

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA (CE_{50}) DE
COBRE Y NIQUEL PARA LA SEMILLA *LACTUCA SATIVA* MEDIANTE
ENSAYOS DE TOXICIDAD**

DARWIN ERNEY DUARTE CASTRO

**Tesis de Grado para Optar al Título de
Ingeniera Ambiental y Sanitaria**

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

2009

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA (CE_{50}) DE
COBRE Y NIQUEL PARA LA SEMILLA *LACTUCA SATIVA* MEDIANTE
ENSAYOS DE TOXICIDAD**

DARWIN ERNEY DUARTE CASTRO 41021037

**Tesis de Grado para Optar al Título de
Ingeniera Ambiental y Sanitaria**

Director

**PEDRO MIGUEL ESCOBAR MALAVER
ING. QUIMICO INDUSTRIAL
LIC. QUIMICA Y BIOLOGIA**

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

2009

Nota de aceptación:

Firma de Director

Firma Jurado

Firma Jurado

Bogotá D.C., junio de 2009

Mil gracias doy a Dios por darme la oportunidad de conocer un mundo tan maravilloso lleno de conocimiento y oportunidades, doy gracias por la oportunidad y por el apoyo que me brindaron mis padres, las personas que me enseñaron lo valioso de la vida. A mi hermana quien siempre me ayudo en los momentos malos y celebro junto conmigo los buenos; para esa persona que es mi apoyo y que me llevo a cumplir metas inalcanzables.

Para mis amigos, compañeros en todos estos años siempre tuvimos buenas experiencias y llevare por siempre recuerdos invaluable de la U.

Agradezco a las personas que por su apoyo incondicional en el transcurso de la investigación generando un conocimientos técnicos, científicos refiriéndome al Ing. Pedro Miguel Escobar quien nunca dejó su vocación de docente y siempre nos indicaba el mejor camino para caminar la investigación; a mis padres quienes siempre me generaron una estabilidad económica con la que pude terminar la investigación y a Don Noel García quien me permitió la entrada a su empresa para la toma de muestra y realizar la investigación de mi tesis.

GLOSARIO

Bioensayo: Se emplean como herramientas para generar diagnósticos sobre los efectos que puede generar un agente toxico sobre un organismo definido. Bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Esta relación se puede determinar por (muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos).

Germinación: Se genera por medio del crecimiento del embrión una vez superado el periodo de latencia y cuando las condiciones de temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno y agua son las adecuadas se desarrolla la plántula y da comienzo el ciclo de vida.

Hipocotilo: Porción del tallo de un embrión o de la plántula situado entre los cotiledones y la radícula.

Radícula: Extremo basal del eje embrionario, raíz originada en la semilla y que dará la raíz primaria.

Lactuca sativa L. (Lechuga): Planta herbácea hortícola, propia de las regiones templadas, comestible que tiene una alta sensibilidad a la presencia de agentes extraños.

Agua residual: Desecho líquido proveniente de residencias, edificios, instituciones, fábricas o industrias. (RAS 2000, título A, Capítulo A.12)

Polutante: Es una sustancia que causa contaminación y por definición puede causar algún efecto peligroso.

Tóxico: Sustancia química que dependiendo de la concentración y tiempo de exposición produce alteraciones bioquímicas, fisiológicas, estructurales o la inhibición del organismo expuesto.

Toxicaridad: Se menciona como la posibilidad de que produzca toxicidad, así como el riesgo o peligrosidad, determinado por la probabilidad de que ocurra una acción toxica.

Toxicidad aguda: Efecto adverso (letal o subletal) expuesto a los organismos de ensayo en pruebas durante un periodo de exposición (usualmente de pocos días) del material de ensayo.

Tóxico de referencia: Compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en las pruebas.

Carta control: Gráfico utilizado para seguir cambios a través del tiempo del punto final medido para un compuesto tóxico de referencia. En el eje X se grafica el número de ensayo, y en el eje Y, la concentración tóxica efectiva.

CE₅₀/CI₅₀: Concentración efectiva o de inhibición media. Concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La CE₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

Dosis letal 50 (DL₅₀): Es la dosis única obtenida estadísticamente de una sustancia de la que cabe esperarse que, administrada por vía oral, cause la muerte a la mitad de un grupo de organismos en un tiempo determinado.

Contaminante: Se determina como una sustancia extraña, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de

actividad antrópica directa o indirecta. También se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, en lugares, formas, concentraciones y con una duración que sean nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal.

Control positivo: Evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos al momento en el cual se evalúa el material problema.

Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$): Es una sal de color intenso naranja, oxidante fuerte, en contacto con sustancias orgánicas puede provocar incendios.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Características de las semillas (*Lactuca sativa*).
- Tabla 2. Materia empleado en el ensayo con (*Lactuca sativa*)
- Tabla 3. Resultados de la (CE_{50}) de las pruebas de sensibilidad con dicromato de potasio.
- Tabla 4. Pruebas de sensibilidad.
- Tabla 5. Tratamiento Anova para las pruebas de sensibilidad.
- Tabla 6. Resultados Anova para las Pruebas de sensibilidad.
- Tabla 7. Resultados Anova para las Pruebas de sensibilidad.
- Tabla 8. Porcentaje de germinación dosis-respuesta.
- Tabla 9. Medidas del crecimiento para el radículo y el hipocotilo en las pruebas de sensibilidad.
- Tabla 10. La (CE_{50}) registrada con las pruebas de cobre.
- Tabla 11. Pruebas de cobre a partir de la sustancia pura.
- Tabla 12. Tratamiento Anova para pruebas de cobre a partir de la sustancia pura.
- Tabla 13. Resultado Anova para pruebas de cobre a partir de la sustancia pura.
- Tabla 14. Resultados Anova para todos las pruebas de cobre a partir de la sustancia pura.
- Tabla 15. Paralelo d la concentración vs germinación.
- Tabla 16. Medición del crecimiento para el radículo y el hipocotilo en pruebas de cobre a partir de la sustancia pura.
- Tabla 17. Inhibición media de la población afectada con níquel a partir de la sustancia pura.
- Tabla 18. Pruebas de níquel a partir de la sustancia pura.
- Tabla 19. Tratamiento Anova para pruebas de níquel a partir de la sustancia pura.
- Tabla 20. Resultado Anova para pruebas de níquel a partir de la sustancia pura.
- Tabla 21. Resultados Anova para todos las pruebas de níquel a partir de la sustancia pura.
- Tabla 22. Medición del crecimiento para el radículo y el hipocotilo en pruebas de níquel a partir de la sustancia pura.

Tabla 23. Inhibición media de la población para el vertimiento de cobre.

Tabla 24. Pruebas del vertimiento de cobre proveniente de Cromados del Caribe.

Tabla 25. Tratamiento Anova para pruebas de vertimiento de cobre.

Tabla 26. Resultados Anova para Pruebas de Vertimiento de cobre.

Tabla 27. Resultados Anova para Todas las pruebas del Vertimiento de cobre.

Tabla 28. Porcentaje de germinación vs concentración.

Tabla 29. Medición para el crecimiento de radículo y del hipocotilo en las pruebas del vertimiento de cobre.

Tabla 30. Inhibición media para las prueba con vertimiento de níquel.

Tabla 31. Pruebas del vertimiento de níquel proveniente de Cromados del Caribe.

Tabla 32. Tratamiento Anova para pruebas de vertimiento de níquel.

Tabla 33. Resultados Anova para Pruebas de Vertimiento de níquel.

Tabla 34. Resultados Anova para Todas las pruebas del Vertimiento de níquel.

Tabla 35. Porcentaje de germinación vs concentración.

Tabla 36. Medición para el crecimiento de radículo y del hipocotilo en las pruebas del vertimiento de níquel.

Tabla 37. Inhibición media para las prueba con el pre-tratamiento de cobre.

Tabla 38. Pruebas del pre-tratamiento de cobre.

Tabla 39. Tratamiento Anova para pruebas del pre-tratamiento de cobre.

Tabla 40. Resultados Anova para Pruebas del pre-tratamiento de cobre.

Tabla 41. Resultados Anova para Todas las pruebas del pre-tratamiento de cobre.

Tabla 42. Comparación de los porcentajes de germinación con las concentraciones del pre-tratamiento de cobre.

Tabla 43. Medición para el crecimiento del radículo y del hipocotilo en pruebas con el pre-tratamiento de cobre.

Tabla 44. Inhibición media para las prueba con el pre-tratamiento de níquel.

Tabla 45. Pruebas del pre-tratamiento de níquel.

Tabla 46. Tratamiento Anova para pruebas del pre-tratamiento de níquel.

Tabla 47. Resultados Anova para Pruebas del pre-tratamiento de níquel.

Tabla 48. Resultados Anova para Todas las pruebas del pre-tratamiento de níquel.

Tabla 49. Comparación de los porcentajes de germinación con las concentraciones del pre-tratamiento de níquel.

Tabla 50. Medición para el crecimiento del radículo y dl hipocotilo en pruebas con el pre-tratamiento de níquel.

Tabla 51. Rango de índice toxicológico.

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Carta Control para el dicromato de potasio.

Gráfica 2. Comparación Dosis Respuesta con dicromato de potasio.

Gráfica 3. Porcentaje de germinación para la sensibilidad con dicromato de potasio.

Gráfica 4. Medición para el crecimiento del radículo y del hipocotilo en las pruebas de sensibilidad.

Gráfica 5. Carta control del cobre a partir de la sustancia pura.

Gráfica 6. Dosis-respuesta del cobre.

Gráfica 7. Porcentaje de germinación para el cobre.

Gráfica 8. Medición para el crecimiento del radículo y del hipocotilo en las pruebas con cobre a partir de la sustancia pura.

Gráfica 9. Carta control del níquel a partir de la sustancia pura.

Gráfica 10. Dosis-respuesta del níquel.

Grafica 11. Porcentaje de germinación para el níquel.

Grafica 12. Medición para el crecimiento del radículo y del hipocotilo en las pruebas con níquel a partir de la sustancia pura.

Grafica 13. Carta control para el vertimiento de cobre.

Grafica 14. Dosis-respuesta en las pruebas con el vertimiento de cobre.

Grafica 15. Comparación de la germinación en las diferentes pruebas del vertimiento de cobre.

Grafica 16. Paralelo de la elongación en las diferentes pruebas con el vertimiento de cobre.

Grafica 17. Carta control para el vertimiento de níquel.

Grafica 18. Dosis-respuesta en las pruebas con el vertimiento de níquel.

Grafica 19. Comparación de la germinación en las diferentes pruebas del vertimiento de níquel.

Grafica 20. Medición para el crecimiento del radículo y del hipocotilo en las pruebas con vertimiento de nique.

Grafica 21. Carta control para el pre-tratamiento del vertimiento de cobre.

Grafica 22. Dosis-respuesta en las pruebas con el pre-tratamiento del vertimiento de cobre.

Grafica 23. Comparación de la germinación en las diferentes pruebas con el pre-tratamiento del vertimiento de cobre.

Grafica 24. Medición para el crecimiento del radículo y del hipocotilo en las pruebas con el pre-tratamiento del vertimiento de cobre.

Grafica 25. Carta control para el pre-tratamiento del vertimiento de níquel.

Grafica 26. Dosis-respuesta en las pruebas con el pre-tratamiento del vertimiento de níquel.

Grafica 27. Comparación de la germinación en las diferentes pruebas con el pre-tratamiento del vertimiento de níquel.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Foto 1. Germinación en pruebas toxicas.
- Foto 2. Ubicación de cromados del Caribe.
- Foto 3. Instalaciones de cromados del Caribe.
- Foto 4. Montaje de las pruebas de sensibilidad.
- Foto 5. Elaboración, montaje de la siembra.
- Foto 6. Medición de los efectos e los organismos.
- Foto 7. Montaje de las sustancias puras.
- Foto 8. Medición del efecto toxico.
- Foto 9. Puntos de muestra en la industria galvánica.
- Foto 10. Inhibición total en los diluciones iniciales.
- Foto 11. Siembra de las semillas.
- Foto 12. Medición del efecto toxico.
- Foto 13. Montaje del pre-tratamiento para níquel y cobre.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Semillas germinadas.

Figura 2. Proceso d germinación.

Figura 3. Estructura de las pruebas de toxicología utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

Figura 4. Pruebas de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Aspectos ambientales, efluentes de la industria.

Diagrama 2. Preparación de diluciones.

Diagrama 3. Diluciones de Sustancias puras.

Diagrama 4. Diagrama de la metodología.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Análisis De Resultados, Mediante El Método De Probit.

