro de Grupos	5,5	18	0,30555556		
Total	95,8333333	23			

FECHA: 16/03/2010

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
45	5	5	5	5	20	5
30	4	4	4	4	16	2,25
15	3	2	4	4	13	3,25
10	2	1	3	2	8	2
1	2	2	2	2	8	2
Blanco	0	0	0	0	0	0
	total				65	14,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	62,2083333	5	12,4416667	47,15	2,77
Dentro de Grupos	4,75	18	0,26388889		
Total	66,9583333	23			



ANEXO D


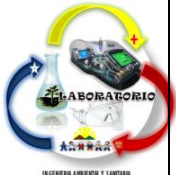
REGISTRO DE CONTROL DE PARAMETROS DEL AGUA RECONSTITUIDA

FECHA	DUREZA	pH	OD	TEMPERATURA
09/11/09	162	7.63	6.52	19.3
10/09/09	168	7.74	6.25	19.7
11/11/09	170	7.65	7.35	18.9
17/11/09	169	8.21	7.24	19.2
18/11/09	175	7.65	6.52	19.5
23/11/09	180	8.00	5.85	19.8
24/11/09	172	7.19	5.57	18.4
15/02/10	163	8.05	5.07	18.8
16/02/10	160	7.38	6.05	19.1
17/02/10	169	7.70	4.93	19.6
18/02/10	161	7.62	5.39	19.4
23/02/10	175	7.65	4.45	18.9
24/02/10	169	7.51	5.86	19.3
08/03/10	166	7.80	6.83	19.5
09/03/10	173	7.82	3.57	19.8
10/03/10	175	7.70	4.03	19.7
11/03/10	162	7.89	4.13	19.3
12/03/10	180	7.65	4.62	18.7
15/03/10	179	7.28	6.10	18.9
16/03/10	163	7.59	6.04	19.4
17/03/10	167	7.68	6.08	19.3
18/03/10	177	7.95	5.91	18.9
19/03/10	180	7.52	6.08	19.5
23/03/10	172	7.89	5.82	19.2
24/03/10	160	8.00	5.26	19.3
24/03/10	169	7.90	5.86	19.3
25/03/10	165	7.72	6.07	19.3
26/03/10	170	7.39	6.09	19.2
26/03/10	170	7.56	5.83	19.5

ANEXO E

PROTOCOLOS LABORATORIO DE BIOENSAYOS

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS													
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA													
	PROTOCOLO LB08		LB08											
	Versión: 01 Revisión: 01		Página 1 de 7											
CONTENIDO														
1. Objetivo														
2. Materiales														
3. Reactivos														
4. Principio del método														
5. Definiciones														
6. Procedimiento														
7. Bibliografía														
8. Anexo 1: Stock Preparación Agua Reconstituida.														
9. Anexo 2: Formato FLB001: Parámetros de control del agua reconstituida														
1. OBJETIVO														
Preparar el agua reconstituida para la aclimatación, estandarización, mantenimiento de cultivo del organismo de prueba y realización de ensayos de toxicidad, con el fin de mantener condiciones óptimas del ecosistema en el laboratorio.														
2. MATERIALES														
Para mantener condiciones óptimas del cultivo de los organismos de prueba en el laboratorio, son necesarios los siguientes materiales:														
<table><tr><td>• Acuarios de 30 litros</td></tr><tr><td>• Aireadores de una sola entrada (Atman)</td></tr><tr><td>• Oxímetro HI 8043 – 422987 (Hanna)</td></tr><tr><td>• pH metro SG 2 – ELK (Mettler Toledo)</td></tr><tr><td>• Agua desionizada</td></tr><tr><td>• Kit de dureza 1.08039.00001 (Aquamerck)</td></tr><tr><td>• Probeta de 100 ml</td></tr><tr><td>• Pipeta graduada de 10 ml</td></tr><tr><td>• Pipeta graduada de 1 ml</td></tr><tr><td>• Pipeteador</td></tr><tr><td>• Termómetro</td></tr></table>				• Acuarios de 30 litros	• Aireadores de una sola entrada (Atman)	• Oxímetro HI 8043 – 422987 (Hanna)	• pH metro SG 2 – ELK (Mettler Toledo)	• Agua desionizada	• Kit de dureza 1.08039.00001 (Aquamerck)	• Probeta de 100 ml	• Pipeta graduada de 10 ml	• Pipeta graduada de 1 ml	• Pipeteador	• Termómetro
• Acuarios de 30 litros														
• Aireadores de una sola entrada (Atman)														
• Oxímetro HI 8043 – 422987 (Hanna)														
• pH metro SG 2 – ELK (Mettler Toledo)														
• Agua desionizada														
• Kit de dureza 1.08039.00001 (Aquamerck)														
• Probeta de 100 ml														
• Pipeta graduada de 10 ml														
• Pipeta graduada de 1 ml														
• Pipeteador														
• Termómetro														

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB08	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01	LB08 Página 2 de 7

3. REACTIVOS

El agua reconstituida se prepara con los siguientes reactivos:

- | |
|---|
| • Bicarbonato de sodio (NaHCO_3). |
| • Cloruro de Calcio (CaCl_2). |
| • Cloruro de potasio (KCl). |
| • Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). |

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El agua reconstituida de 160 a 180 mg/l de CaCO_3 , según metodología de la CETESB,⁴⁸ se prepara con el fin de aclimatar, mantener los organismos de prueba (cladóceros del género *Daphnia*, en este caso) 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, dureza, temperatura y oxígeno disuelto) se deben mantener controladas, con el fin de evitar alteraciones del cultivo, tales como decoloración, reproducción anormal o muerte.

5. DEFINICIONES

Agua desionizada. Agua producida por intercambio iónico con resinas catiónicas y aniónicas con ayuda de la unidad de ósmosis inversa, la cual reduce el contenido de sales totales en más de un 90%.

Agua reconstituida. Agua preparada con reactivos seleccionados previamente, con el fin de generar condiciones ambientales requeridas por el ecosistema artificial. Sus funciones son: mantenimiento del cultivo de organismos de prueba, preparación de soluciones y realización de bioensayos.

⁴⁸ Compañía de Tecnología y Saneamiento Ambiental de São Paulo (CETESB). Protocolo L5.017/ 1992.

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA		
	PROTOCOLO LB08		LB08
	Versión: 01 Revisión: 01		Página 3 de 7

Dureza. Medida de la concentración de iones de calcio y magnesio en el agua, expresada como mg/l de carbonato de calcio (CaCO₃).



Aireación. Adición de aire al agua reconstituida para incrementar el contenido de oxígeno disuelto.

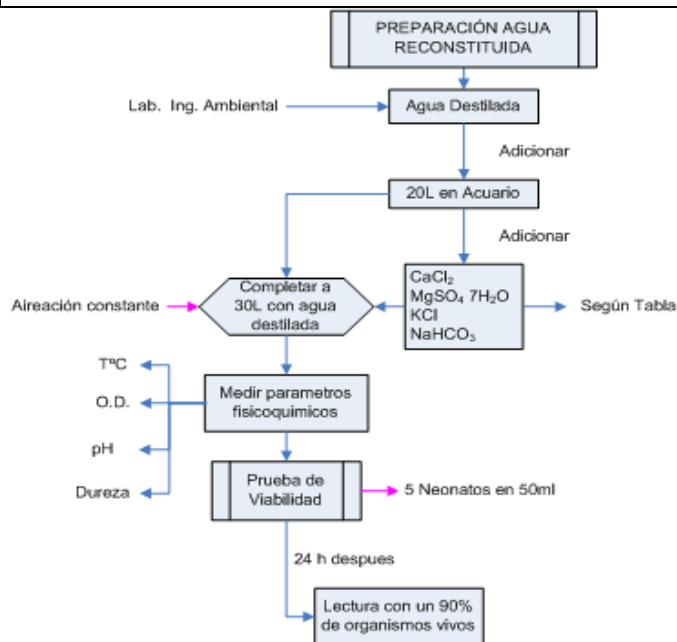
Constantes de laboratorio. Variables que tienen un valor fijo dentro de las pruebas de toxicidad para no producir alguna alteración en el cultivo del organismo prueba. Entre ellas se encuentran la dureza, la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Llenar el acuario con 10 litros de agua desionizada de calidad grado analítico.			
6.2. Adicionar al acuario los volúmenes indicados para cada uno de los reactivos (NaHCO ₃ , CaCl ₂ , KCl, (MgSO ₄ * 7H ₂ O), tal y como se muestra en el anexo 1.			
6.3 Completar a 20 litros el acuario con agua desionizada para diluir completamente los reactivos, generando un agua reconstituida de dureza de 160 a 180 mg/l CaCO ₃ .			
6.4. Oxigenar el agua reconstituida de manera continua por espacio de 24 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:			
Parámetros de Control	Método según el Standard Mhetods	Rango	Rango ideal
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	160 - 180 mg/l	180 mg/l
Oxígeno disuelto	4500-0 G Electrodo de membrana	5 - 8 mg/l	6 mg/l
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	7,6 – 7,8	7,4
Temperatura	2550 B Laboratorio y de campo	18 - 22 °C	20 °C