ANEXO B. Análisis Varianza (Anova)

ANEXO C. Resultados de las Concentración de Cobre y de Níquel de los Vertimientos Obtenidos por la Industria.

ANEXO D. Resultados Concentración d Cobre y Níquel del Vertimiento Pre-Tratado en Laboratorio.

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis investigativa se desarrollo el estudio de los efectos fitotoxicos que puede generar los vertimientos de una empresa galvánica, específicamente los vertimiento de Cobre y de Níquel frente a un sistema de organismos específicos como lo es la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*), por medio de baterías de ensayos las cuales asimilaran el medio de impacto con el agente toxico y los organismos expuestos.

Para establecer las características fitotóxicas que pueden desarrollar los bioindicadores por la presencia de un agente toxico se emplearon 20 pruebas iniciales con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), para un tipo especifico de organismos como son las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), con el propósito de determinar la sensibilidad de las semillas al momento de exponer el organismo al agente toxico ya mencionado. Por medio de estas pruebas se obtuvieron diferentes promedios de germinación en las semillas el cual fue menor que el propuesto dentro de sus características, dándose un crecimiento del 81% evidenciando que la exposición con el agente toxico redujo en casi un 15% la germinación de las semillas. Asimismo se comprueba que la semilla (*Lactuca sativa*) es un organismo propicio para este tipo de estudios por su fragilidad a varianzas dentro de su medio de desarrollo.

Las diferentes pruebas de este investigación determinan los efectos tóxicos que desarrollan los vertimientos de una empresa galvánica, se manejaron de la siguiente forma.

Se realizaron 50 bioensayos durante el desarrollo del trabajo investigativo, los cuales fueron divididos en cuatro fases o pasos. El primero desarrollo 20 pruebas de sensibilidad, estas pruebas se desarrollaron con dicromato de potasio para determinar el nivel de inhibición de los organismos expuestos. El segundo contó con 10 pruebas para cada uno de los contaminantes estudiados, se emplearon

estas pruebas para obtener el nivel de inhibición con las sustancias puras para cada una de ellas. La tercera empleo 5 pruebas con los vertimientos sin pre-tratamiento los cuales se realizaron para obtener la concentración de inhibición CE_{50} en que se encuentra los vertimientos analizados y el paso final manejó 5 pruebas de los vertimientos con pre-tratamiento para tener un sistema comparativo de un antes y un después del pre-tratamiento en los vertimientos.

Con el desarrollo de la investigación, se determinó la CE_{50} para el Dicromato de Potasio, sustancias puras, vertimientos de Níquel y Cobre, y para el pre-tratamiento de estos vertimientos que el planteamiento de la investigación desarrollaba por medio de Bioensayos. Fue el más adecuado por la eficiencia que emplean los organismos utilizados dentro de la investigación, así mismo los datos recopilados en cada una de las pruebas las cuales toman un tiempo de 120 horas que era el tiempo de exposición del agente tóxico. Y se convierte en una herramienta muy útil en el control y verificación de la concentración tóxica de los vertimientos industriales, ya que brinda resultados de manera inmediata y tienen un bajo costo al momento de ser implementados para el reconocimiento de estos efectos tóxicos.

ABSTRACT

In this thesis work is investigative study phytotoxic effects that can generate the inputs of an electroplating company, specifically the dumping of copper and nickel compared to a system of specific agencies such as the seeds of lettuce (*Lactuca sativa*), in half battery of tests which assimilate the impact of toxic agents and with the exposed organisms.

To set the feature can be phytotoxic to develop biomarkers for the presence of a toxic agent used 20 initial tests with potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), for a specific type of organisms such as seeds of lettuce (*Lactuca sativa*), with to determine the sensitivity of the seeds when exposing the body to toxic agents mentioned above. Through these tests was the average germination of seeds which was lower than the one proposed in their characteristics, with a growth of 81% showing that exposure to toxic agents reduced by nearly 15% germination of seeds. It also found that the seed (*Lactuca sativa*) is an agency for such studies to their frailty variances within their development environment.

The different tests of this investigation to determine the toxic effects of discharges develop an electroplating company, they were managed as follows.

50 bioassays were performed during the development of research, which were divided into four phases or steps. The first included 20 tests for sensitivity tests were conducted with potassium dichromate to determine the level of inhibition of exposed organisms. The second included 10 tests for each of the pollutants studied, these tests were used to obtain the level of inhibition with the pure substances to each of them. The third had 5 tests discharges without pre-treatment which were made for inhibition concentration CE_{50} that dumping is analyzed and the final 5 tests handling of dumps with pre-treatment system to have a comparative of a before and after pre-treatment discharges. With the development of the investigation, the CE_{50} for potassium dichromate, pure

substances, dumping of nickel and copper, and the pre-treatment of these discharges that the approach to research conducted by Bioassays. It was the best for the efficiency employing agencies used in research, as well as data collected in each of the tests which took a while for that 120 hours was the time of exposure of toxic agents. And becomes a useful tool in monitoring and verification of the concentration of toxic industrial dumping, as it provides immediate results and have a low cost at the time of being implemented for the recognition of these toxic effects.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
1. OBJETIVOS	4
1.1 OBJETIVO GENERAL	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 INVETIGACION AMBIENTAL	5
2.2 PLANTAS INVOLUCRADAS EN EL MANEJO DE LA NVESTIGACION	5
2.2.1 Semilla y su comportamiento	7
2.2.2 Germinación de la planta	8
2.2.3 Introducción a la germinación	10
2.2.4 Formación de la plántula	11
2.3 TOXICOLOGIA	12
2.3.1 Compuesto tóxico	12
2.3.2 Dosis letal media (DL ₅₀)	13
2.3.3 Concentración letal media (CL ₅₀)	13
2.3.4 Concentración de inhibición letal media (CE ₅₀)	13
2.3.5 Clasificación de los agentes tóxicos	13
2.3.6 Tipos de exposición	14

2.3.6.1 Exposición aguda	15
2.3.6.2 Exposición repetitiva	16
2.4 ECOTOXICOLOGÍA AMBIENTAL	16
2.5 ENSAYOS DE TOXICIDAD O BIOENSAYOS	19
2.5.1 Criterios generales de selección	22
2.5.2 Bioensayos en el medio ambiental	23
2.5.3 Manejo del tóxicos de referencia	24
2.5.4 Pruebas de sensibilidad	24
2.5.5 Carta control	25
2.5.6 Evaluación de aspectos (CL ₅₀ , CE ₅₀ , CI ₅₀ , NOEC, LOEC)	26
2.5.7 Curva dosis-respuesta	27
2.6 BIOENSAYOS CON PLANTAS	27
2.6.1 Fitotoxicidad en las plantas	30
2.6.2 Bioconcentración	31
2.6.3 Bioacumulación	31
2.6.4 Biomagnificación	31
2.6.5 Bioestimulación	31
2.6.7 Necrosis	32
2.6.8 Ensayo de toxicidad con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	32
2.7 CONTAMINACIÓN DEL MEDIO ACUÁTICO	33
2.7.1 Tipos de contaminantes acuáticos	34
2.7.1.1 Contaminantes químicos	34
2.7.1.2 Contaminantes físicos	34
2.7.1.3 Índice de calidad	35
2.7.2 Toxicidad del efluente	36
2.7.2.1 Cobre	36
2.7.2.2 Níquel	37

2.8 ANALISIS ESTADISTICO	38
2.8.1 Análisis por método probit	38
2.8.2 Análisis de varianza (Anova)	38
 2.9 INDUSTRIA GALVANICA	 38
2.9.1 Descripción del sector galvánico	39
2.9.2 El proceso galvánico	39
 2.10 MARCO NORMATIVO	 40
 3. METODOLOGÍA	 42
 3.1 PRIMERA ETAPA	 42
3.1.1 Diseño general de las pruebas eco-toxicológicas	42
3.1.1.1 Variable independiente	42
3.1.1.2 Variable dependiente	42
3.1.1.3 Constantes	43
3.1.2 Esquema general del procedimiento pruebas toxicológicas con semillas	43
3.1.3 Reactivos y material	44
3.1.3.1 Selección material biológico	44
3.1.3.2 Tóxico de referencia	45
3.1.3.3 Material de laboratorio seleccionado	46
3.1.4 Montaje de las pruebas de sensibilidad	48
3.1.4.1 Preparación de diluciones	48
3.1.4.2 Siembra de semillas	49
3.1.4.3 Medición de efectos	50
 3.2 SEGUNDA ETAPA	 50
3.2.1 Montaje de las pruebas sustancias puras	50
3.2.2 Preparación de las diluciones	51

3.2.3 Siembra de semillas	52
3.2.4 Medición de efecto	52
3.2.5 Caracterización del vertimiento	53
3.2.5.1 Técnicas utilizadas	53
3.3 TERCERA ETAPA	54
3.3.1 Montaje de pruebas para el vertimiento	54
3.3.1.1 Preparación de diluciones	54
3.3.1.2 Siembra de semillas	55
3.3.1.3 Medición de efecto toxico	55
3.3.2 Implementación del pre-tratamiento a nivel laboratorio para los Vertimientos de cobre y níquel	55
3.3.2.1 Montaje de las pruebas con el pre-tratamiento	57
3.3.2.2 Preparación de las diluciones	57
3.3.2.3 Siembre de las semillas	57
3.3.2.4 Medicion del efecto toxico	57
3.4 CUARTA ETAPA	57
3.4.1 Determinación del efecto toxico potencial del vertimiento sin tratar Y pre-tratado	57
3.4.2 Diagrama de la metodología	59
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	60
4.1 Pruebas de sensibilidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)	60
4.1.1 Valor de la concentración efectiva media (CE_{50})	61
4.1.2 Carta control para el dicromato de potasio	62
4.1.3 Análisis Anova para la pruebas las pruebas fitotóxicas con ($K_2Cr_2O_7$)	64
4.1.4 Relación dosis-respuesta con ($K_2Cr_2O_7$)	66
4.1.5 Medición del radículo y del hipocotilo para pruebas de ($K_2Cr_2O_7$)	69
4.2 ANALISIS DE PRUEBAS TOXICOLOGICAS DE COBRE Y NIQUEL A PARTIR DE LAS SALES (SULFATO DE COBRE, SULFATO DE NIQUEL)	71

4.2.1 Bioensayos realizados a partir de sustancias puras	71
4.3 VALOR DE LA CONCENTRACION MEDIA DE LA INHIBICION PARA COBRE A PARTIR DE LA SUSTANCIA PURA	72
4.3.1 Carta control para el cobre a partir de la sustancia pura	73
4.3.2 Anova de cobre a partir de la sustancia pura	75
4.3.3 Relación dosis-respuesta para el cobre	76
4.3.4 Tabal de germinación para el cobre	77
4.3.5 Medición de la longitud del radículo y del hipocotilo para cobre	78
4.4 VALOR DE LA CONCENTRACION MEDIA DE LA INHIBICION PARA NIQUEL A PARTIR DE LA SUSTANCIA PURA	80
4.4.1 Carta control para el níquel a partir de la sustancia pura	81
4.4.2 Anova de níquel a partir de la sustancia pura	83
4.4.3 Relación dosis-respuesta para el niquel	84
4.4.5 Medición de la longitud del radículo y del hipocotilo para níquel	89
4.5 VALOR DE LA CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA PARA EL VERTIMIENTO DE COBRE	88
4.5.1 Carta control para el vertimiento de cobre de la ind, galvánica	89
4.5.2 Anova para el vertimiento de cobre	91
4.5.3 Relación dosis-respuesta para el vertimiento de cobre	92
4.5.4 Tabla de germinación para el vertimiento de cobre	94
4.5.5 Medición de la longitud del radículo y del hipocotilo para el vert, cobre	94
4.6 VALOR DE LA CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA PARA EL VERTIMIENTO DE NIQUEL	96
4.6.1 Carta control para el vertimiento de níquel de la ind, galvánica	96
4.6.2 Anova para el vertimiento de níquel	98
4.6.3 Relación dosis-respuesta para el vertimiento de níquel	99
4.6.4 Tabla de germinación para el vertimiento de níquel	101
4.6.5 Medición de la longitud del radículo y del hipocotilo para el vert, níquel	101

4.7 PROCESO DE PRE-TRATAMIENTO PARA LOS VERTIMIENTOS DE COBRE Y NIQUEL	103
4.7.1 valor de concentración efectiva media para el pre-tratamiento de cobre	103
4.7.2 Carta control para el pre-tratamiento de cobre de la ind, galvánica	104
4.7.3 Anova para el pre-tratamiento de cobre	106
4.7.4 Relación dosis-respuesta para el pre-tratamiento de cobre	107
4.7.5 Tabla de germinación para el pre-tratamiento de cobre	108
4.7.6 Medición de la longitud del radículo y del hipocotilo con el pre-tratamiento de cobre	109
 4.8 VALOR DE LA CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA PARA EL PRE-TRATAMIENTO DE NIQUEL	 111
4.8.1 Carta control para el pre-tratamiento de níquel de la ind, galvánica	112
4.8.2 Anova para el pre-tratamiento de níquel	113
4.8.3 Relación dosis-respuesta para el pre-tratamiento de níquel	114
4.8.4 Tabla de germinación para el pre-tratamiento de níquel	116
4.8.5 Medición de la longitud del radículo y del hipocotilo con el pre-tratamiento de níquel	117
 4.9 DETERMINACION DEL INDICE D EFECTO TOXICO POTENCIAL PARA EL COBRE Y NIQUEL	 118
4.9.1 Indicé toxicológico del vertimiento de cobre	118
4.9.2 Indicé toxicológico del pre-tratamiento de cobre	119
4.9.3 Indicé toxicológico del vertimiento de níquel	120
4.9.4 Indicé toxicológico del pre-tratamiento de níquel	121
 5. CONCLUSIONES	 123
 6. RECOMENDACIONES	 126
BIBLIOGRAFÍA	127
ANEXOS	129

INTRODUCCION

El desarrollo industrial cada día es aún mayor para poder satisfacer las necesidades de los seres humanos, este tipo de desarrollo solo se puede realizar con una fuente de materia prima la cual recae la mayoría de las veces en los recursos naturales. Con el incremento y uso irracional de los recursos naturales durante la fabricación de diferentes elementos los cuales degradan el medio por su mal manejo y disposición final impactando sobre recursos fundamentales como lo son el agua, suelo con los vertimientos y el aire con las emisiones atmosféricas. Con la contaminación generada en estos procesos se ha establecido diferencias en el ambiente que preocupan a la población y exigen medidas de control y prevención con el fin de reducir los efectos en el medio, para asegurar un futuro a las generaciones venideras.

Como proceso de prevención y control se establecieron los bioensayos, los cuales emplean unos bioindicadores que dependen de las características del agente tóxico, se puede escoger el más efectivo para determinar los posibles efectos tóxicos que se pueden desarrollar en la exposición con la semilla. Son procesos económicos "el uso de material es mínimo" y su rapidez es una de sus mayores virtudes "el tiempo de exposición es de 120 horas".

Con la presente investigación se determina la Concentración de inhibición media (CE_{50}) durante la exposición con los diferentes agentes tóxicos con los que se estableció esta investigación frente al bioindicador determinado por sus cualidades de germinación y pureza denominado semilla de lechuga Batavia (*Lactuca sativa*). Se establecen las diferencias durante cada una de las fases y se encuentran los índices de efecto tóxico con cada uno de los agentes tóxicos como son el dicromato de potasio, sulfato de cobre, sulfato de níquel, vertimiento de cobre, vertimiento de níquel, vertimiento pre-tratado de cobre y vertimiento pre-tratado de níquel.

JUSTIFICACION

El incremento en las descargas de los vertimientos con diferentes mezclas de contaminantes como son los metales pesados de procesos industriales los cuales son vertidos en alcantarillado público o en cuerpos de agua o medios de afectación por su biodiversidad en fauna y flora. Generando daños inmediatos, mutaciones y llegando a la inhibición de las semillas presentes en el medio.

Con el fin de garantizar la protección de estos medios y las semillas expuestos en los mismos, se establece el potencial tóxico de las sustancias estudiadas durante esta investigación. Con el fin de determinar el potencial tóxico se desarrollaron 50 bioensayos con las respectivas sustancias de la investigación y los bioindicadores, estos generan efectos visibles en el desarrollo de los bioindicadores durante la exposición indicando hasta cuales niveles los ecosistemas pueden soportar la influencia de los contaminantes sin generar una inhibición de más del 50% de las semillas expuestas.

1. OBJETIVOS

1.2 OBJETIVO GENERAL

- ♦ Determinar la concentración de Inhibición media (CE_{50}) de Níquel y Cobre para la semilla *Lactuca Sativa* mediante ensayos de toxicidad.

1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ♦ Realizar pruebas de sensibilidad, con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), en las semillas Batavia (*Lactuca sativa*) determinando la concentración de inhibición media en 120 horas.
- ♦ Determinar los patrones de los metales a estudiar.
- ♦ Realizar pruebas de toxicidad, con el vertimiento de Cobre y Níquel proveniente de la industria galvánica, en las semillas *Lactuca sativa*.
- ♦ Realizar el pre-tratamiento para los vertimientos, de la industria galvánica reduciendo la concentración de inhibición media de cobre y níquel.
- ♦ Determinar por medio de las pruebas fitotóxicas, el efecto tóxico potencial para los contaminantes establecidos en la investigación.

2 MARCO TEORICO

2.1 INVESTIGACIONES EN EL ORDEN AMBIENTAL

Por medio de la relación establecida entre el ecosistema y cultura, se desarrollan las investigaciones en el orden de la fitotoxicidad, para determinar las diferencias que pueden desarrollar los semillas del medio, donde se incluyen el aire, el agua, el suelo, los recursos naturales, las flores, la fauna, los seres humanos, y su interrelación.

El medio ambiente se refiere a todo lo que rodea a los seres vivos pero este puede generar afectaciones directas o indirectas, que incluyen los impactos establecidos por el desarrollo económico e industrial. El desarrollo de las industrias en las grandes ciudades y en las cabeceras municipales ha generado que las entidades ambientales, instituciones y laboratorios desarrollen nuevas investigaciones para determinar los niveles máximos permisibles que pueda verter una industria al medio ambiente sin provocar daños inmediatos o potenciales que puedan degradar un recurso natural.

Una de las investigaciones utilizadas para la determinación de estos niveles es el manejo de prueba por medio de bioensayos o pruebas de Fitotoxicidad para los diferentes contaminantes provenientes de diversas actividades industriales, la sensibilidad de los semillas utilizados dentro de estas pruebas son fundamentales ya que se toma material biológico, con una alta sensibilidad garantizando el éxito de las mismas.

2.2 PLANTAS INVOLUCRADAS EN EL MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN

El manejo de las plantas, como se observa en las recientes investigaciones, se manifiesta como una opción representativa, de tal modo que las plantas forman parte de bioindicadores sensibles a los cambios ambientales presentados por contaminantes en el entorno y a su vez forjando posibles daños dentro de su estructura física además de llegar a la posible inhibición total de la planta, por la

absorción de estos contaminantes a través del medio acuático generando un indicador visual.

Lactuca Sativa L. (Lechuga)

Figura 1: Semillas germinadas



Fuente: Autor (2009)

Es una planta herbácea donde sus principales características son los tallos, hojas verdes prolongadas redonda y crujiente que forma un cogollo compacto. Se van haciendo variedades más resistentes que pueden cultivarse en lugares de clima frío o templado. Dentro de su taxonomía se identifican¹:

- ♦ **Raíz:** Es la primera de las partes embrionarias que se desarrolla durante la germinación de la semilla; se distingue primero con una porción poco diferenciada la **radícula**, con una cubierta en su punta la **coleorhiza**, esto forma la raíz en su parte inicial.
- **Hojas:** Órgano de las plantas especializado en la fotosíntesis que crece en las ramas o el tallo, generalmente de color verde, ligera, plana y delgada, y que puede tener diversas formas dependiendo de la especie
- **Tallo:** Este tiene una formación cilíndrica y ramificada de poca longitud debido a la parte genética de la especie.
- ♦ **Semillas:** es la pepita cuyo nombre es espermatofitas las cuales están provistas con todo el material genético que debe emplear el desarrollo de una planta.²

¹ [http:// www.euroresidentes.com/Alimentos/lechuga.htm](http://www.euroresidentes.com/Alimentos/lechuga.htm).

² <http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>

2.2.1 Semillas y su comportamiento. La semilla es una unidad de diseminación y reproducción sexual que se desarrolla a partir de los óvulos. Para que una semilla se desarrolle debe producirse en primer lugar una polinización, llegada del grano de polen al estigma de la flor, seguida de la fecundación del óvulo se forma una envoltura seminal donde se encuentran las semillas. A través de este proceso se traspasa toda la información genética, protección a medios adversos y el alimento principal para generar las fases iniciales de la planta.

La estructura de las semillas en su parte exterior presenta las siguientes cualidades, una corteza fuerte leñosa y sólida, con esta estructura se protege el embrión. La mayoría de las semillas solo tiene un embrión pero algunas plantas como lo son los cítricos poseen más de uno. Esto da a lugar al desarrollo de la fertilización del huevo dentro del ovulo y los tamaños de la semilla puede ser diferente dependiendo de la información genética de la especie fertilizada, el tamaño puede estar entre una cabeza de alfiler en un girasol o la enorme semilla del aguacate: las semillas según su especie pueden variar cualidades como son el olor, color, textura y forma.

El manejo de las semillas es importante como fuente de transporte para la reproducción de las plantas. La semilla presente una planta en miniatura (embrión) que a su vez se divide en *epicolito* e *hipocotilo*. El epicolito formará todas las partes inferiores del tallo y las raíces. El embrión se rodea de alimento almacenada (cotiledón en los frijoles o judías endospermo en el maíz), y de una cubierta envolvente final denominada envoltura seminal. El hecho de que todas las semillas dispongan de un suministro tan importante de nutrientes almacenados, explica el valor tan alto que se le da para la alimentación humana y animal. La dura cubierta de la semilla protege a la diminuta planta que hay en su interior para hacer frente a las adversidades físicas y a la pérdida de humedad.³

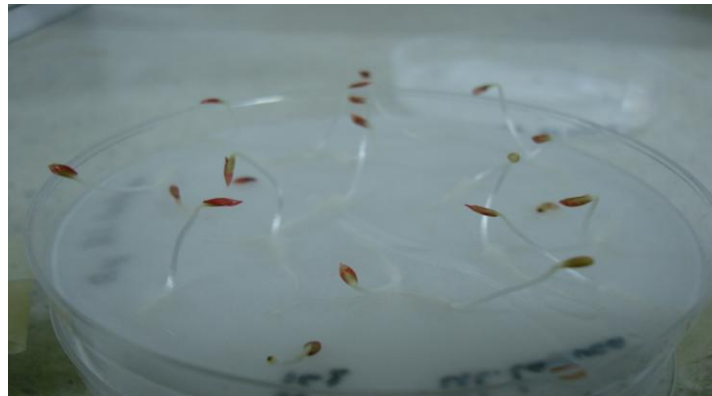
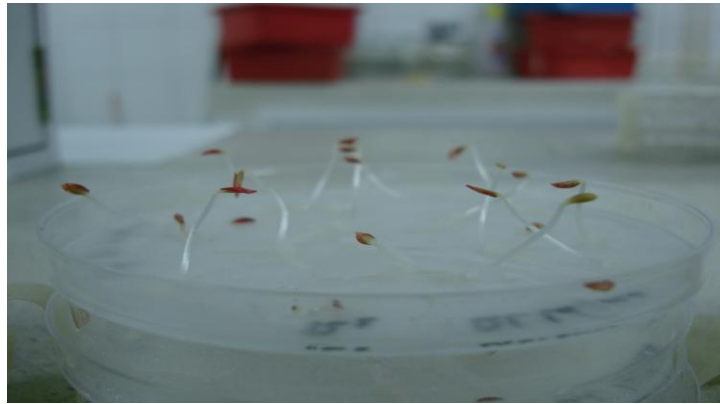
³ Pinto Vargas, Laura Cristina; Determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀) de Cromo para la semilla *LACTUCA SATIVA* mediante ensayos de toxicidad en la ciudad de Bogotá 2009, Unisalle Facultad De Ingeniería Ambiental y Sanitaria.

2.2.2 Germinación de las plantas. Con la germinación de la planta se da el rompimiento de la envoltura seminal, por medio de factores ajenos a la planta, como lo es la humedad y la temperatura; las cuales generan un espacio adecuado para su germinación. La semilla sirve como recipiente de almacenamiento del embrión y su alimento, con los cuales se alimentara el embrión en su inicio. De igual forma el epicolito crece en forma ascendente, por fuera del suelo, con el objetivo de dar forma a la planta en su parte exterior con su tallo y hojas, al mismo tiempo se presenta el crecimiento del epicolito en la parte superior; de igual forma sucede en la parte inferior con el hipocotilo desarrollándose a profundidad y reproduciendo así las raíces de esta planta; se determina que el hipocotilo responde negativamente a la gravedad.