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA		
	PROTOCOLO LB08		LB08
	Versión: 01 Revisión: 01		Página 4 de 7
<p>6.6. Consignar esta información en el formato FLB 001 del anexo 2.</p>			
<p>6.7. Antes de utilizar el agua reconstituida, se debe realizar nuevamente la medición del oxígeno disuelto y la dureza para verificar que sus valores se encuentren en los siguientes rangos:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Oxígeno disuelto por encima de 6 mg/l▪ Dureza total entre 160 y 180 mg/l			
<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>6.9. Antes de usar el agua reconstituida para el mantenimiento del cultivo, la dilución de las muestras ambientales o la preparación de soluciones, se debe comprobar por medio de una prueba de control (test de viabilidad) los posibles efectos adversos sobre los organismos expuestos (en este caso, <i>Daphnia magna</i>). Para la prueba de control se toman 3 cristalizadores de 70 mm y en cada uno de ellos se introducen cinco neonatos. Al cabo de 48 horas, se realiza una lectura para comprobar que la cantidad de organismos vivos sea mayor que el 90%; en caso contrario, se deberá descartar el agua reconstituida.</p>			
<p>6.10. Cuando se tiene la certeza absoluta de que el agua reconstituida cumple con los parámetros establecidos y no provoca la muerte de los individuos, ésta puede ser utilizada para el mantenimiento del cultivo.</p>			
<p>A continuación se muestra un diagrama de flujo del procedimiento.</p>			

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB08	 LB08
	Versión: 01 Revisión: 01	Página 5 de 7



Fuente: ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel; GARCIA, Eduardo. Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando *Daphnia Magna*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bernal, A. & Rojas, A. *Determinación de la concentración letal CL_{50-48} del mercurio, utilizando *Daphnia pulex**, Universidad de La Salle, Bogotá, 2007.



Escobar Malaver, P. M. y García, E. , *Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando *Daphnia magna**, Bogotá, Departamento de Química y Biología, Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad de La Salle, , 1993, anexo 4.

Compañía de Tecnología y Saneamiento Ambiental de São Pablo (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 recep994.

Elaboró: Lorena Liliana Pupiales y Juan Camilo Rodríguez

Primera revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver

Segunda revisión:

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB08		
	Versión: 01 Revisión: 01		LB08
			Página 6 de 7

8. ANEXO 1: Stock Preparación Agua Reconstituida.

Reactivos	Stock (g)	ml de Stock/20L H ₂ O destilada	ml de Stock/30L H ₂ O destilada
CaCl ₂	13.5	300	450
MgSO ₄ 7H ₂ O	36.5	84	125
KCl	10	150	225
NaHCO ₃	10	400	600



Fuente: ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel; GARCIA, Eduardo. Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando *Daphnia Magna*. Universidad de la Salle; Facultad de ciencias de la educación; departamento de Química y Biología. Bogotá D.C., 1993. Anexo 4



Las soluciones preparadas se deben mantener refrigeradas (4± 2 °C) y pueden almacenarse por un periodo de hasta seis meses.

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB08	 LB08 Página 7 de 7
	Versión: 01 Revisión: 01	

 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	FLB001
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS REGISTRO DE DATOS PARÁMETROS DE CONTROL DEL AGUA RECONSTITUIDA	
• Fecha de preparación: _____	• Volumen de preparación: _____
• Dureza: _____ • OD Inicial: _____ • OD 24 horas: _____	• pH: _____ • Temperatura: _____
Observaciones: 	
Elaboró: 	

Fuente: Escobar, Bernal & Rojas, 2007

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS													
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES <i>(Selenastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i> PROTOCOLO LB09	LB09												
	Versión: 01 Revisión: 01	Página 1 de10												
CONTENIDO 1. Objetivo 2. Materiales 3. Reactivos 4. Principio del método 5. Definiciones 6. Procedimiento 7. Bibliografía 8. Anexo B1: Preparación del medio Bristol 9. Anexo B2: Formato FLB002: Preparación de soluciones 1. OBJETIVO Preparar el medio Bristol para multiplicar las algas verdes <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> por medio de la fotosíntesis con ayuda de nutrientes y luz artificial, las cuales servirán como alimento del cultivo masivo de microorganismos de prueba (<i>Daphnia magna</i>). 2. MATERIALES														
<table><tr><td>• Probeta de 2 litros (Brand)</td><td>• Pipeta graduada de 10 ml</td></tr><tr><td>• Aireador de una sola entrada (Atman)</td><td>• Pipeta graduada de 1 ml</td></tr><tr><td>• Agua desionizada</td><td>• Pipeta Pasteur de vidrio</td></tr><tr><td>• Lámpara luminiscente</td><td>• Pipeteador</td></tr><tr><td>• Beakers de 2000 y 50 ml</td><td>• Tubos de ensayo</td></tr><tr><td>• Probeta de 10 ml</td><td>• Centrifugadora DINAC II Brand</td></tr></table>			• Probeta de 2 litros (Brand)	• Pipeta graduada de 10 ml	• Aireador de una sola entrada (Atman)	• Pipeta graduada de 1 ml	• Agua desionizada	• Pipeta Pasteur de vidrio	• Lámpara luminiscente	• Pipeteador	• Beakers de 2000 y 50 ml	• Tubos de ensayo	• Probeta de 10 ml	• Centrifugadora DINAC II Brand
• Probeta de 2 litros (Brand)	• Pipeta graduada de 10 ml													
• Aireador de una sola entrada (Atman)	• Pipeta graduada de 1 ml													
• Agua desionizada	• Pipeta Pasteur de vidrio													
• Lámpara luminiscente	• Pipeteador													
• Beakers de 2000 y 50 ml	• Tubos de ensayo													
• Probeta de 10 ml	• Centrifugadora DINAC II Brand													



 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES <i>(Selenastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i> PROTOCOLO LB09	 LB09
	Versión: 01 Revisión: 01	Página 2 de 10

3. REACTIVOS

Núm.	Reactivo	Stock	ml de stock para 1 L de agua destilada
1	NaNO ₃	25,0 gr/l	10
2	CaCl ₂ .H ₂ O	2,5 gr/l	10
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 gr/l	10
4	K ₂ HPO ₄	7,5 gr/l	10
5	NaCl	2,5 gr/l	10
6	KH ₂ PO ₄	17,5 gr/l	10
7	KOH	15,5 gr/ 500 ml	1
	EDTA	25,0 gr/ 500 ml	
8	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,49 gr/ 500 ml	1
	H ₂ SO ₄	0,05 ml/ 500 ml	
9	H ₃ BO ₃	5,71 gr/ 500 ml	1
Solución de elementos de traza			
10	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,41 gr/ 500 ml	1 ml del stock combinado
11	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,72 gr/ 500 ml	
12	MoO ₃	0,355 gr/ 500 ml	
13	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,785 gr/ 500 ml	
14	Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,245 gr/ 500 ml	
15	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,174 gr/ 500 ml	

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El medio Bristol, según la metodología Dutka (1989), se utiliza con el fin de multiplicar las algas verdes (*Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*) en condiciones de laboratorio por medio de la fotosíntesis, con ayuda de una lámpara luminiscente y de nutrientes para su óptima reproducción. Una vez desarrollado el cultivo bajo condiciones controladas, las algas serán suministradas como alimento de los organismos de prueba (*Daphnia magna*), en cantidades que pueden ser calculadas con ayuda de la cámara Neubauer.

	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center">PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES <i>(Selenastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i> PROTOCOLO LB09</p>		
<p align="center">FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p align="center">Versión: 01 Revisión: 01</p>		<p align="center">LB09 Página 3 de 10</p>
	<p align="center">5. DEFINICIONES</p> <p>Medio Bristol. Solución de macro y micronutrientes necesarios para estimular el desarrollo de algas verdes en condiciones estandarizadas.</p> <p>Micronutrientes. Nutrientes que requieren de una planta en cantidades menores para su óptimo crecimiento (boro, cobre, zinc, molibdeno, cloro, hierro).</p> <p>Macronutrientes. Nutrientes que requiere una planta en cantidades mayores para su óptimo crecimiento (nitrógeno, fósforo, potasio).</p> <p>Elementos traza. Son elementos químicos requeridos para la vida de los organismos en cantidades muy pequeñas. Se trata de elementos esenciales que, en ocasiones, son denominados oligoelementos.</p> <p>Fitoplancton. Es una población de algas microscópicas que flotan libremente en las diversas capas de agua. Existen en formas unicelulares, colonias o filamentosas. Son las responsables de la base de la cadena alimenticia del medio acuático.</p> <p>Fotosíntesis. Síntesis de compuestos orgánicos (principalmente carbohidratos) a partir de dióxido de carbono y una fuente de hidrógeno (tal como el agua), con liberación simultánea de oxígeno, llevada a cabo por las células vegetales que contienen clorofila en presencia de luz.</p> <p>Aireación. Adición de aire al medio Bristol para mantener o elevar su oxígeno disuelto.</p>		

	<p>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p>PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES (<i>Selenastrum capricornutum</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i>) PROTOCOLO LB09</p>	
<p>FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p>Versión: 01 Revisión: 01</p>	<p>LB09</p> <p>Página 4 de 10</p>

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de reactivos del medio Bristol (metodología Dutka, 1989).



Fuente: Determinación de la concentración letal media (CL_{50-48}) de los vertimientos de cadmio y cinc de una industria galvánica mediante pruebas toxicológicas

6.1.1. Disolver la cantidad de reactivos en el volumen indicado de agua desionizada manteniendo un *stock* de macro y micronutrientes, tal y como se muestra en el anexo.
(Ver anexo 1).

6.1.2. Anotar la fecha de preparación y el pH de las soluciones en el formato de identificación de reactivos preparados. Ver anexo 2, formato FLB002.