Para llegar a la formación de la planta el embrión debe sobre pasar las siguientes fases:

1. **Fase de hidratación:** La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.
2. **Fase de germinación:** Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.
3. **Fase de crecimiento:** Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria.

Foto 1. Germinación en pruebas toxicas



Fuente: Autor (2009)

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto interesante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla. La primera fase se produce tanto en semillas vivas y muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas.

Por tanto los factores externos que activan el metabolismo, como la temperatura, tienen un efecto estimulante en la última fase.

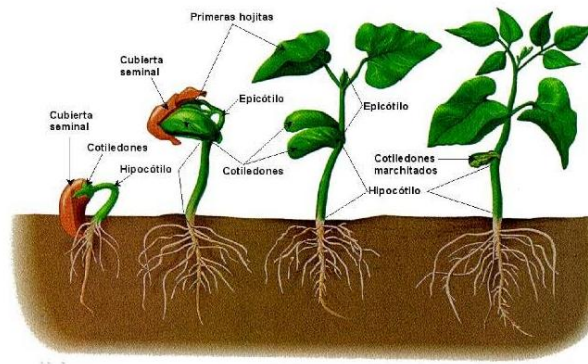
2.2.3 Introducción a la germinación. Para que el proceso de germinación, es decir, la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla, tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y, una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula.

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la ruptura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula. Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, incluso cuando se encuentran en condiciones favorables. Esto es debido a que las semillas se encuentran en estado de latencia. Por ello, mientras no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que llegado un momento, pierda su capacidad de germinar.

Cuando una semilla germina, la primera estructura que emerge, de la mayoría de las especies, después de la rehidratación de los diferentes tejidos es la radícula. En aquellas semillas, en las que la radícula no es el primer acontecimiento morfológico, se consideran otros criterios para definir la germinación como: la emergencia del coleoptilo en granos de cereales; la obtención de plantas normales; o el aumento de la actividad enzimática, tras la rehidratación de los tejidos. ⁴

⁴ www.etsmre.upv.es

FIGURA 2. Procesos de Germinación



FUENTE: <http://www.educared.net/aprende/anavegar8/profes/unidades/>

2.2.4 Formación de la plántula. Se define plántula a la aparición de la primera hoja que emerge de la semilla germinada; inicia la generación de funciones adecuadas por cada una de las partes recién formadas de la nueva planta, como es la absorción de nutrientes por la raíz y la fotosíntesis por parte de las hojas con la cual la plántula podrá elaborar su alimento además de mantener un desarrollo adecuado.

En el proceso de la planta puede llegar a presentarse, dos puntos críticos, denominados: **hipogea** o **epigea**, en el primero se da el crecimiento por debajo de la superficie y en el segundo el crecimiento se da en un punto superior a la superficie del suelo; la raíz es parte importante de la plántula por las diversas funciones que desempeña, como son la absorción de los nutrientes y agua, el anclaje de la planta al suelo son funciones necesarias para el pleno desarrollo de la planta.⁵

2.3 TÓXICOLOGIA

El desarrollo extremadamente rápido de la toxicología y del la ecotoxicología apareció a partir de los años 1960 al mismo tiempo la toxicología experimental se

⁵ Pinto Vargas, Laura Cristina; Determinación de la concentración de inhibición media (CE_{50}) de Cromo para la semilla *LACTUCA SATIVA* mediante ensayos de toxicidad en la ciudad de Bogotá 2009, Universidad De La Salle Facultad De Ingeniería Ambiental y Sanitaria.

ha beneficiado de los avances de la química analítica, que actualmente permiten medir concentraciones del orden de partes por millón. De aquí han surgido nuevas ramas como es la química ambiental y la química ambiental analítica, cuyo apoyo es esencial para la toxicología ambiental.

La mayor atención que se presentan en estos temas ha permitido descubrir nuevos agentes tóxicos, nuevos mecanismos de acción y, en general, ha dado un impulso importante a la toxicología como un todo, igualmente se ha desarrollado el interés en la prevención y control de los accidentes industriales que pueden afectar a las personas.

Se reconoce que las sustancias químicas tiene efectos químicos, físicos y biológicos sobre el ambiente y los seres vivos, que estos efectos pueden ser directos o indirectos y que, muchas veces, son el resultado de exposición crónica a cantidades muy bajas, por lo cual no pueden detectarse de inmediato o por los métodos usuales. Esto ha tenido como consecuencia que se desarrolle y que se acepte como regla para las acciones de la industria y los gobiernos el principio de precaución y a que en muchos países, se establezca políticas oficiales para la producción, uso y manejo de sustancias químicas. Aunque dichas políticas reconocen la importancia de estas sustancias para la economía actual, también toma sus múltiples riesgos y parte de ellos para mejorar el control de estas sustancias.⁶

2.3.1 Compuesto tóxico. Es aquel capaz de dañar un sistema biológico, interfiriendo su funcionamiento normal o provocando su muerte. Sin embargo, esta definición por sí misma podría extenderse a cualquier sustancia, ya que todas las sustancias poseen la capacidad de dañar un sistema biológico, si la dosis es suficientemente alta. Por consiguiente, la propia definición de compuesto tóxico debe incluir un componente cuantitativo que permita diferenciar su potencia para causar efectos adversos en los sistemas biológicos expuestos.

⁶ Centro Panamericano De Ecología Humana y Salud División de Salud Ambiental; (2003) Introducción a la Toxicología Ambiental. ED. Dra. Lilia, Albert

2.3.2 Dosis letal media (DL₅₀): Calculada estadísticamente, de un agente químico o físico que se espera que mate el 50% de las semillas de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

2.3.3 Concentración Letal Media (CL₅₀). Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que mate el 50% de las semillas de una población bajo el conjunto de condiciones definidas.

2.3.4 Concentración de Inhibición letal media (CE₅₀). Concentración estadísticamente derivada de una sustancia química en el que, según se puede pronosticar, causará un efecto no letal definido del 50% de una población dada de semillas bajo un conjunto definido de condiciones experimentales.

2.3.5 Clasificación de los agentes tóxicos. Los agentes tóxicos se pueden clasificar de varias maneras:

♦ **Por su origen.**

Vegetales. El reino vegetal está lleno de muchos y variados tóxicos entre ellos tenemos: la nicotina y morfina.

Animales. Entre los venenos de animales figuran entre otros, el veneno de la serpiente, de insectos y anfibios.

Los tóxicos ambientales pueden igualmente clasificarse de acuerdo con su origen en:

- *Vegetales:* Algas y polen.
- *Animales:* Excremento humano y animales.
- *Minerales:* Metales, asbesto presente en las minas, nitratos en las aguas.

♦ **Por su estado físico.**

Gases, vapores, nieblas; gas natural, gas propano, acetileno, entre otros; líquidos volátiles y no volátiles. La mayoría de solventes son volátiles; sólidos; polvos, partículas; semi-lodos por ultimo lodos.

♦ **Por su estructura química.**

De acuerdo con su estructura química, es decir, se tiene en cuenta su función química, ácidos, álcalis, alcoholes, aminas, aldehídos, éteres, hidrocarburos, fenoles, etc.

♦ **Por efecto que produce en la semilla.**

De efecto local: Es aquel que se produce al primer contacto con la semilla; el daño está circunscrito al lugar de contacto entre la semilla y el agente tóxico.

Generalmente son tóxicos gaseosos, vapores de líquidos volátiles o sustancias altamente corrosivas las que producen alteraciones de la piel.

De efecto sistémico: Ocurre en distintos lugares de aquel por el que el agente tóxico penetra en el cuerpo, es decir, deberá ingresar al interior de la semilla a través de las diferentes vías; requiere absorción y distribución del tóxico en la semilla.⁷

2.3.6 Tipos de exposición. La exposición ambiental a un contaminante se caracteriza por la ruta de administración y la dosis recibida, que depende de la concentración del contaminante, la frecuencia y la duración del contacto. Las principales rutas de administración con relevancia medioambiental son la vía oral, la inhalación y la penetración cutánea.

⁷ Vallejo, B; Maria, C (2007) Toxicología Ambiental; (pg); ED. Grupo Empresarial Wills Ltda.

Las rutas de administración pueden influir considerablemente sobre la toxicidad del compuesto, pues de ellas depende la concentración que éste alcanza en el órgano en el que ejerce sus efectos tóxicos.

La comparación de la dosis y el grado de absorción; letal media, LD50 se observa por distintas rutas de administración para un mismo compuesto; sirve para identificar diferencias entre ellos.

Otro factor a considerar en la definición de la exposición de la forma de administración, es decir, el disolvente en el que se encuentra disuelto el contaminante, en las exposiciones medioambientales; el medio de administración es prácticamente siempre el agua. Es necesario tener en cuenta, sin embargo, cual es la vía de administración en los ensayos de toxicidad empleados para caracterizar el contaminante, ya que las diferencias entre el medio pueden repercutir significativamente sobre el grado de absorción.

Por lo que respecta a la duración y frecuencia de la exposición, puede distinguirse entre exposición aguda y repetida, que a su vez puede ser sub-aguda, sub-crónica y crónica.

2.3.6.1 Exposición aguda. Con una duración inferior a veinticuatro horas, consiste por lo general en una única administración del compuesto. Según la ruta de administración pueden existir distintas modalidades de exposición aguda. En la ruta por inhalación, la exposición aguda consiste en la administración continua del compuesto durante un periodo de duración inferior a 24 hrs. En la vía oral, la exposición aguda suele consistir en la administración de una sola dosis por alimentación o suministro forzado en animales o especies de ensayo, mientras que en la vía cutánea la exposición aguda consiste en la aplicación directa sobre la piel del agente estudiado.

2.3.6.2 Exposición repetitiva. De la sustancia de ensayo, cuando se administra más de una vez durante un periodo variable, en función del cual puede distinguirse entre las categorías de exposición sub-aguda, sub-crónica y crónica.

La exposición sub-aguda corresponde a la repetición de la exposición de la sustancia de ensayos durante un periodo de tiempo relativamente breve, de una duración de un mes o inferior. La exposición sub-crónica tiene lugar durante un periodo de uno a tres meses, mientras que la exposición crónica tiene una duración superior a tres meses.

Estas definiciones se refieren a las condiciones de exposición de animales en ensayos de laboratorio, para trasladar estos términos a la exposición de personas suele hablarse de *exposiciones agudas* para iniciar aquellas correspondientes a un hecho aislado, mientras que la *exposición crónica y sub-crónica* se refiere a exposiciones repetidas en un periodo de duración superior e inferior a siete años, respectivamente.⁸

2.4 ECOTÓXICOLOGÍA AMBIENTAL

Es definida como la ciencia que estudia la polución, su origen, evolución e interacciones con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas, sus acciones y efectos sobre los seres vivos que forman estos ecosistemas, con su evaluación, como determinantes de criteriología y profilaxis biológica o socioeconómica (Sanz Sánchez, 1974).

La ecotoxicología tiene como materia fundamental de estudio la polución sobre los sistemas bióticos en forma de toxicidad, alteración de especies, reducción de una determinada productividad, etc., puesto que no siempre un polutante se comporta como un tóxico neto, sino que puede suponer sólo la creación de un nivel indeseable en un determinado ecosistema.

Considerando al polutante como un agente físico o una sustancia química que se encuentra en el ambiente y que tiene un efecto deletéreo sobre las semillas, se

⁸ Moreno, M (2003) Toxicología Ambiental Evaluación de riesgo para la salud humana. Pg. 4-5 ED. MacGrawHill.

puede destacar la obra de Moriarty (1985), porque ya resalta la existencia de autores que distinguen entre contaminante y polutante; contaminante sería la sustancia generalmente resultante de la actividad humana sin que sea necesario que tenga efectos biológicos, mientras que se reserva el término polutante para la sustancia química que abarca ambas características, es decir, aparece como antropogénico y nociva (Moriarty, 1985).

En la ecotoxicología, los agentes físicos y los compuestos químicos se estudian más por su peligrosidad potencial que por su toxicidad relativa, aplicados a determinadas condiciones de exposición, para que tenga significado. Por ello, al hablar de nocividad, aparte del concepto semántico de toxicidad propiedad inherente a un agente físico o un compuesto químico de producir efectos indeseables cuando alcanza una concentración determinada en un lugar de semillas vivo), se debe tener en cuenta el concepto de *toxicidad*, es decir, la posibilidad de que produzca toxicidad, así como el riesgo o peligrosidad, determinado por la probabilidad de que ocurra una acción toxica.

La ecotoxicología, como se ha señalado anteriormente, es un hecho antropogénico, y como tal está íntimamente ligado al hombre y su dinámica.

Los estudios ecotóxicológicos se componen de tres secuencias (Truhaut, 1975):

1. La liberación del polutante, su formación y la génesis en esas fuentes de polución, los medios y vías de transporte (suelo, aire, agua, alimentos, etc.), los factores que influyen en su difusión, sus absorciones geológicas y las posibles alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas debidas a los diversos componentes abióticos del ecosistema que dan lugar a su acumulación o degradación, puesto que siempre debe tenerse presente que las transformaciones de las sustancias químicas son funciones que realizan los ecosistemas, lo cual ha servido para que el hombre haya considerado el medio ambiente que lo rodea como una gran cloaca donde libera todas las sustancias residuales de su actividad, basándose en su capacidad de autodepuración, y que en los momentos actuales sabemos que es limitada.

2. El ingreso de los polutantes en el medio biológico, esto es, su entrada en las cadenas biológicas, alimentarias, de comunidad, etc., con cinéticas propias. Una vez ocurrida la contaminación, el flujo de un polutante dentro de los ecosistemas está condicionado por varios factores bióticos y abióticos con características especiales que condicionan su disipación, acumulación o destrucción; por lo tanto se puede afirmar que la reacción biológica frente a los polutantes puede ocasionar también una readaptación del ecosistema por incremento de resistencias o tolerancias a ciertas semillas.
3. Calificación y cuantificación de los efectos patológicos sobre los seres vivos y sus ecosistemas, con las consiguientes deducciones epidemiológicas y profilácticas.

Constituye la ecotoxicidad propiamente dicha, es decir, la consecuencia de la acción originada por el polutante sobre los seres vivos que forman los ecosistemas, sin considerar que dicho polutante pueda hacer desaparecer a la mitad de los individuos de una especie (lo que puede tener significación ecológica), sino determinar el impacto ecológico que produce, ya que muchos polutantes no tienen efecto sobre las semillas individualmente, pero su resultado ecológico es digno de tenerse en cuenta.

La ecotoxicología también se caracteriza por llevar a cabo un diagnóstico evaluativo, que tiende a la predicción y que se fundamenta en tres parámetros:

1. La determinación de la dosis del ambiente,
2. la evaluación de la carga y
3. la predicción del riesgo.

Como su fin primordial, la ecotoxicología busca el bienestar del hombre. Por ello, su misión es, tanto informar y alertar de la peligrosidad de las alternativas del desarrollo y la degradación del medio ambiente, como prevenir, aportando datos

para la toma de decisiones con arreglo al cociente beneficio/riesgo, que siempre va ligado con la calidad de vida.⁹

2.5 ENSAYOS DE TOXICIDAD O BIOENSAYOS

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre semillas de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los semillas, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos.

De manera general, los ensayos, también llamados pruebas de toxicidad, pueden ser definidos de acuerdo con:

- ♦ Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- ♦ El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.
- ♦ El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.

Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras sub-celulares o sistemas de enzimas, hasta semillas completas, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre las semillas o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida de la semilla; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico.

⁹ Capo M (2002) Principios de la Toxicología, Diagnostico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente; ED.MacGrawHill.

Los resultados de los bioensayos se refieren, en primer lugar, a las semillas usadas en el ensayo y las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados puede indicar niveles de peligrosidad trasladable y asimilable a semillas que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis.

En principio, se debe considerar que no existe ninguna semilla ni biocenosis que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes.

En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo), que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas.¹⁰

Para la realización de una prueba de toxicidad se involucra un agente o estímulo (pesticidas, metales pesados o una muestras ambientales con contaminantes), el cual se aplica a un grupo de semillas (cultivo bacterial, algas, animales o plantas) estas semillas que son expuestas, evaluando una respuesta preseleccionada.

Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población, alteración del comportamiento, etc. Se determinan distintas variables como, por ejemplo, la concentración letal 50 (CL 50), que es la concentración letal para el 50% de los individuos expuestos. Las condiciones de los cultivos y los ensayos deben estar altamente estandarizadas para permitir la comparación de los resultados.¹¹

La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de alguna característica, cambio de estas o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (peso del cuerpo, cambios físicos, en el caso de semillas se determina el proceso de germinación y crecimiento de las raíces).¹²

¹⁰ Castillo, G (2004) Ensayos Toxicológicos y Método de Evaluación de Calidad de Aguas; ED. México IMTA

¹¹ López, J; Bayona, A (2007) Ensayo de Toxicidad Aguda al Influyente la PTAR de la Calera Mediante la Utilización de Semilla *Lactuca Sativa L.*, y Propuesta para su Utilización como Agua de riego para cultivos. UniSalle

¹² Rossini, D; Díaz, M; Pica, Y. (2004) Conceptos Generales.

Teniendo en cuenta que la magnitud o la frecuencia de la respuesta dependerán de la dosis aplicada, las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando distintas dosis. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta), caracterizando toxicológica o ecotoxicológicamente al compuesto.¹⁰

En la realización de pruebas de toxicidad o bioensayos se pueden llegar a encontrar tres clases de variables a determinar, estas son: cualitativas, cuantitativas discretas y por último las cuantitativas continuas. Las cualitativas evalúan aspectos como: clases de especies que mueren por la exposición o las que viven a esas condiciones de toxicidad. Por otra parte las cuantitativas discretas determinan variables de las semillas expuestas como número de especies que llegan a morir o porcentaje de especies muertas. Por último están las cuantitativas continuas, en esta se determina la reducción del crecimiento en longitud o peso. En el caso de las variables cualitativas, debido a sus características, es muy difícil establecer relaciones cuantitativas con la dosis y, en general, se diseñan los experimentos de manera tal para evaluar respuestas cuantitativas.¹¹

Las respuestas que entregan estas pruebas de laboratorio pueden ser clasificadas en dos grupos:

- ♦ Agudas o letales, en este caso las semillas son sometidos a diferentes concentraciones del contaminante. Al realizar este procedimiento se espera obtener repuestas con base a mortalidades que permitan indicar el grado de toxicidad del elemento o compuesto, para la especie utilizada, expresada como CL50 o CE50, estas se refieren a la concentración que provoca un efecto en el 50% de las semillas expuestos en el ensayo.
- ♦ Crónicas o sub-letales, son pruebas que tienen como finalidad evidenciar repuestas que no implican la muerte de la semilla ensayada, en este

ensayo se determinan factores como la conducta del semilla, fecundidad, desarrollo y Bioacumulación entre otras.¹³

Se puede utilizar tres formas de evaluación tóxica, las cuales se emplean de las siguientes formas: observación, estudio de exposiciones ocupacionales y accidentales, manejo experimental y procesos de bioensayos con semillas expuestas a los agentes tóxicos.

Observando las mediciones de efectos tóxicos por sustancias químicas en los humanos se generan complejas investigaciones prospectivas o retrospectivas, es importante mencionar lo esencial de la información epidemiológica, a nivel ambiental se utiliza la experimentación con diferentes semillas pertenecientes al medio acuáticos, generalmente representantes importantes de la cadena trófica.

2.5.1 Criterios generales de selección. La selección de material biológico (semillas), se efectúa directamente de las opciones requeridas en la toxicológica, la información genética de las semillas, características de cada una de las especies y el manejo adecuado de equipos con su respectiva capacitación para el adecuado análisis.

Los ensayos de toxicidad son de gran importancia ya que son relativamente simples, rápidos y económicos, también permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico. Es útil para la investigación básica del fenómeno de toxicidad, establecer criterios o patrones de calidad de aguas superficiales o efluentes, la evaluación del impacto ambiental y del riesgo ecológico así como el monitoreo de las condiciones de un cuerpo de agua. Además se necesitan implementar estos ensayos biológicos para obtener información adicional sobre riesgos potenciales, incluyendo efectos

¹³ López, J; Bayona, A (2007) Ensayo de Toxicidad Aguda al Influyente la PTAR de la Calera Mediante la Utilización de Semilla Lactuca Sativa L, y Propuesta para su Utilización como Agua de riego para cultivos. UniSalle

tóxicos como generación de cáncer, malformaciones, desórdenes de conducta, efectos acumulativos, antagonismos y sinergismos.¹⁰

2.5.2 Bioensayos en el medio ambiente. Como los contaminantes suelen actuar mezclados y entre ellos existen interacciones, la determinación por medios químicos de sus cantidades no suele aclarar sus posibles efectos biológicos. En un bioensayo se controlan con minuciosidad las condiciones ambientales para que la respuesta de una semilla de prueba ante los contaminantes específicos se pueda definir inequívocamente, aunque la extrapolación de los resultados obtenidos en un bioensayo a situaciones reales puede originar confusiones. ¿Por consiguiente, los bioensayos no deben excluir las observaciones en el campo y los experimentos *in situ* si se pretende entender todas las repercusiones de un problema de contaminación?

La selección de una semilla adecuada para bioensayos rutinarios depende de varios factores (American Public Health Association, 1976):

1. la semilla debe ser sensible a los factores ambientales o materiales en cuestión.
2. ¿Su distribución tiene que ser amplia y su disponibilidad?
3. Debe ser importante desde el punto de vista económico, recreativo o ecológico, tanto si es local como nacional.
4. Se debe poder cultivar fácilmente en el laboratorio.
5. Tiene que hallarse en buenas condiciones, libre de parásitos o enfermedades.
6. Debe ser compatible con las técnicas de bioensayo.¹⁴

2.5.3 Manejo del tóxico de referencia. Se refiere a un compuesto químico orgánico o inorgánico, con el cual se pretende medir la exactitud de los resultados obtenidos dentro de las pruebas de toxicológicas del laboratorio.

¹⁴ Bulus Rossini, Gustavo Daniel; Diaz Baez, Maria Consuelo; Pica Granados, Yolanda; Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Capitulo 6. Pag 145, Diciembre 2006.

Aunque en la literatura se mencionan muchos compuestos, la USEPA (1994) recomienda como tóxicos de referencia las siguientes sustancias: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio (CdCl_2), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Otras agencias como Environment Canadá recomiendan zinc (Zn^{+2}) como tóxico de referencia inorgánica y fenol para sustancias orgánicas. Sin embargo estos compuestos pueden sustituirse por otros dependiendo de la especie de prueba, la matriz utilizada y los puntos finales medidos.³

Para la preparación de los tóxicos de referencia, cada laboratorio debe conocer el patrón de respuesta de sus semillas, lo que permitirá determinar las concentraciones óptimas para elaborar la curva de dosis-respuesta. Preparando inicialmente una solución de concentración alta para a partir de esta elaborar soluciones menos concentradas, es decir, mas diluidas.

2.5.4 Pruebas de sensibilidad. Los cambios en el estado fisiológico del cultivo pueden ser detectados mediante la evaluación periódica de la respuesta de los individuos a un determinado tóxico de referencia. Aunque existen varios tóxicos recomendados, uno de los más utilizados es el cromo (Cr IV) a partir de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Para determinar si la sensibilidad del cultivo es la adecuada, es necesario, previo a iniciar las pruebas rutinarias, evaluar la respuesta de las semillas ante la exposición al tóxico de referencia. La concentración en la cual se produce la muerte del 50% de la población ($\text{CL}_{50}/\text{CE}_{50}$) deberá encontrarse dentro del intervalo previamente establecido. Para definir este intervalo es necesario realizar por lo menos 5 pruebas con el tóxico de referencia. Con estos datos se inicia la construcción de la carta control, que deberá completarse con la información generada en nuevas evaluaciones. A partir de estos resultados, se determina la CL_{50} promedio para la sustancia, así como la desviación estándar (σ) de la CL_{50} . Los límites superior ($\text{Promedio} + 2\sigma$) e inferior ($\text{Promedio} - 2\sigma$),

corresponderán al intervalo de concentración en el cual varía la respuesta de los semillas al tóxico seleccionado¹⁵

2.5.5 Carta control. El manejo de las cartas control como herramienta gráfica para la evaluación del estado fisiológico de las semillas utilizado dentro de las pruebas de toxicidad, permiten establecer cambios en las semillas frente a los diferentes tóxicos de referencia.

La carta control se genera a partir de los resultados de pruebas sucesivas al tóxico de referencia seleccionado, para el cual se obtiene el valor de la concentración de efecto medio CL_{50}/CE_{50} . Inicialmente ésta puede ser construida con un mínimo de cinco datos y posteriormente se debe continuar realizando ensayos con el tóxico para ingresar mensualmente nuevos valores hasta completar una serie de veinte resultados.