6.1.3. Preservar las soluciones mediante refrigeración por un período máximo de seis meses.

6.2. Preparación del medio Bristol (metodología Dutka, 1989).



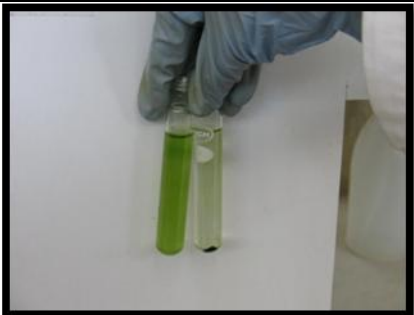


6.2.1 Tomar 1500 ml de agua desionizada en un Beaker de 2000 ml.




6.2.2 Adicionar las diferentes alícuotas de macro y micronutrientes, tal y como se indica en el anexo B1.



6.2.3 Transferir la solución a una probeta de 2000 ml,

completando con agua desionizada hasta su volumen graduado.		
<div></div> <div>FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</div>	<div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div> <div>PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES</div> <div>(<i>Selenastrum capricornutum</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i>)</div> <div>PROTOCOLO LB09</div>	<div></div> <div>LB09</div>
	Versión: 01 Revisión: 01	Página 5 de 10
	<div>Llevar la solución Bristol, una vez preparada, a un Erlenmeyer de 2000 ml. Colocar un tapón de papel kraft y esterilizar en autoclave por un período de 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión.</div>	<div></div> <div>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento.</div>
<div>6.2.5 Adicionar una alícuota de 2 ml del cultivo concentrado de algas verdes (<i>Selenastrum Capricornutum</i>, <i>Scenedesmus Quadricauda</i>) de la semana anterior por medio de una pipeta Pasteur y transferir a una probeta de 2000 ml, una vez esterilizado y enfriado el medio Bristol a temperatura constante.</div>		
<div>6.2.6 Tapar la probeta con un corcho con el fin de evitar la contaminación del cultivo por agentes externos.</div>		
<div>6.2.7 Oxigenar e iluminar con ayuda de un aireador y una lámpara luminiscente de manera continúa las 24 horas del día con el fin de proporcionar las condiciones necesarias para que las algas se multipliquen por medio de la fotosíntesis. (No se pueden apagar en ningún momento ni el aireador ni la lámpara.)</div>	<div></div> <div>Fuente: Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) de los vertimientos de cadmio y cinc de una industria galvánica mediante pruebas toxicológicas</div>	

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES <i>(Senastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i> PROTOCOLO LB09	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01	LB09
		Página 6 de 10
6.2.8 Realizar el montaje del medio Bristol, tal y como se ilustra.	<p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento</i></p>	
6.2.9 Mantener el medio Bristol aireado e iluminado por un período no mayor que 15 días.		
6.2.10 Trasvasar el medio Bristol a un Beaker de 2000 ml y, de este, transferirlo a tubos de centrifuga en volúmenes de 10 ml con ayuda de la probeta.	<p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento</i></p>	
6.2.11 Llevar los tubos de ensayo a la centrifugadora “DINAC II Centrifuge (Brand)” por diez minutos a 2500 rpm, con el fin de concentrar el cultivo de algas verdes (<i>Senastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>).		

	<p style="text-align: center;">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p style="text-align: center;">PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES <i>(Senastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i> PROTOCOLO LB09</p>		
<p style="text-align: center;">FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p style="text-align: center;">Versión: 01 Revisión: 01</p>		<p style="text-align: center;">LB09</p>
			<p style="text-align: center;">Página 7 de 10</p>
<p>6.2.12 Retirar los tubos de la centrifugadora y eliminar el sobrenadante.</p>	<div></div> <p>Fuente: Bernal, A. & Rojas, A., Determinación de la concentración letal CL50-48del mercurio, utilizando Daphnia pulex. Bogotá2007.</p>		
<p>6.2.13 Extraer el concentrado de las algas con ayuda de la pipeta Pasteur.</p>	<div></div> <p>Fuente: Bernal, A. & Rojas, A., Determinación de la concentración letal CL50-48del mercurio, utilizando Daphnia pulex. Bogotá2007.</p>		
<p>6.2.14 Almacenar el concentrado de algas en frascos destinados para tal fin.</p>	<div></div> <p>Fuente: Bernal, A. & Rojas, A., Determinación de la concentración letal CL50-48 el mercurio, utilizando Daphnia pulex. Bogotá 2007.</p>		

	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center">PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES (<i>Selenastrum capricornutum</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i>) PROTOCOLO LB09</p>		
<p align="center">FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p align="center">Versión: 01 Revisión: 01</p>		<p align="center">LB09</p> <p align="center">Página 8 de 10</p>
	<p>6.2.15 Sellar los frascos de almacenamiento con papel parafilm y rotular consignando la fecha de siembra. Refrigerar a 4 °C.</p>	 <p>Fuente: Bernal, A. & Rojas, A., Determinación de la concentración letal CL50-48 del mercurio, utilizando <i>Daphnia pulex</i>. Bogotá, 2007.</p>	
<p>6.2.16 Realizar el conteo algas mediante el procedimiento LB03, con el fin de determinar la cantidad de algas y la frecuencia de alimentación del cultivo.</p>			
<p>BIBLIOGRAFÍA</p> <p>Bernal, A. & Rojas, A., Determinación de la concentración letal CL50-48 el mercurio, utilizando <i>Daphnia pulex</i>. Bogotá, 2007.</p> <p>Escobar, P. & García, E., Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando <i>Daphnia Magna</i>, Bogotá, Departamento de Química y Biología, Facultad de Ciencias de la Educación Universidad de La Salle, 1993, anexo 4.</p> <p>Compañía de Tecnología y Saneamiento Ambiental de São Pablo (CETESB). Pruebas de toxicidad aguda. Protocolos L5.017/ 92.</p> <p>Proyecto CAR - BID - CONTRATO 298-94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores, Bogotá, 1994.</p> <p>Villehas, G., <i>Protocolos analíticos para agua</i>, Bogotá, Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, Subdirección Científica, 1999.</p>			
<p>Elaboró: Lorena Liliana Pupiales y Juan Camilo Rodríguez</p>			
<p>Primera revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver</p>			
<p>Segunda revisión:</p>			

	<p>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p>PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES</p> <p><i>(Selenastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i></p> <p>PROTOCOLO LB09</p>	
<p>FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p>Versión: 01 Revisión: 01</p>	<p>LB09</p>
		<p>Página 9 de 10</p>

8. ANEXOS

ANEXO B1: Preparación del medio Bristol



Núm.	Reactivo	Stock	ml de stock para 1 L de agua destilada
1	NaNO ₃	25,0 gr/l	10
2	CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,5 gr/l	10
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,5 gr/l	10
4	K ₂ HPO ₄	7,5 gr/l	10
5	NaCl	2,5 gr/l	10
6	KH ₂ PO ₄	17,5 gr/l	10
7	KOH	15,5 gr/ 500 ml	1
	EDTA	25,0 gr/ 500 ml	
8	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2,49 gr/ 500 ml	1
	H ₂ SO ₄	0,05 ml/ 500 ml	
9	H ₃ BO ₃	5,71 gr/ 500 ml	1

Solución de elementos de traza


10	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.41 gr/ 500 ml	1 ml del stock combinado
11	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,72 gr/ 500 ml	
12	MoO ₃	0,355 gr/ 500 ml	
13	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,785 gr/ 500 ml	
14	Co (NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,245 gr/ 500 ml	
15	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,174 gr/ 500 ml	

Fuente: Escobar, P. & García, E., 1993.

- Adicionar los volúmenes indicados de macronutrientes, más 1 ml de los elementos traza, y completar el volumen de la probeta que se desee preparar.
- Agitar y ajustar el pH.
- Anotar el pH y la fecha de preparación.

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CULTIVO DE ALGAS VERDES <i>(Selenastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda)</i> PROTOCOLO LB09	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01	LB09 Página 10 de 10

ANEXO B2: Formato FLB002 - Preparación del medio Bristol



<p style="text-align: center;">FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p>	<div style="text-align: center;">  <p>UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia</p> </div>
---	--



Identificación de soluciones preparadas

<ul style="list-style-type: none"> • Nombre de la solución: _____ • Fecha de preparación: _____ • pH: _____ _____ 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación: _____ • Volumen por preparar: _____ • Preparado por: _____
---	--

Fuente: Bernal, A. & Rojas, A., 2007

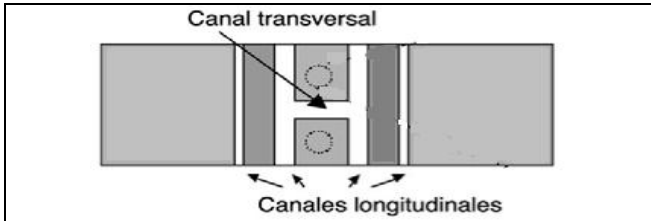
	CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER PROTOCOLO LB10	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01	LB10
		Página 1 de 9
CONTENIDO <div>1. Objetivo</div> <div>2. Materiales</div> <div>3. Definiciones</div> <div>4. Procedimiento</div> <div>5. Ejemplo</div> <div>6. Bibliografía</div> <div>7. Anexo 1: Formato FLB003 - Registro de células en cámara Neubauer</div>		
1. OBJETIVO <p>Determinar la cantidad de células algas (algas verdes <i>Selenastrum capricornutum</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i>) que se debe suministrar a las poblaciones de <i>Daphnia magna</i>, durante los días de limpieza del cultivo, mediante la utilización de la cámara Neubauer.</p>		
2. MATERIALES <div><div>• Papel de arroz</div><div>• Microscopio trinocular CME Leica</div><div>• Cámara Neubauer</div><div>• Frasco de solución de algas <i>Selenastrum capricornutum</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i> por evaluar</div><div>• Micropipeta Brand</div><div>• Pipeta Pasteur</div><div>• Pipeteador</div><div>• Agua desionizada</div></div>		
3. DEFINICIONES Cámara Neubauer. <p>Es una cámara que se utiliza para realizar el conteo de leucocitos en una cantidad fija de líquido. La profundidad de la cámara es de 0,1 mm. La cuadrícula de recuento muestra nueve cuadros grandes, cada uno de 1 mm². Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas señalados con una <i>L</i> están en 16 cuadrados con aristas de 0,25 mm. El cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos con aristas de 0,2 mm, estando cada cuadrado mediano dividido en 16 cuadrados pequeños con aristas de 0,05 mm y una superficie de 0.0025 mm².</p>		