Los valores se van situando a manera de puntos en un gráfico que relaciona el número de ensayos, ubicado en el eje X o abscisa, y en el eje Y u ordenada, el valor de la concentración de efecto medio CL_{50}/CE_{50} . Seguido de esto se determina el valor promedio y la desviación estándar (σ) de la población de datos mediante los valores descritos anteriormente. Con estos parámetros estadísticos se calculan los valores límite (superior e inferior) que definen el intervalo de variación aceptable o intervalos de confianza (95%) en el que deberán encontrarse los valores de CL_{50}/CE_{50} obtenidos para futuros ensayos con el tóxico de referencia.³

Para la elaboración de las cartas control, se debe preparar una solución estándar del tóxico de referencia seleccionado. Con la solución estándar del tóxico, se preparan diluciones para obtener una serie de concentraciones, de manera que se logre obtener al menos dos valores de efecto mayor al 50% y dos más, menores a dicho porcentaje. En general, es de esperar que la serie de concentraciones utilizada produzca a través del tiempo la misma respuesta en cada concentración;

¹⁵ Bulus Rossini, Gustavo Daniel; Diaz Baez, Maria Consuelo; Pica Granados, Yolanda; Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Capitulo 6. Pag 132, Diciembre 2006.

se procede a calcular el punto final de la prueba (CL_{50}/CE_{50}) utilizando cualquiera de las técnicas estadísticas recomendadas.

La carta control es utilizada para evaluar la tendencia de los resultados, por lo que el promedio acumulado y los límites de confianza son repeticiones de los calculados con cada nuevo dato obtenido.¹⁰

Si durante las pruebas se obtienen valores de CL_{50}/CE_{50} fuera del intervalo establecido, ¿se indica de algún cambio en la consistencia metodológica o de alteración de la sensibilidad de las semillas? En el caso de análisis de puntos finales de CL_{50}/CE_{50} , se espera que sólo uno de por lo menos veinte ensayos caiga fuera de los límites establecidos.

2.5.6 Evaluación de aspectos ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$, NOEC, LOEC). El objetivo de un ensayo de toxicidad en una muestra de agua, efluente o compuesto puro, es estimar la concentración segura o concentración a la cual no se observa efecto; sin embargo, este término es más un concepto biológico que un resultado estadístico, por lo que los resultados aquí utilizados serán: la concentración más alta a la cual no se observa efecto (NOEC); la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC); la concentración efectiva (CE) correspondiente a una estimación de la concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable, mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de semillas; concentración letal (CL), la cual corresponde a la concentración del tóxico o efluente o muestra que causa la muerte a un determinado porcentaje de la población expuesta; y concentración inhibitoria (CI), la cual corresponde a la concentración del tóxico o muestra o efluente que puede producir una reducción de una respuesta biológica en una población expuesta.

El valor de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ se debe obtener tanto para el tóxico de referencia como para las muestras simples o duplicadas. Para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$

se pueden utilizar técnicas de estimación de punto, tales como los métodos Probit, Spearman - Karber, gráfico, etc.¹⁶

2.5.7 Curva dosis-respuesta. La relación dosis-respuesta es la medida de la proporción o porcentaje de una población que experimenta efectos adversos como consecuencia de la exposición a un compuesto tóxico. Esta relación se obtiene habitualmente en forma gráfica, representando el porcentaje de población afectado en ordenadas, frente a la dosis en abscisas.

La obtención de la curva dosis-respuesta descansa en una serie de supuestos básicos, el primero de los cuales es que la respuesta observada es consecuencia de la exposición al agente químico administrado, es decir, que existe una asociación causal entre ambas. Por otra parte, la magnitud de la respuesta debe depender de la dosis, lo que implica la existencia de un receptor o receptores moleculares con los que el agente administrado interacciona para desencadenar la respuesta tóxica, de forma que la magnitud de la respuesta dependerá de la concentración alcanzada por el agente en el tejido donde se encuentra el receptor; concentración que a su vez depende de la dosis administrada. El último requisito para obtener la relación dosis-respuesta es definir un método para cuantificar y expresar de forma preciso la toxicidad.¹⁷

2.6 BIOENSAYOS CON PLANTAS

Las sustancias tóxicas pueden afectar el desarrollo normal de las plantas, principalmente en sus etapas tempranas (germinación y desarrollo de las raíces). Al observar y medir la longitud de raíces jóvenes, y comparar estas longitudes con un control normal, podemos determinar la posible presencia de productos químicos tóxicos en el medio ambiente. Cualquier semilla que entre en contacto con el agua tenderá a brotar, pero esta germinación puede ser afectada por el

¹⁶ Bulus Rossini, Gustavo Daniel; Diaz Baez, Maria Consuelo; Pica Granados, Yolanda; Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Diciembre 2006.

¹⁷ Moreno Grau, María Dolores; Toxicología Ambiental Evaluación de Riesgo para la Salud Humana, McGraw Hill 2003 Pág. 8 y 9.

nivel de contaminación presente en el agua. Si el agua está muy contaminada sólo algunas semillas - o ninguna - lograrán germinar. El agua contaminada puede también afectar el desarrollo de la raíz.

En las últimas décadas, se han desarrollado bioensayos rápidos con el empleo de plantas como semillas de prueba, las que funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental. En Cuba, se tienen algunas experiencias con el empleo de las plantas en la evaluación de la toxicidad de sustancias tóxicas y muestras ambientales.

Como parte integral del ecosistema, las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser semillas eucarióticas, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores, y constituyen una eficiente herramienta en el orden ambiental, además de poseer las siguientes ventajas:

- ♦ Las plantas son más sensibles al estrés ambiental que otros sistemas de ensayos disponibles.
- ♦ Fácil manipulación y almacenaje.
- ♦ Bajo costo.
- ♦ Buena correlación con otros sistemas de pruebas.

Entre las pruebas a corto plazo con plantas que más se han utilizado para la evaluación toxicológica ambiental se encuentran:

1. Prueba de toxicidad a corto plazo de la prolongación de la raíz de un vegetal.

La justificación para realizar este bioensayo radica en la importancia de eventos de desarrollo temprano en el crecimiento y supervivencia de las plantas. La prolongación de la raíz es inhibida a concentraciones más bajas de las sustancias tóxicas que para el caso de la germinación de las semillas; por lo tanto, puede ser un indicador más sensible de efectos biológicos. Este bioensayo puede ser ejecutado con cualquier número de especies, las cuales resulten económicamente

importantes, sean fácilmente disponibles, germinen y crezcan rápidamente. Una de las semillas más comúnmente utilizadas en esta prueba son las semillas de *Lactuca sativa* L, semilla de lechuga por su grado de sensibilidad.

El bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es un ensayo estático de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se evalúan los efectos fitotóxicos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días del crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la prolongación de la radícula y del hipocotilo. A diferencia del bioensayo tradicional de germinación de las semillas, la evaluación del efecto en la prolongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite la evaluación del efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sí pueden retardar o inhibir completamente los procesos de prolongación de la raíz o del hipocotilo, lo que depende del modo y sitio de acción de los contaminantes generados para cada uno de los medios expuestos en los ensayos fitotóxicos.

Este ensayo evalúa los constituyentes solubles del agua (aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos o sedimentos y lixiviados), teniendo en cuenta para el resultado la cantidad de semillas germinadas y la media del crecimiento de la raíz. Se calcula la EC_{50} que no es más que la concentración que reduce la longitud de la raíz en un 50 % en relación con el control y la obtención de datos.

2. Bioensayo para la estimación de la toxicidad por la medición de la media del crecimiento de la raíz de cebollas (*Allium cepa* L).

Este método es una herramienta fácil y sensible para la medición de la toxicidad total causada por tratamientos de sustancias químicas. Los resultados de este

ensayo se ajustan bien a una batería de pruebas compuesta por semillas procariontes y/o eucariontes. Es aplicable a los siguientes tipos de muestras:

- ♦ Aguas naturales (lagos, ríos y pozos).
- ♦ Agua potable (agua de grifo diferentes tuberías).
- ♦ Aguas residuales domésticas e industriales, incluyendo lodos y lixiviados.
- ♦ Sustancias químicas solubles en agua y con sustancias químicas insolubles en agua y solventes.

El ensayo con bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) es un bioensayo de toxicidad aguda (72 horas) semi-estático (con renovación diaria de la solución de ensayo). Como punto final de evaluación de efectos fitotóxicos se cuantifica la inhibición promedio en la prolongación de las raíces del bulbo.

El grado de toxicidad de las sustancias químicas de prueba es estimado por la medición de la longitud de cada uno de los bulbos de las raíces (10 cebollas son empleadas para cada concentración o menos en dependencia de si sólo están disponibles pequeñas cantidades de muestra). Para el reporte de la prueba, se toma un valor medio del crecimiento para cada una de las series. También se calcula la EC_{50} .

2.6.1 Fitotoxicidad en plantas. Se refiere a tóxicos que afectan a los vegetales. Efectos de toxicidad en especies vegetales sensibles, donde diversos factores edáficos pueden determinar la bio-disponibilidad de un compuesto químico, y por lo tanto, la intensidad del efecto fitotóxico, tales como el contenido de materia orgánica y el pH del suelo, además del grado de solubilidad de la forma química

2.6.2 Bioconcentración. Hace referencia a que algunas sustancias tienen más afinidad por los tejidos de ciertas semillas que por el agua, por lo que pueden alcanzar concentraciones más elevadas en esas semillas que en el agua. Esta capacidad depende, fundamentalmente, del tipo de sustancia y de sus propiedades fisicoquímicas como la solubilidad relativa en agua y en lípidos.

2.6.3 Bioacumulación. Se da cuando la concentración de una sustancia aumenta en la semilla expuesta en función del tiempo; por ejemplo, que las concentraciones de una sustancia específica son más altas en los peces adultos que en los jóvenes del mismo sitio. Esta capacidad también depende, sobre todo, de las características fisicoquímicas y bioquímicas del compuesto, como son solubilidad y velocidad de eliminación.

2.6.4 Biomagnificación. La magnificación biológica o Biomagnificación es la tendencia de las sustancias contaminantes a concentrarse en niveles tróficos sucesivos. Este proceso sucede cuando un producto contaminante que se asemeja químicamente a nutrientes inorgánicos esenciales es incorporado y almacenado en la semilla del ser vivo que se encuentra en la base de la cadena alimenticia. Posteriormente, la sustancia contaminante pasa en grandes cantidades a la semilla del siguiente ser de la cadena, de esta manera la sustancia contaminante va magnificándose de un nivel a otro.

2.6.5 Bioestimulación. Las pruebas que arrojan estas características de Bioestimulación, evalúan la situación relativa de los nutrientes en un determinado entorno acuático, se distingue entre la cantidad total de nutrientes y la aprovechable desde el punto de vista biológico y, finalmente, para determinar los posibles efectos de un cambio en la calidad del agua sobre el crecimiento de las plantas. En un proceso de Bioestimulación se observa que los nutrientes estimulan el metabolismo y la velocidad de crecimiento de las semillas.

2.6.6 Necrosis. Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido de la semilla, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión.

2.6.7 Ensayo de toxicidad con semillas de lechuga Batavia (*Lactuca Sativa*). El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en el que se pueden

evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas sobre el proceso de germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición de la germinación y la elongación de la radícula y del hipocotilo.

Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.⁷

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores sub-letales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas

para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1989; Dutka, 1989). A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como semilla diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la Fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pre-tratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.

Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes semillas de protección ambiental para la evaluación ecotóxicológicas de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies y el blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984; Wang, W. 1987; US EPA, 1989; Boutin *et al.*, 1993).³

2.7 CONTAMINACIÓN DEL MEDIO ACUÁTICO

La fragilidad del medio acuático deriva, entre otras razones, de su elevado poder disolvente para una amplia gama de productos de desecho, a la vez que es un vehículo excelente para la evacuación de materiales de muy diversa índole, tanto en estado sólido como en líquido o gaseoso, bien sea en suspensión, disolución o flotación. El problema con el medio acuático surge cuando se altera el equilibrio en que se mantiene, sobrepasando los límites de tolerancia del sistema respecto a los procesos que lo gobiernan.

Las consecuencias de la degradación del medio acuático se manifiestan fundamentalmente de dos formas: pérdida de la calidad intrínseca o natural y la disminución o agotamiento de los recursos. Los resultados son semejantes, puesto que en ambos casos pueden provocar un déficit de los caudales disponibles.

2.7.1 Tipos de contaminantes acuáticos. Según su naturaleza, los contaminantes pueden clasificarse en físicos, químicos o biológicos.