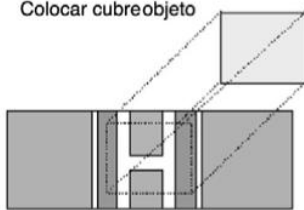
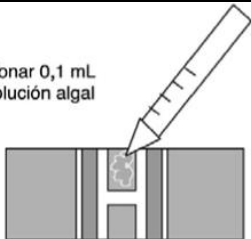
	<p>CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER</p> <p>PROTOCOLO LB10</p>	
<p>FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p>Versión: 01 Revisión: 01</p>	<p>LB10</p>
		<p>Página 2 de 9</p>
<p>Los cinco cuadrados medianos señalados con una <i>E</i> se utilizan para el recuento de eritrocitos y trombocitos.</p> <p>Tiene especial relevancia que todos los cuadros medianos presentan en todos sus lados líneas límite triple. La línea central es la frontera y decide si las células de esta zona se deben contar o no.</p> <p>Microscopio trinocular.</p> <p>El microscopio es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista.</p> <p>Pipeta Pasteur.</p> <p>Son de vidrio sódico-cálcico para uso único (ISO 7712), con punta larga y fina, con estrangulación en el tubo de aspiración, apta para colocar un tapón de algodón sin tapón de laboratorio.</p> <p>Micropipeta.</p> <p>Instrumento de laboratorio empleado para medir y absorber pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas científicas.</p> <p>Agua desionizada.</p> <p>Agua producida por intercambio iónico con resinas catiónicas y aniónicas con ayuda de la unidad de ósmosis inversa, la cual reduce el contenido de sales totales en más del 90%.</p> <p>Factor de dilución.</p> <p>El factor de dilución es igual al volumen final de la dilución dividido entre la cantidad alicuotada para la dilución.</p>		

	CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER PROTOCOLO LB10		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01		LB10
			Página 3 de 9

4. PROCEDIMIENTO `

A continuación se describe el procedimiento para el uso de la cámara de Neubauer con capacidad de 1 x 10⁻⁴ ml.



4.1. Limpiar la cámara Neubauer con papel de arroz.		
	Fig. 1. Limpieza de la cámara Neubauer en los canales transversales y longitudinales	
	Fuente: web.idrc.ca/openebooks/147-7/	

4.2. Colocar el cubreobjetos sobre los canales de la cámara.		
	Fig. 2. Colocación del cubreobjetos en la cámara	Fig. 3. Adición del concentrado de algas en el borde del cubre objeto
	Fuente:web.idrc.ca/openebooks/147-7/	

4.3. Agitar manualmente el frasco con la solución de algas verdes concentradas por evaluar hasta observar una coloración homogénea o disolver los agregados celulares.

4.4. Tomar una alícuota de 0,1 ml del concentrado de algas con ayuda de una micropipeta Brand o pipeta Pasteur.

4.5. Colocar la punta de la pipeta Pasteur en el borde del cubreobjetos (fig. 3).

	CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER PROTOCOLO LB10		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01		LB10 Página 6 de 9

4.6. Determinar la cantidad de alimento que se debe suministrar en cada pecera que contiene 20 individuos de *Daphnia magna*, así como su frecuencia de alimentación, siendo el más recomendado tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) para los días de limpieza.

5. EJEMPLO

De una lectura realizada en el laboratorio se obtuvieron los siguientes resultados:

1

59			
	61		
		69	
			46

2

40			
	52		
		48	
			61

3

32				
	26			
		31		
			32	
				37



4

61			
	34		
		42	
			40

5

54			
	49		
		64	
			62

Fuente: Escobar Malaver, P. M. y García, E. , *Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando Daphnia magna*, Bogotá,

	<p align="center">CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER PROTOCOLO LB10</p>	
<p align="center">FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>		<p align="center">LB10</p> <p align="center">Página 7 de 9</p>

Con esta información se procede a calcular la sumatoria y su promedio, respectivamente, de la siguiente manera:

$$lectura1 = (59 \times 4) + (61 \times 4) + (69 \times 4) + (46 \times 4) = 940$$

$$lectura2 = (40 \times 4) + (52 \times 4) + (48 \times 4) + (61 \times 4) = 804$$

$$lectura3 = (32 \times 5) + (26 \times 5) + (31 \times 5) + (32 \times 5) + (37 \times 5) = 790$$

$$lectura4 = (61 \times 4) + (34 \times 4) + (42 \times 4) + (40 \times 4) = 708$$

$$lectura5 = (54 \times 4) + (49 \times 4) + (64 \times 4) + (62 \times 4) = 944$$

$$\sum lecturas = 4186$$

$$\bar{X} = 837.2 \text{ células}$$

Con el promedio de células obtenido, se determina por medio de una conversión el número de células en 1 ml, así:

$$\frac{837.2 \text{ células}}{1 \times 10^{-4} \text{ ml}} = \frac{\text{Núm.de células}}{1 \text{ ml}}$$

$$\text{Núm.células} = 8.372 \times 10^6$$

Este número de células se multiplica por el factor de dilución, el cual se obtiene haciendo una dilución 2/10, siendo el factor de dilución de 5

$$8.372 \times 10^6 \times \text{factor de dilución} = 8.372 \times 10^6 \times 5 = \frac{4.19 \times 10^7 \text{ células}}{1 \text{ ml}}$$

Con este valor, se reemplaza en la fórmula:



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

$$V = \frac{(20 \times (4,5 \times 10^6))}{4,19 \times 10^7} = \frac{2,14 \text{ ml}}{\text{día}}$$

Así se obtiene el volumen de concentrado de algas que se debe administrar a una pecera con 20 organismos prueba, el cual en este caso sería 2,14 ml de algas por cada día (para los días lunes, miércoles y viernes).

	CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER PROTOCOLO LB10	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01	LB10
		Página 8 de 9
6. BIBLIOGRAFÍA Bernal, Y. & Rojas, A. Determinación de la concentración letal CL50-48 del mercurio, utilizando <i>Daphnia pulex</i> , Bogotá, 2007. Compañía de Tecnología y Saneamiento Ambiental de São Pablo (CETESB). Pruebas de toxicidad aguda. Protocolos L5.017/ 92. Díaz Baéz, M. C.; Pica Granados, Y, y Ronco, A., <i>Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; conteo con la cámara de Neubauer</i> , Canadá, IDRC, 2004. Proyecto CAR - BID - CONTRATO 298-94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, 1994.		
Elaboró: Lorena Liliana Pupiales y Juan Camilo Rodríguez		
Primera revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver		
Segunda revisión:		

	CONTEO DE ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER PROTOCOLO LB10															
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA											LB10 Página 9 de 9					
7. ANEXO 1: Formato FLB003 - Registro de células en cámara Neubauer																
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS				 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá • Colombia												
Registro de células en cámara Neubauer																
Lectura	1.º valor			2.º valor			3.º valor			4.º valor			1º. valor			Sumatoria
Primera	4	X		4	X		4	X		4	X		4	X		
Segunda	4	X		4	X		4	X		4	X		4	X		
Tercera	5	X		5	X		5	X		5	X		5	X		
Cuarta	4	X		4	X		4	X		4	X		4	X		
Quinta	4	X		4	X		4	X		4	X		4	X		
Promedio																Valor
Cantidad por día de células por <i>Daphnia</i>																
				1 <i>Daphnia magna</i>				20 <i>Daphnia magna</i>								
1 día																
2 días																
3 días																
4 días																
5 días																
Fecha de preparación del cultivo:																
Fuente: Bernal & Rojas, 2007																

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	ENSAYOS DE TOXICIDAD <i>Daphnia magna</i> PROTOCOLO LB12		LB12
	Versión: 01 Revisión: 01		Página 1 de 9
CONTENIDO 1. Objetivos 2. Definiciones 3. Materiales 4. Principio del método 5. Procedimiento 6. Bibliografía 7. Anexos 1. OBJETIVO Determinar la concentración letal media (CL ₅₀₋₄₈) de una sustancia pura o de un vertimiento mediante pruebas estáticas sin renovación de la sustancia pura o efluente, que produce la muerte al 50% de los organismos expuestos (<i>Daphnia magna</i>) en un tiempo de 48 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 período 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 sus características físico-químicas. Para ello, se verifica el pH, el oxígeno disuelto y la dureza. Concentración letal (CL₅₀₋₄₈). Concentración del compuesto tóxico que afecta al 50% de la población de la especie modelo, causando su muerte bajo condiciones de prueba en un tiempo determinado. 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 sus repeticiones. Con esto se garantiza y certifica la confiabilidad de los datos en relación con la capacidad de respuesta de los organismos.			

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	ENSAYOS DE TOXICIDAD <i>Daphnia magna</i> PROTOCOLO LB12		LB12
	Versión: 01 Revisión: 01		Página 2 de 9
<p>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 vigilancia, teniendo en cuenta la precisión y exactitud que deben y pueden obtenerse en los resultados generados por un determinado bioensayo. Los tóxicos de referencia por utilizar en estas pruebas pueden ser: NaCl, KCl, CdCl, CuSO₄, SDS o K₂Cr₂O₇.</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>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 período de exposición.</p>			
3. MATERIALES			
Frascos de vidrio boca ancha de 100 y 500 ml		Gradillas	
Balones aforados de 100 ml y 500 ml		Pipeta graduada de 10 ml	
Lápiz de cera		Pipeteador	
Tubos de ensayo		Cristalizadores de 60 y 70 mm	
Frascos de vidrio boca ancha de 100 y 500 ml		Pipeta Pasteur plástica de 3 ml	

	<div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div> <div>ENSAYOS DE TOXICIDAD</div> <div>Daphnia magna</div> <div>PROTOCOLO LB12</div>	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01	LB12
		Página 3 de 9

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las pruebas de toxicidad se realizan según la metodología CETESB (1992), con el fin de exponer individuos de 24 horas 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 *Daphnia magna*, causando su muerte en un tiempo determinado.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación de sustancias puras para pruebas de toxicidad.

5.1.1. Preparar 100 ml de sustancia pura en un balón aforado a 100 ml utilizando la sal de la sustancia y agua reconstituida en una concentración de 100 mg/l, y a partir de ella hacer cinco diluciones siguiendo un factor de 10 (100, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 mg/l).

5.1.2 Transferir las soluciones a frascos de vidrio de boca ancha, rotular indicando la fecha de preparación y mantenerlas refrigeradas por un período máximo de dos meses.



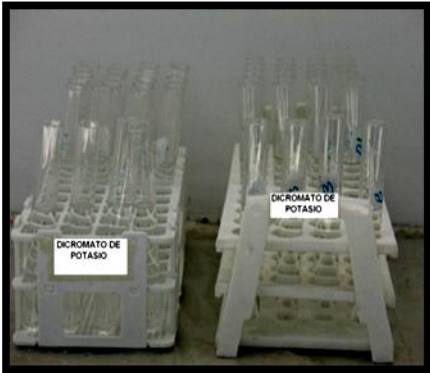
Fuente: Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) de los vertimientos de cadmio y cinc de una industria galvánica mediante pruebas toxicológicas



5.1.3 Aclimatar las soluciones durante un período de tres horas antes de la realización de las pruebas toxicológicas.



5.2. Pruebas para aguas puras, industriales o vertimientos.

5.2.1. Determinar el sitio de muestreo en la industria.

5.2.2. Realizar la caracterización físico-química del agua residual, siguiendo los lineamientos de la EPA (2005).

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	ENSAYOS DE TOXICIDAD <i>Daphnia magna</i> PROTOCOLO LB12		LB12
	Versión: 01 Revisión: 01		Página 4 de 9
<p>5.2.3. Establecer si es necesario efectuar un tratamiento a la muestra (filtración o precipitación, centrifugación) para facilitar el montaje de las pruebas de toxicidad.</p> <p>5.2.4. Mantener refrigerada la muestra por un tiempo no mayor que 12 horas.</p> <p>5.2.5. Preparar diluciones partiendo del 100% del efluente, y, a partir de ella, preparar soluciones de 20, 40, 60, 80% del efluente, diluyendo con agua reconstituida a un volumen final de 500 ml.</p> <p>5.2.6. Pasar las soluciones en frascos de boca ancha y mantenerlas tapadas hasta iniciar las pruebas de toxicidad.</p> <p>5.2.7. Realizar las pruebas toxicológicas en un período no mayor que 24 horas.</p> <p>5.2.8. Aclimatar las soluciones durante un período de tres horas antes de la realización de las pruebas toxicológicas.</p> <p>5.3 Montaje de las pruebas toxicológicas.</p> <div><div><p>5.3.1 Colocar en una gradilla 24 tubos de ensayo, los cuales deben estar distribuidos en cinco concentraciones de las respectivas soluciones (pruebas de sensibilidad con (K₂Cn. O₇) entre otras, sustancia pura y muestra ambiental “Vertimiento” y en un control de agua reconstituida. Cada tubo debe ser rotulado con un lápiz de cera.</p></div><div><p>Fuente: Escobar Malaver, P. M. y García, E. , Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando <i>Daphnia magna</i>, Bogotá.</p></div></div>			

	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center">ENSAYOS DE TOXICIDAD</p> <p align="center"><i>Daphnia magna</i></p> <p align="center">PROTOCOLO LB12</p>		
<p align="center">FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p align="center">Versión: 01 Revisión: 01</p>		<p align="center">LB12</p>
			<p align="center">Página 5 de 9</p>
<p>5.3.2 Adicionar 10 ml de los diferentes porcentajes de concentración con ayuda de una pipeta graduada en los tubos de ensayo, siendo preparadas cuatro réplicas por concentración, cada una con su respectivo control (agua reconstituida dureza 160-180 g/l $CaCO_3$).</p>	<div data-bbox="959 577 1278 860" data-label="Image"> </div> <p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl_{50-48}) de cromo y cobre en <i>daphnia magna</i> para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento</i></p>		
<p>5.3.3 Transferir en cada tubo de ensayo cinco neonatos de 6 a 24 horas de nacidos con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, separados con anterioridad según el Protocolo LB04 "Mantenimiento del cultivo <i>Daphnia magna</i>". Cada concentración necesita 20 organismos y en cada batería de ensayo se utilizan 120 organismos.</p>	<div data-bbox="979 1077 1342 1406" data-label="Image"> </div> <p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl_{50-48}) de cromo y cobre en <i>daphnia magna</i> para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento</i></p>		
<p>5.3.4 Cubrir el montaje con una bolsa de color negro que aisle la luz, y almacenar a una temperatura de 20 ± 2 °C bajo condiciones de oscuridad durante 48 horas.</p>	<div data-bbox="948 1597 1342 1861" data-label="Image"> </div> <p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (CL_{50-48}) de los vertimientos de cadmio y cinc de una industria galvánica mediante pruebas toxicológicas</i></p>		

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	ENSAYOS DE TOXICIDAD <i>Daphnia magna</i> PROTOCOLO LB12		LB12
	Versión: 01 Revisión: 01		Pagina 6 de 9

5.3.5 Al terminar las 48 horas, revisar con ayuda de una lámpara con lupa la batería de ensayo y realizar la lectura de los organismos muertos en cada tubo, reportando el número de ellos en el Formato FLB 006.



*Fuente: Determinación de la concentración letal media (CL_{50-48}) de cromo y cobre en *daphnia magna* para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento*



5.3.6. Realizar la medición de parámetros de control el pH, OD y dureza 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 sus características físico-químicas, reportando estos datos en el Formato FLB006.



5.3.7. Registrar y reportar los datos en la siguiente tabla:

Concentración nominal	No. de organismos muertos				Medidas finales		No. Observado de muertes / No. Total de organismos	% mortalidad obtenido
	1	2	3	4	OD	pH		

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

5.3.8. Este procedimiento se realiza hasta encontrar los rangos de concentraciones que produce la muerte al 50% de los organismos, tanto para la realización de las pruebas definitivas de sensibilidad, como para sustancias puras y vertimientos.

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center"><i>ENSAYOS DE TOXICIDAD</i> <i>Daphnia magna</i> PROTOCOLO LB12</p> <p align="center">Versión: 01 Revisión: 01</p>	 LB12 Página 7 de 9
<div data-bbox="304 618 1374 1928"> <p>5.4. Pruebas de sensibilidad. Realizar las pruebas definitivas de sensibilidad con un patrón primario como es el dicromato de potasio o cloruro de sodio, siguiendo la metodología descrita en los pasos 5.2.1. hasta 5.2.7, y utilizando los rangos establecidos según los resultados en las pruebas preliminares.</p> <p>5.4.1. Los rangos de dicromato de potasio que producen la muerte al 50% de los organismos deberán estar en un rango entre 0.1 y 1.0 mg/l de dicromato de potasio para validar su sensibilidad.</p> <p>5.4.2. Con los resultados obtenidos entre este rango determinar la concentración letal media CL_{50-48} de cada prueba de sensibilidad por medio del método probit (Protocolo LB06“Análisis de regresión y análisis probit”).</p> <p>5.4.3. Realizar una carta de control con los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad y determinar la concentración letal media (CL_{50-48}) promedio para el dicromato de potasio, así como la desviación estándar (σ) de la CL_{50-48}, sus límites superior (promedio $+2(\sigma)$) e inferior (promedio $-2(\sigma)$).</p> <p>5.4.4. 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>5.4.5. La carta de control se debe realizar como mínimo con 20 pruebas de sensibilidad con el dicromato de potasio. Cada mes se genera una nueva carta de control.</p> <p>5.5. Pruebas definitivas. Realizar las pruebas definitivas siguiendo la metodología descrita en los numerales 5.2.1. hasta 5.2.7, utilizando los rangos establecidos según los resultados en las pruebas preliminares.</p> </div>		

	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center">ENSAYOS DE TOXICIDAD</p> <p align="center"><i>Daphnia magna</i></p> <p align="center">PROTOCOLO LB12</p>	
<p align="center">FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>		<p align="center">LB12</p> <p align="center">Pagina 8 de 9</p>

- 5.5.1. Reportar estos resultados en el Formato FLB006.
- 5.5.2. Obtener la concentración letal media (CL_{50-48}) 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”).
- 5.5.3. Realizar el análisis de varianza (ANOVA) del resultado con el procedimiento descrito en el Protocolo LB18: “Análisis de varianza”.
- 5.5.4. Notas:
- La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y, preferiblemente, no más que el 5%.
 - Si la mortalidad en el control sobrepasa el 10%, esta prueba se considera no representativa y se requiere su repetición.
 - La concentración de oxígeno medida en el bioensayo después de 48 horas debe ser mayor que 2 mg/l.¹ La dureza debe estar en 160-180 mg/l de $CaCO_3$.
- Se debe realizar semanalmente una prueba de sensibilidad con los rangos establecidos del dicromato de potasio. El resultado de la concentración letal media (CL_{50-48}) del tóxico de referencia debe estar dentro de los límites superiores e inferiores establecidos en la carta de control.