2.7.1.1 Contaminantes físicos.

- ♦ **Temperatura:** Interviene en la cantidad de oxígeno susceptible de permanecer disuelto en la masa acuática, lo que a su vez repercute en las condiciones de vida o las posibilidades de existencia de los seres que lo precisan para la respiración; además interviene en los procesos biológicos de las células y en consecuencia, en la velocidad de determinadas reacciones bioquímicas y por último condiciona la posibilidad de supervivencia de algunas especies faunísticas que se hallan supeditadas a la existencia de determinados umbrales térmicos para poder desarrollarse.
- ♦ **Partículas en suspensión:** Pueden tener origen diverso y, en consecuencia, composición y tamaños variados. Además pueden incorporarse otras materias no solubles de diverso origen y naturaleza cuyos indicadores son: la turbidez, el color, el sabor, el olor, etc.

2.7.1.2 Contaminantes químicos.

- ♦ **pH:** En las aguas los valores ideales son de 7.
- ♦ **Cloruros:** La presencia en el agua del ion Cl^- puede ser debida a causas naturales, como sucede en áreas con predominio de materiales salinos; pero si no existen estas causas, el contenido anormalmente elevado de cloruros tiene su origen en los vertidos industriales o domésticos.

- ♦ **Sulfatos:** El contenido depende de las características del sustrato; en lugares con abundancia de materiales ricos en sulfuros y con precipitación escasa pueden encontrarse valores altos.
- ♦ **Fosfatos:** Es relativamente frecuente hallar niveles de fósforo en las aguas superficiales y en algunas aguas subterráneas, como consecuencia del gran uso de detergentes domésticos e industriales y abonos incorporados en su composición. Una excesiva carga de fosfatos potencia la eutrofización de las aguas.
- ♦ **Oxígeno disuelto:** El oxígeno disuelto en el agua procede del aire y entra a formar parte de la masa acuática a partir del intercambio atmósfera-agua, en una relación directamente proporcional a la superficie del agua e inversamente al volumen.
- ♦ **Metales:** La presencia en el agua de trazas de metales pesados se debe a los residuos de la actividad industrial, además de las debidas causas naturales. Elementos como el arsénico, el cadmio, el cobre, el hierro, el níquel, el plomo, el mercurio, el cromo o el zinc entre otros, son potencialmente peligrosos para la salud, por lo que se hallan sometidos a control.

2.7.1.3 Índice de calidad. La calidad del agua se asocia a los usos a que se destina, pero no solo referidos a los usos domésticos, industriales o agrícolas, sino también a cualquier otra utilidad que le requiera el medio acuático para desenvolverse, como las recreativas, mantenimiento de los ecosistemas, etc.

El índice de calidad general de las aguas incorpora varios parámetros, de los cuales los más importantes son los siguientes:

- ♦ **Demanda bioquímica de oxígeno (DBO):** Indica los miligramos de oxígeno disuelto por litro, con lo que se tiene un indicador del grado del poder auto depurador del río, así como la eficiencia de los distintos procesos de tratamiento existente. La concentración se encuentra muy relacionada con la cantidad de oxígeno que se consume en una

oxidación, con el contenido en materia orgánica biodegradable y, en menor grado, con los nutrientes que controlan la depuración a través de los procesos biológicos de las semillas que vienen en el agua y que se desarrollan a partir del consumo de oxígeno y sustancias nutrientes.

- ♦ **Demanda química de oxígeno (DQO):** Corresponde a los procesos químicos a diferencia del anterior, que se refiere a los biológicos, mide la oxidabilidad, es decir, el consumo de oxígeno por parte de todas las materias orgánicas, tanto del origen natural como artificial, biodegradables o no, durante el proceso químico de la oxidación.
- ♦ **Oxígeno disuelto:** Hace posible la vida en el interior de la masa acuática y procede de la atmósfera y de la fotosíntesis de las plantas verdes acuáticas.
- ♦ **Conductividad:** Señala la concentración de sales inorgánicas, especialmente cloruros y sulfatos, o el grado de acidez¹⁸

2.7.2 Toxicidad de efluentes

2.7.2.1 Cobre. El cobre es un nutriente esencial, ampliamente distribuido en la naturaleza, del que el hombre utiliza dentro de sus días cotidianos. Los estados carenciales del cobre son raros, dado la distribución de su presencia en los animales y las plantas, y son consecuencia de su distinta manifestación de las pérdidas de funciones de estos sistemas enzimáticos.

Dentro de las formas más antiguas hasta las nuevas aleaciones de cobre estas se encuentran en forma metálica, con un estado de oxígeno 0, el cobre forma compuestos inestables en los que se encuentra el estado de oxígeno +1, pero su estado de oxidación más frecuente es +2, como en el sulfato de cobre, uno de los primeros compuestos utilizados como pesticida, para el control del mildiu. Las sales poseen efectos fungicidas y plaguicidas.

¹⁸ Díaz Báez, María C, Bustos L, Martha, Espinosa R, Adriana J, Pruebas De Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos, Pag 72-78, Universidad Nacional

El cobre presente en el medio ambiente tiende a formar enlaces con los componentes sólidos de los suelos y sedimentos. Esta tendencia es mucho más acusada en el cobre que en otros cationes divalentes.

El cobre forma en laces fuertes con la materia orgánica, por lo que tiende a asociarse con los limos y la fracción fina de los sedimentos. La exposición aguda por ingestión a sales solubles de cobre, como el sulfato, puede producir necrosis hepática con resultados de muerte. Existen múltiples casos documentados de intoxicación aguda como consecuencia de la ingestión de sulfato de cobre usado como pesticida.¹⁹

2.7.2.2 Níquel. Este componente es común dentro de la corteza terrestre y la forma más común de encontrarlo es el sulfuro, óxido y silicatos.

El níquel es fácil de trabajar. Resiste la corrosión incluso otras aplicaciones importantes es el recubrimiento electrolítico de metales, conocido como niquelado, catalizador y componentes constituidos por aleaciones de níquel y la producción de pilas de níquel-cadmio.

Entre las fuentes medioambientales más importantes de níquel se encuentran las cenizas producidas en el combustible de carbón, en agua naturales la forma predominante del níquel es la hexahidratada, especialmente en aguas superficiales y subterráneas que presentan un valor inferior de pH menor a 9.

La presencia de agentes comprobantes, como los compuestos orgánicos solubles, aumentan la solubilidad del níquel en este tipo de terreno por formación de complejos solubles. A pesar de la formación de estos complejos, no se ha presentado aumentos de las concentraciones de níquel en las aguas subterráneas bajo terrenos a los que se les ha aplicado durante periodos prolongados de tiempo.

El níquel presenta una baja tendencia a la Bioconcentración y tiende a biomagnificarse en la cadena trófica, tanto en ecosistemas acuáticos como en terrestres. El grado de toxicidad parece estar relacionado con la solubilidad del

¹⁹ Moreno Grau, Maria Dolores, Toxicología Ambiental Evaluacion de Riesgo para La Salud Humana, Mc Graw Hill 2003, Pag 210

compuesto de níquel, de forma que los compuestos mas solubles (sulfato) son agentes cancerígenos más potentes que los menos solubles (sulfuro de oxido).²⁰

2.8 ANALISIS ESTADISTICO.

A continuación se presentan los diferentes métodos estadísticos que se utilizan para determinar los efectos generados por los agentes tóxicos durante la exposición a las semillas.

2.8.1 Análisis por método Probit. Si en lugar de representar el histograma de frecuencias de la forma convencional se representa la frecuencia acumulada frente a la dosis, obtendremos la figura representada en la curva, de forma sigmoidea, posee una zona relativamente lineal en su parte central, correspondiente al rango 16% a 84% de respuesta porcentual de la población, aproximadamente, representada, de la media de la tendencia central utilizada, es decir, la media o mediana de los datos distribuidos normalmente. En este tipo de distribución, la media ± 1 SD representa el 68.3% del la población; la media ± 2 SD, el 99.5% y la media ± 3 SD, el 99.7%.

Podemos convertir la respuesta porcentual en unidades de desviación respecto a la media, denominadas *desviación normal equivalente*, o NED. Por consiguiente la NED de una respuesta porcentual del 50% es de 0, mientras que el valor de la NED de una respuesta porcentual del 97.8% y 2.25% de la población es de +2 y -2 respectivamente.

Para evitar los valores negativos, la escala de NEDs se puede someter a una translación añadiendo 5 unidades, con lo cual el valor central seria de 5, mientras que los valores indicados para la respuesta porcentual del 97.8% y 2.25% pasarían a ser de +7 y +3, respectivamente. Las nuevas unidades así obtenidas reciben el nombre de *pro bit* (por cobiontracción de *probability unit*) y se utilizan a menudo en toxicología.²¹

²⁰ Moreno Grau, Maria Dolores, Toxicología Ambiental Evaluacion de Riesgo para La Salud Humana, Mc Graw Hill 2003, Pag 220.

²¹ Moreno Grau, María Dolores, Toxicología Ambiental Evaluación de Riesgo para La Salud Humana, Mc Graw Hill 2003, Pag 10 y 11.

2.8.2 Análisis de varianza (ANOVA). Se conoce como la iniciación presentada de una explicación lógica de un procedimiento y como su nombre lo indica, el análisis de varianza trata de analizar la variación de una respuesta y de asignar porciones (componentes) de esta variación a cada una de las variables de un conjunto de variables independientes. El razonamiento se basa en que las variables de una respuesta se modifican por la variación de algún conjunto de variables independientes desconocidas. El objetivo del análisis de varianza es identificar variables independientes importantes en un estudio y determinar cómo interactúan y afectan la respuesta.

- **H₀:** es considerada la hipótesis nula dentro una investigación, determinándose cuando la F calculada de la prueba no supera el F teórico, indicado para la semilla Lactuca sativa con un valor de 3.11.
- **H₁:** considerada como la hipótesis alterna, seleccionada cuando la prueba indica un valor superior a F teórico.
- **F teórica:** valor teórico establecido a nivel internacional para pruebas fitotóxicas con semillas.
- **F calculado:** valor obtenido por el análisis de varianza Anova el cual debe ser superior al F teórico y así obtener la aceptación o rechazo de la prueba.

2.9 INDUSTRIA GALVANICA.

La industria con procesos galvánicos consisten en la transformación de metales por medio de un recubrimiento superficial con diferentes sustancias químicas, es utilizado para la reducción de costos y cuando la finalidad sea modificar las propiedades de la superficie de los metales.

Por medio de este proceso se genera una mayor:

- ♦ Resistencia corrosiva
- ♦ Resistencia al contacto con químicos
- ♦ Mejoramiento de las propiedades físicas y mecánicas
- ♦ Tolerancia a niveles más altos a las fricciones

2.9.1 Descripción del sector galvánico.

El sector de la industria galvanotecnia está agrupado bajo el conjunto de industrias dedicadas a la fabricación de productos metálicos, con excepción de maquinaria y equipo. Existe en Bogotá numerosos establecimientos enmarcados en esta agrupación, dispersos tanto en las residencias como en industrias. La industria galvanotecnia incluye un gran número de empresas dedicadas a prestar un servicio parcial de las piezas, con excepción de unas pocas que manufacturan totalmente las piezas. Los diferentes procesos de galvanotecnia depende del tipo de elemento que va a ser tratado; a manera de ejemplo, el cromado, niquelado y cobreado, se realiza para herramienta agrícolas, rines, electrodomésticos, autopartes, etc.; el plateado y el dorado para joyería y bisutería.

El tamaño de operación de las plantas de galvanotecnia varía desde pequeños talleres hasta organizaciones más consolidadas. Como ya se mencionó, la planta galvánica pueden ser integrada en serie a los proceso productivos metalmecánicos, o pueden ser plantas exclusivamente de servicios. En las plantas de servicio también se puede desarrollar operaciones de superficies de desbastado, pulido y brillado.

2.9.2 El proceso galvánico. La galvanotecnia es una técnica que consiste en la electrodeposición de un recubrimiento metálico sobre una superficie que puede ser metálicas o no. Recomendada para la reducción costos o por razones estructurales, es necesario modificar las características del metal seleccionado.

El objetivo del recubrimiento es mejorar la apariencia del metal base, protegerlo de la corrosión y de algunos casos, modificar alguna propiedad superficial, como por ejemplo, mejorar sus propiedades eléctricas o mecánicas, dar mayor dureza ejercer lubricación, etc. En galvanotecnia se consideran dos tipos de procesos: la galvanotecnia y la galvanostegia. El primero, se refiere al proceso en el que los recubren sobre superficies de metales no conductores; mientras que el segundo,

la galvanostegia, los recubrimientos siempre se realizan sobre elementos metálicos.²²

2.10 MARCO NORMATIVO

Para determinar las concentraciones máximas permisibles de vertimientos industriales dentro de nuestro país, debemos remitirnos a la legislación ambiental normas nacionales y específicas donde se citan estos parámetros para verter en cuerpos de agua o alcantarillado garantizando un impacto de menor alcance.