6.BIBLIOGRAFÍA

- Bernal, Y. & Rojas, A., Determinación de la concentración letal CL_{50-48} del mercurio, utilizando *Daphnia pulex*, Bogotá, 2007.
- Environmental Protection Agency(EPA), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20.^a ed., 2005.
- Escobar Malaver, P. M., *Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando Daphnia pulex para la evaluación de muestras ambientales*, Bogotá, 1997.
- CETESB, Pruebas de toxicidad aguda. Protocolos L5.017 y L5.022 1992.
- Proyecto CAR - BID - Contrato 298-94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores.

Elaboró: Lorena Liliana Pupiales y Juan Camilo Rodríguez



Primera revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver



Segunda revisión:



 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS ENSAYOS DE TOXICIDAD <i>Daphnia magna</i> PROTOCOLO LB12 Versión: 01 Revisión: 01	 LB12 Página 9 de 9
--	---	--

7. ANEXO 1: Formato FLB006 - Registro de datos del ensayo de toxicidad aguda

 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	FLB006																																																																																										
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO ÁREA DE BIOENSAYOS REGISTRO DE DATOS DEL TEST DE TOXICIDAD AGUDA																																																																																											
<ul style="list-style-type: none"> Ficha del test estático definitivo con: _____ Muestra: _____ 																																																																																											
Datos fisicoquímicos de la muestra <ul style="list-style-type: none"> Conductividad: _____ Dureza: _____ pH: _____ 	Tratamiento de la muestra <ul style="list-style-type: none"> Sedimentación: _____ Filtración: _____ Ajuste de pH: _____ 																																																																																										
<ul style="list-style-type: none"> Inicio de la prueba: ____ / ____ / ____, a las ____ horas Fin de la prueba : ____ / ____ / ____, a las ____ horas Agua de dilución: pH: _____, Dureza: _____, Fecha de preparación: ____ / ____ 																																																																																											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Concentración nominal</th> <th colspan="4" style="width: 20%;">Núm. de organismos muertos</th> <th colspan="2" style="width: 15%;">Medidas finales</th> <th style="width: 25%;">Núm. Observado de muertes / núm. total de organismos</th> <th style="width: 25%;">% mortalidad obtenido</th> </tr> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>OD</th> <th>pH</th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 5px;">RESULTADOS</p>		Concentración nominal	Núm. de organismos muertos				Medidas finales		Núm. Observado de muertes / núm. total de organismos	% mortalidad obtenido		1	2	3	4	OD	pH																																																																										
Concentración nominal	Núm. de organismos muertos				Medidas finales		Núm. Observado de muertes / núm. total de organismos	% mortalidad obtenido																																																																																			
	1	2	3	4	OD	pH																																																																																					
Fuente: Escobar (1997).																																																																																											

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS	
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11	
	Versión: 01 Revisión: 01	LB11
		Página 1 de 12
CONTENIDO		
<div>1. Objetivo</div> <div>2. Materiales</div> <div>3. Definiciones</div> <div>4. Principio del método</div> <div>5. Procedimiento</div> <div>6. Bibliografía</div> <div>7. Anexos</div> <div>8. Anexo D1 : Mantenimiento, separación y conservación del cultivo en peceras</div> <div>9. Anexo D2 : Ciclo de renovación del cultivo</div> <div>10. Anexo D3: Ciclo reproductivo de organismos de prueba (<i>Daphnia Magna</i>)</div>		
<div>1. OBJETIVO</div> <div>Realizar el mantenimiento y limpieza del cultivo de los organismos de prueba <i>Daphnia Magna</i> bajo condiciones de laboratorio.</div>		
<div>2. MATERIALES</div> <div><ul style="list-style-type: none">16 peceras2 bandejas para el conteo y separación de microorganismo modelo2 mallas de filtro5 pipetas Pasteur plásticas de 3 ml10 cristalizadores de 60 mm y 70 mm10 lavadores con agua desionizada30 l Agua reconstituida (dureza 40-48 mg/l)Agua de la llaveToallitas absorbentes</div>		

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center">MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA</p> <p align="center">PROTOCOLO LB11</p>	 LABORATORIO <small>DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</small>
	<p align="center">Versión: 01 Revisión: 01</p>	<p align="center">LB11</p> <p align="center">Pagina 2 de 12</p>
<p>Cladóceros: Subgrupo de Braquiópodos conformado por animales de tamaño pequeño. Se les encuentra mayormente en <i>agua dulce</i>.</p> <p>Daphnias. Crustáceos planctónicos pertenecientes al orden Cladóceros que viven en las aguas dulces. En épocas favorables se reproducen por partenogénesis originando solo hembras que incrementan de forma rápida la población.</p> <p>Efipios. Cápsula protectora que se encuentra en la cámara incubadora de las <i>Daphnia magan</i>, engrosando sus paredes, y en la que se desarrollan los machos de esta especie cuando cambian las condiciones favorables del ambiente o del cultivo. Su característica principal es su color oscuro, y se observan como dos huevos grandes.</p> <p>Bandeja para el conteo y separación de microorganismos. Utensilio de color blanco utilizado para la separación de neonatos y para el conteo de madres de la especie <i>Daphnia magna</i>, durante los días de limpieza.</p> <p>Pipetas Pasteur plásticas de 3 ml. Pipeta plástica en la cual se puede establecer el tamaño de la boca de succión dependiendo del microorganismo que se esté separando y recolectando (neonatos y madres de la especie <i>Daphnia magna</i>).</p> <p>Mantenimiento. Operación realizada con el fin de conservar el cultivo de los organismos en óptimas condiciones de reproducción, evitando alteraciones por la presencia de efipios y madres que ya culminaron su etapa reproductiva.</p> <p>Limpieza. Acción realizada con el propósito de mantener las peceras donde se encuentra el cultivo en óptimas condiciones sin residuos de alimentación y caparazones de los microorganismos.</p> <p>Neonatos. Crustáceos de la especie <i>Daphnia magna</i> de 6 a 24 horas de nacidos en condiciones controladas de laboratorio.</p> <p>Daphnias madres. Crustáceos planctónicos que se encuentran en el ambiente óptimo para su reproducción partenogenética en condiciones controladas.</p>		

<div> FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</div>	<div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11</div>	<div> LB11</div>
	<div>Versión: 01 Revisión: 01</div>	<div>Pagina 3 de 12</div>

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El mantenimiento del cultivo de organismos *Daphnia magna* se realiza según la metodología CETESB (L5.018), con el fin de conservar un cultivo masivo de cuatro edades, manteniendo la posibilidad de usar neonatos del primero al cuarto parto, donde su etapa reproductiva es la más alta, y eliminando cualquier alteración que puede producir bajas en la reproducción de los organismos, tales como:


- Presencia de efipios (machos).
- Residuos que pueden entrar en contacto con la *Daphnia magna* y provocar mortandad.
- Falta de oxígeno o alimentación en el cultivo.

5. PROCEDIMIENTO




5.1. MANTENIMIENTO


5.1.1. El cultivo de *Daphnia magna* se debe mantener en peceras de dos litros con el fin de establecer el escenario óptimo para el crecimiento de los individuos (EPA, 1994).

5.1.2. En cada una de ellas se deben mantener 20 individuos manejando la relación de 1/100 (1 individuo por cada 100 ml de agua reconstituida), con una dureza total que puede variar entre 40 y 48 mg/l para su desarrollo. (Se deben tener en cuenta los parámetros de control establecidos en el protocolo LB08.)







Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA A AMBIENTAL Y SANITARIA	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11		LB11
	Versión: 01 Revisión: 01		Pagina 4 de 12
<p>5.1.3. Cada pecera debe permanecer tapada (por ejemplo, con un plástico) con el fin de evitar el ingreso de polvo, de sustancias químicas y de vapores que puedan afectar la calidad del agua y del cultivo.</p>		<div></div> <p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento</i></p>	
<p>5.1.4. El cultivo se debe renovar teniendo en cuenta el ciclo reproductivo de la <i>Daphnia magna</i>, conservándose en las etapas óptimas de reproducción, manteniéndolas en peceras separadas por edades desde 0-1 semana hasta cuatro semanas, eliminando los organismos mayores que cinco semanas y renovando el cultivo con neonatos que se obtuvieron ese día (CETESB /L5.018, 1992).</p>			
<p>5.1.5. Esta renovación se debe realizar de manera continua hasta obtener organismos de quinta generación bajo condiciones estandarizadas de laboratorio y, una vez obtenida esta descendencia, se procede a realizar las pruebas toxicológicas preliminares de sensibilidad como se muestra en el anexo 1.</p>			
<p>5.1.6. El cultivo se debe manejar en cuatro peceras por semana, obteniendo 16 peceras en el mes con un total de 320 organismos de prueba. Esto se debe realizar después de su aclimatación, tal y como se muestra en el anexo 2, anexo 3.</p>			

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	Versión: 01 Revisión: 01		LB11
			Página 5 de 12
<p>5.1.1. Conservar el cultivo a una temperatura de 20 ± 2 °C, para lo cual se debe ubicar un termómetro en el sitio de almacenamiento, revisándolo y registrando continuamente la temperatura en el Formato FLB007.</p>			
<p>5.1.2. Se debe manejar fotoperíodo 16 de luz / 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 lux.</p>			
5.2. LIMPIEZA			
<p>5.2.1. La limpieza del área de trabajo se debe realizar solo con agua y no se debe usar detergentes, desinfectantes, bactericidas, etc.</p>			
<p>5.2.2. Limpiar diariamente las peceras con el fin de eliminar los caparzones de los organismos y los restos de comida que se pueden encontrar en el fondo.</p>			
<p>5.2.3. Pasar el agua de las peceras con el cultivo a la bandeja de separación.</p>			
<p>5.2.4. Realizar la separación entre neonatos de 6 a 24 horas de nacidos y adultas (madres) en cristalizadores separados de 60 y 70 mm.</p>		<div></div> <p><i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento</i></p>	
<p>5.2.5. Realizar el conteo de neonatos en el cultivo, así como la corroboración de las madres. Consignar esta información en el Formato FLB005.</p>			
<p>5.2.6. Lavar las peceras con abundante agua de la llave, enjuagarlas con agua destilada y purgarlas con agua reconstituida (no se puede emplear ningún tipo de detergente).</p>			

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11		
	Versión: 01 Revisión: 01		LB11 Pagina 6 de 12
5.1.7. Filtrar el agua en un tamiz y recuperar el volumen de cada pecera.			<i>Fuente: Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de cromo y cobre en daphnia magna para el vertimiento de una industria de galvanotecnia y propuesta de pre-tratamiento para la disminución de la toxicidad de dicho vertimiento.</i>
5.1.8. Cambiar una parte mínima ($\pm 1/6$) del volumen por agua reconstituida nueva y fresca. Esto se debe realizar los días miércoles y viernes.			
5.1.9. Realizar los lunes el mismo procedimiento cambiando 1000 ml del volumen total de la pecera.			
5.2. RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA			
5.2.1. Extraer los organismos modelo (neonatos de 6 a 24 horas de nacidos) empleando una pipeta Pasteur de plástico de 3 mililitros, la cual, debe tener una abertura suficiente para no ocasionarle daños a ningún microorganismo.			
5.2.2. No se pueden formar burbujas dentro de las pipetas Pasteur.			
5.2.3. Colocar los microorganismos dentro, y no sobre el agua reconstituida en cristalizadores de 60 mm y 70 mm, porque la tensión superficial afecta la flotabilidad de los organismos y tiende a irse hacia la superficie (en los cristalizadores no se pueden formar burbujas).			
5.2.4. Realizar la separación y recolección de los neonatos de manera cuidadosa evitando el estrés que se puede provocar a los organismos modelo por la transferencia de un cristalizador a otro. Estos serán utilizados para las pruebas de toxicidad, renovación de cultivo y pruebas de viabilidad.			

	<p align="center">LABORATORIO DE BIOENSAYOS</p> <p align="center">MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA</p> <p align="center">PROTOCOLO LB11</p>					
<p>FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</p>	<p align="center">Versión: 01 Revisión: 01</p>		<p align="center">LB11</p> <p align="center">Pagina 7 de 12</p>			
	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px;"> <p>5.2.5. Alimentar los cultivos de las peceras, teniendo en cuenta el Protocolo LB10 (conteo de algas con la cámara Neubauer).</p> <p>5.2.6. Guardar las peceras en el sitio de almacenamiento y taparlo con plástico evitando el polvo, sustancias químicas y vapores que pueden estar en el ambiente del laboratorio.</p> </div>					
<p>6. BIBLIOGRAFÍA</p>						
<p>Bernal, Y. & Rojas, A., <i>Determinación de la concentración letal CL_{50-48} del mercurio, utilizando <i>Daphnia pulex</i></i>, Bogotá, Universidad de la Salle 2007.</p> <p>EPA, 1994.</p> <p>Escobar Malaver, P. M., <i>Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando <i>Daphnia pulex</i> para la evaluación de muestras ambientales</i>, Bogotá, , 1997.</p> <p>Compañía de Tecnología y Saneamiento Ambiental de São Pablo– (CETESB). Pruebas de toxicidad aguda. Protocolos L5.017/ 92.</p> <p>Proyecto CAR - BID - CONTRATO 298-94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, , 1994.</p>						
<p>Elaboró: Lorena Liliana Pupiales y Juan Camilo Rodríguez</p>						
<p>Primera revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver</p>						
<p>Segunda revisión:</p>						

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11	 LB11
		Página 8 de 12




6. ANEXOS



Formato FLB007 -

REGISTRO DE LA MAXIMA Y MINIMA TEMPERATURA EN EL ÁREA DE MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DAPHNIA MAGNA

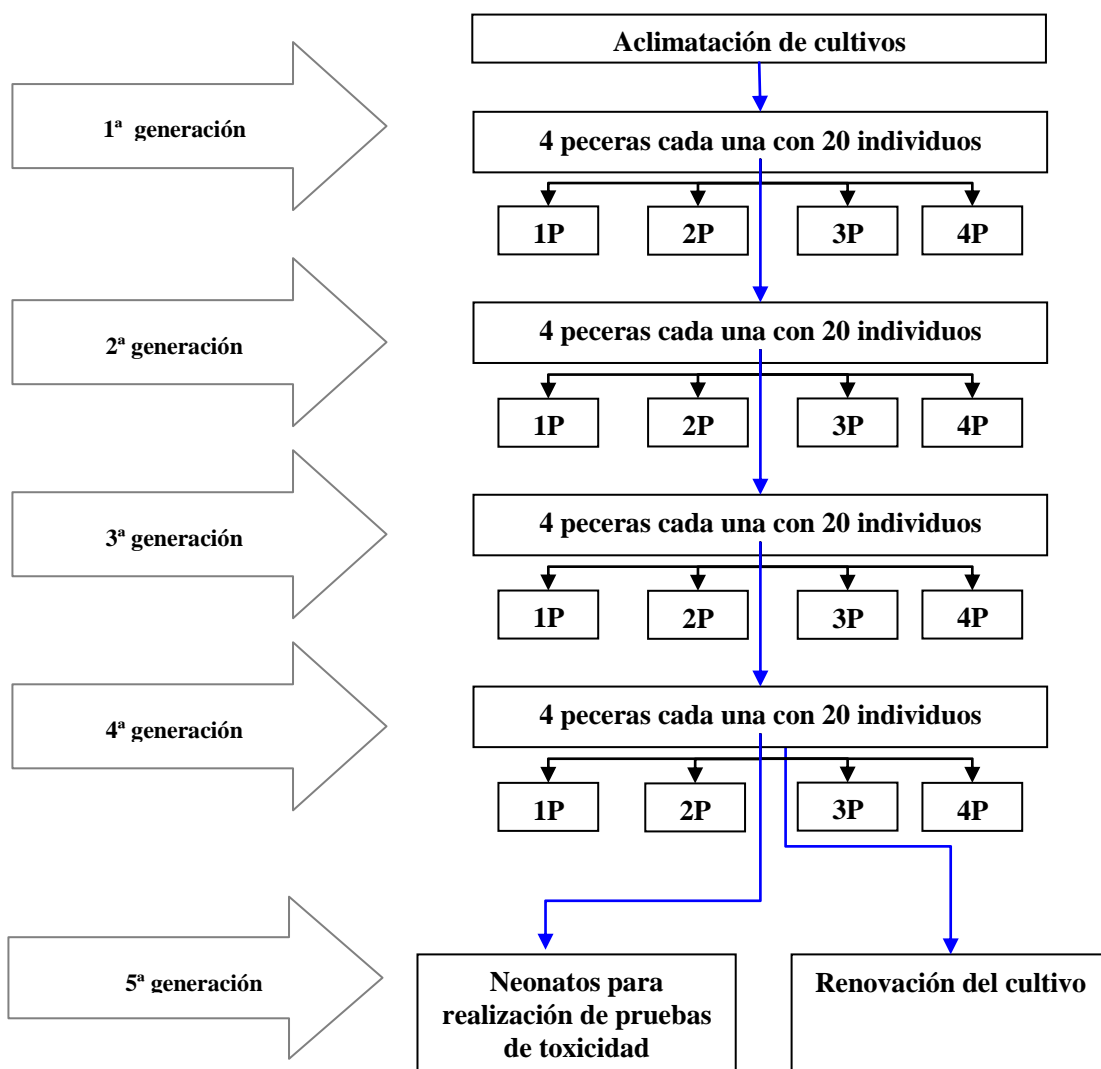
 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	FLB007
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS REGISTRO DE LA TEMPERATURA EN EL ÁREA DE MANTENIMIENTO DEL CULTIVO	
FECHA	TEMPERATURA PROMEDIO SEMANAL
PROMEDIO	
Elaboró:	

Fuente: Bernal & Rojas, 2007.



 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11	 LABORATORIO <small>DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA</small>
<p align="center">Formato FLB005</p>		
<p align="center">CONTEO DE NEONATOS Y CORROBORACIÓN DE LAS MADRES</p>		
 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia		FLB005
<p align="center">FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS REGISTRO DE CONTEO DE NEONATOS Y CORROBORACIÓN DE LAS MADRES</p>		
<p>♦ Fecha:</p>		
<p>Número de pecera:</p>		
<p>Madres</p>	<p>Neonatos</p>	
<p>Observaciones:</p>		
<p>Elaboró:</p>		
<p align="center">Fuente: Bernal & Rojas, 2007</p>		

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11	
		LB11 Página 10 de 12

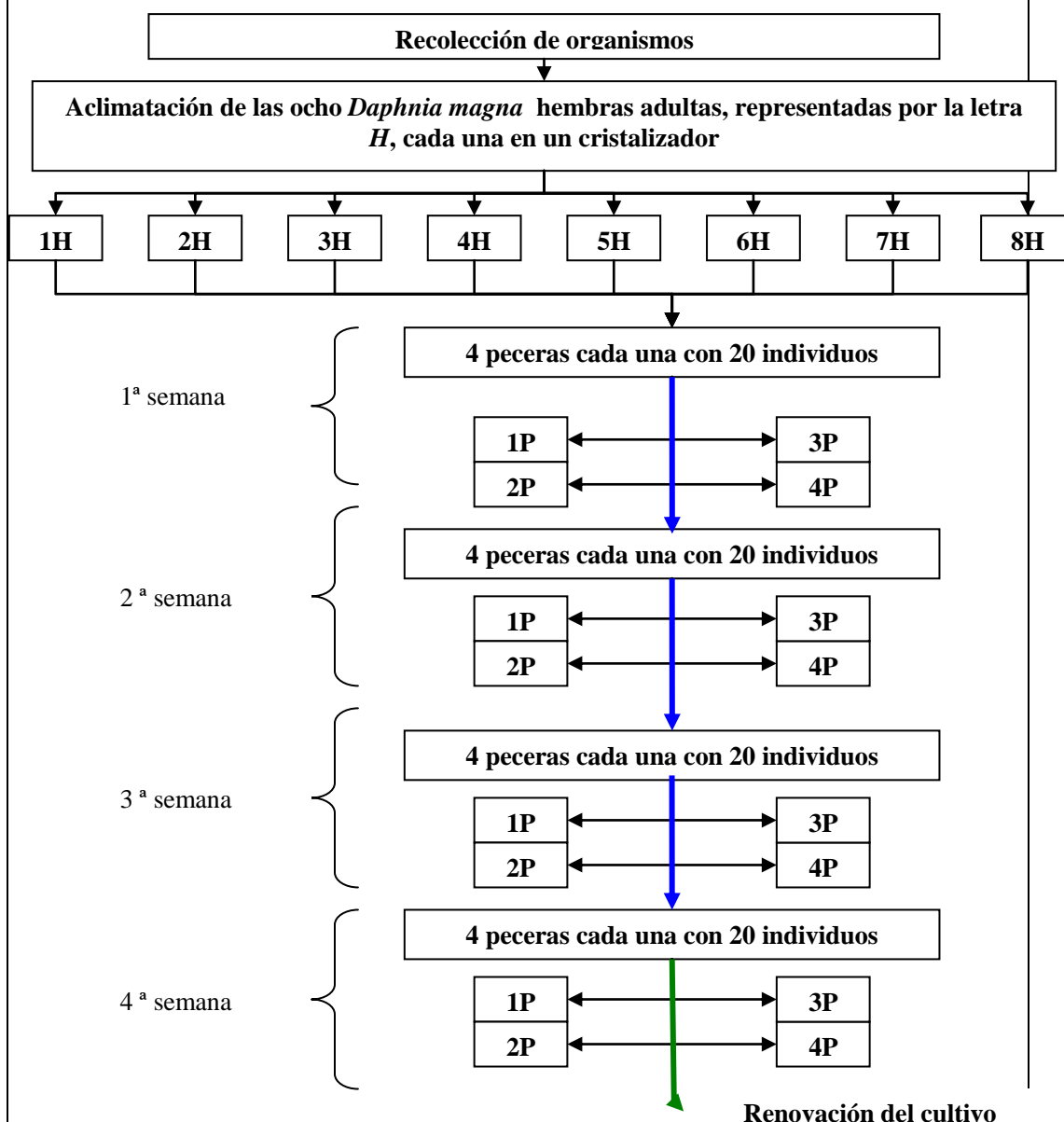
7. ANEXO D1: Mantenimiento, separación y conservación del cultivo en peceras





Fuente: Escobar Malaver, P. M. y García, E. , *Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando Daphnia magna*, Bogotá

 FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11	 LB11
		Pagina 11 de 12

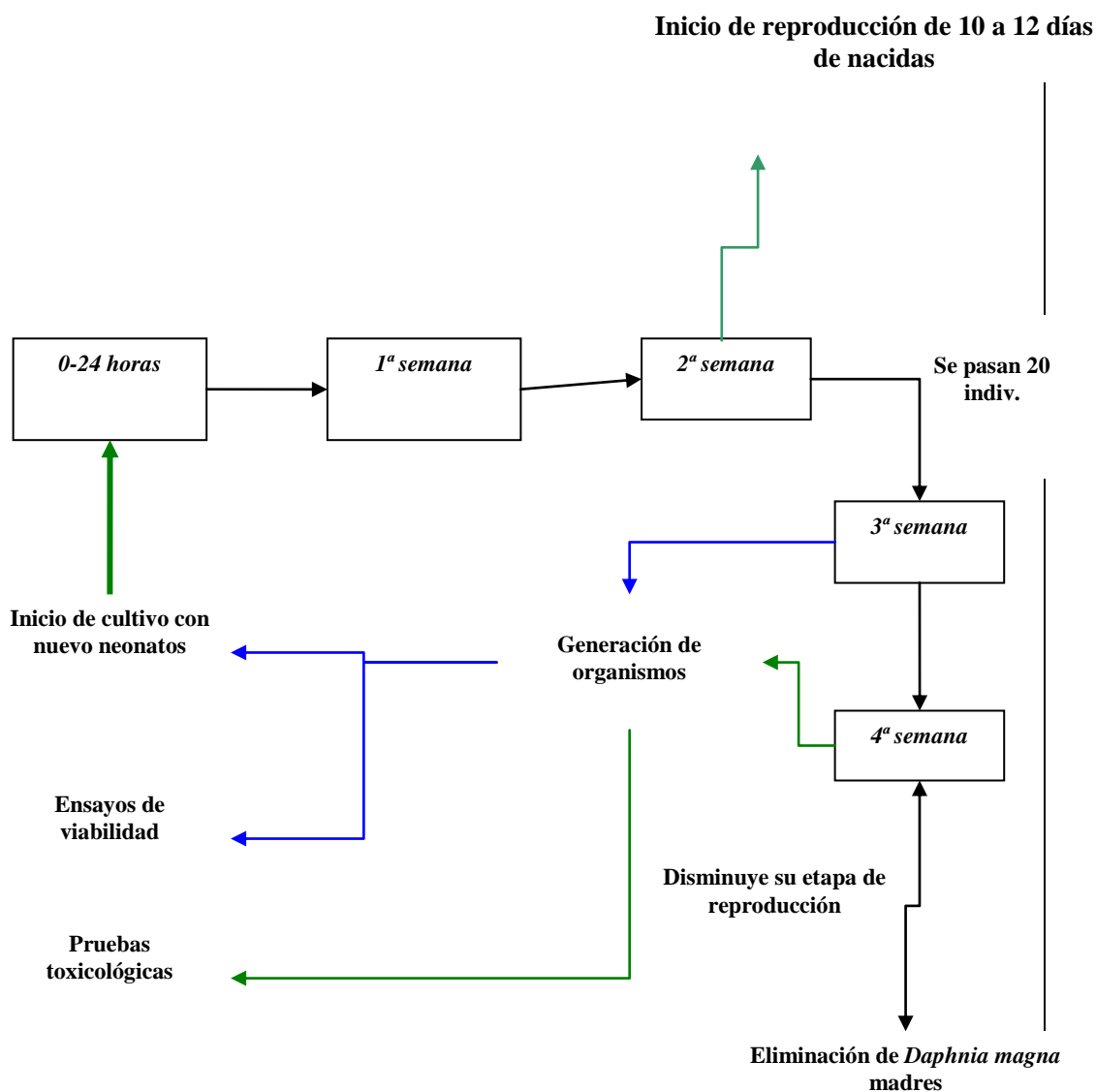
8. ANEXO D2: Ciclo de renovación del cultivo (*Daphnia magna*)



Fuente: Escobar Malaver, P. M. y García, E. , *Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando Daphnia magna*, Bogotá

	LABORATORIO DE BIOENSAYOS MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PARA DAPHNIA MAGNA PROTOCOLO LB11		
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA			LB11
			Pagina 12 de 12

ANEXO D3: Ciclo reproductivo de organismos de prueba (*Daphnia magna*)



Fuente: Escobar Malaver, P. M. y García, E. , *Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando Daphnia magna*, Bogotá