Las principales normas ambientales que regulan la legislación en la parte de protección de los recursos naturales (manejo de aguas) y la adecuada implementación. Las cuales pueden ser remitidas a normas más específicas como en el manejo de los vertimientos industriales.

NORMAS	DESCRIPCION
♦ Código de recursos naturales (Decreto-Ley 2811 de 1974)	El Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente, en su capítulo II, desarrolla la regulación para la prevención y la conservación de los recursos hídricos frente a la creciente contaminación de los recursos naturales renovable.
♦ Decreto 1594 DE 1984	Se establece dentro de esta norma de forma amplia y concisa lo referente al manejo adecuado y descarga de los vertimientos de aguas residuales, determinando los niveles máximos permisibles con los que pueden ser descargados los vertimientos en un cuerpo de agua, se implementó la utilización de los estudios de impacto ambiental y se establecieron procesos

²² Galvano Tecnia Planes de Accion para Mejoramiento Ambiental, Manual para Empresarios de La PYME, Editorial Acercar Bogota D:C 1997

	sancionatorios.
♦ Ley 99 de 1993 (Art 66)	Índica las competencias para cada una de las autoridades correspondientes en su jurisdicción, con la cual debe garantizar y verificar el manejo adecuado de los vertimientos generados por diferentes actividades industriales y que puedan generar daño inminente al medio.
♦ Resolución 1074 de 1997	Establecen estándares ambientales en materia de vertimientos. La norma indica los límites máximos en los que se puede generar descargas a un cuerpo de agua o alcantarillado público, estos niveles se mencionaran a continuación.

PARAMETRO	EXPRESADA COMO	NORMA (mg/l)
Arsénico	As (mg/l)	0,1
Bario	Ba (mg/l)	5,0
Cadmio	Cd (mg/l)	0,003
Carbonatos	Agente Activo (mg/l)	0,1*
Cianuro	CN (mg/l)	1,0
Cinc	Zn (mg/l)	5,0
Cloroformo Extracto de carbón	ECC (mg/l)	1,0
Cobre	Cu (mg/l)	0,25
Compuestos fenólicos	Fenol (mg/l)	0,2
Compuestos Organoclorados	Concentración de agente Activo	0,05*
Compuestos Organofosforados	Concentración de agente Activo	0,1*
Cromo hexavalente	Cr+6 (mg/l)	0,5
Cromo total	Cr total (mg/l)	1,0
DBO ₅	(mg/l)	1000*
Dicloroetileno	Dicloroetileno	1,0
Difenil Policlorados	Concentración de agente Activo	ND**
DQO	(mg/l)	2000
Grasas y Aceites	(mg/l)	100
Manganeso	Mn (mg/l)	0,12
Mercurio	Hg (mg/l)	0,02
Mercurio orgánico	Hg (mg/l)	ND**
Níquel	Ni (mg/l)	0,2

Fuente: Decreto 1074 de 1997, Artículo 3 niveles máximos permisibles para generar descarga en acuíferos o alcantarillado público.

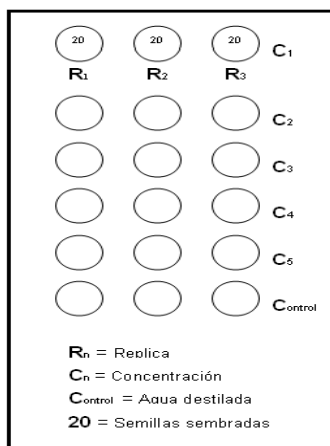
3 METODOLOGIA

La metodología se realizó en cuatro etapas de investigación; en la primera se llevaron a cabo los ensayos preliminares y ensayos definitivos con el fin de determinar la sensibilidad de la especie en estudio con el tóxico de referencia seleccionado: Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$). La segunda etapa, es todo lo concerniente a la generación de pruebas fitotóxicas para determinar la CE_{50} para el cobre y el níquel establecidos a partir de las sales de Sulfato de cobre y Sulfato de níquel; la tercera etapa es el montaje de la pruebas fitotóxicas para los vertimiento de cobre y níquel provenientes de la industria galvánica, estableciendo la CE_{50} de estos dos contaminantes. Se desarrolla un proceso de pre-tratamiento para los dos contaminantes (Cobre y Níquel) obtenidos de la industria para los cuales se generan pruebas fitotóxicas con el fin de establecer la CE_{50} e indicar la diferencia con los contaminantes antes del pre-tratamiento y después del pre-tratamiento; por ultimo en la cuarta etapa se obtiene el índice de toxicidad para cada uno de los contaminantes.

3.1 PRIMERA ETAPA

3.1.1 Diseño general de las pruebas eco-toxicológicas. Cada batería de ensayos se efectuó realizando el montaje mostrado en la Figura 3.

Figura 3. Estructura de la Prueba de Toxicidad Utilizando Semilla de Lechuga



De igual forma durante la realización de las diferentes pruebas se midieron y controlaron las siguientes variables:

3.1.1.1 Variable independiente. Esta variable se refiere a las concentraciones elegidas para aplicar en las pruebas de sensibilidad con la especie y el tóxico de referencia escogidos y diluciones a las cuales fue expuesta la especie de ensayo con agua de la industria galvánica.

3.1.1.2 Variables dependientes. Las más significativas durante la realización del proyecto son: la concentración efectiva (CE_{50}), la inhibición en el crecimiento de las raíces de las plántulas y los porcentajes de germinación que se obtendrán pasadas 120 horas (tiempo requerido para completar el proceso de crecimiento de las semillas).

3.1.1.3 Constantes. Las variables que permanecen constantes son las siguientes: número de semillas expuestas (60 por cada concentración), tiempo de exposición (120 horas), número de concentraciones (5, mas el blanco en cada prueba), fotoperiodo (oscuridad), volumen que se adicionan a los semillas expuestas (2ml).

Para la realización de las pruebas biológicas y el diseño del modelo experimental, se tomó como base la tesis realizada por Jairo Hernán López Celis Y Andrea Liliana Bayona Pineda

3.1.2 Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas.

PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE *LACTUCA SATIVA* L.

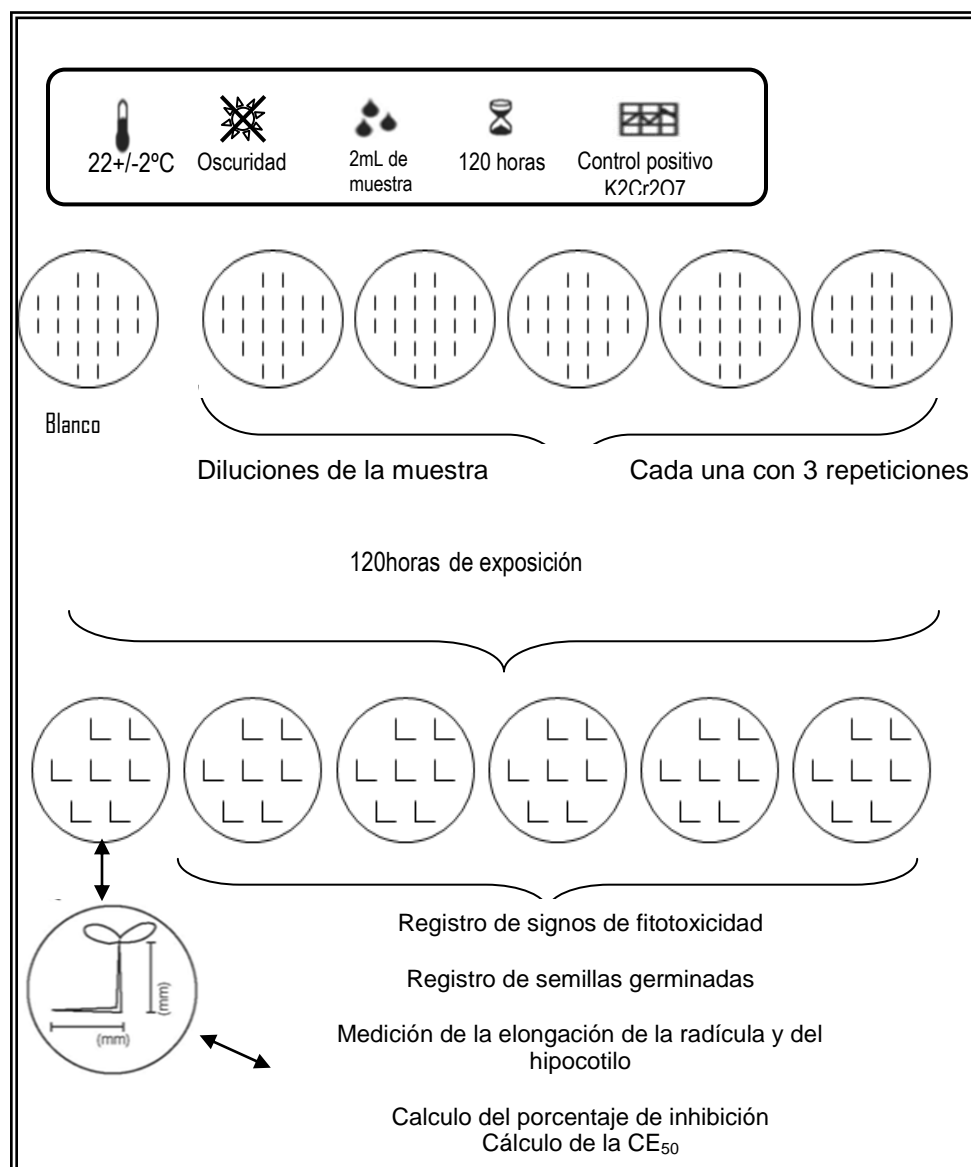


Figura 4. Retomada de: BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, María Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 4. Protocolos de Ensayo. Diciembre de 2004.

3.1.3 Reactivos y materiales

3.1.3.1 Selección de material biológico. El material biológico con el que se desarrolló el proyecto fue la semilla *Lactuca sativa* L., por su rápida germinación, facilidad de medición y viabilidad económica, además de las ventajas mencionadas a continuación:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.
- No requiere equipamiento sofisticado.
- Utilidad para el control de efluentes.

Estas plantas vasculares han sido recomendadas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la administración de medicamentos y alimentos (FDA), ambas de EE.UU., ya que presentan una eficiente sensibilidad, en comparación con otras especies de plantas terrestres (Wang, 1991).

La semilla utilizada durante la investigación tiene las siguientes características mencionadas en la tabla 1.

Tabla 1: CARACTERISTICAS DE LA SEMILLA (*LATUCA SATIVA*)

GERMINACION %	PUREZA%
90	99%

Fuente: Autor (2009)




3.1.3.2 Tóxico de referencia. Para las pruebas de sensibilidad se maneja dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$); para las pruebas con sustancias puras se utilizaron: sulfato de níquel ($NiSO_4$) y sulfato de cobre ($CuSO_4$), todos reactivos analíticos provenientes de laboratorios Merck.


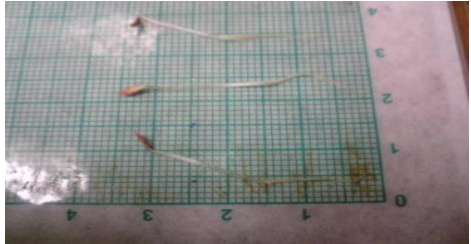


- El dicromato de potasio se denomina silicato de sodio. Sin embargo, una diferencia significativa es que las soluciones de silicato de potasio son ligeramente más viscosa que las soluciones de silicato de sodio correspondientes en concentraciones iguales. Pero como en el silicato de sodio, la viscosidad de la solución es afectada por la relación, concentración y temperatura. A menor relación, esto es más alcalino a un contenido de sólidos dado, menor será la viscosidad.

- El sulfato de níquel se presenta bajo forma de cristales de color azul o verde esmeralda y tiene una buena solubilidad en el agua y en el alcohol etílico; el sulfato de níquel se emplea fundamentalmente en la niqueladura y en la industria química para la fabricación de catalizadores para la hidrogenación de las grasas.
- El sulfato de cobre (II), también llamado sulfato cúprico (CuSO_4), vitriolo azul, piedra azul o caparrosa azul, es un compuesto químico derivado del cobre que forma cristales azules, solubles en agua y metanol y ligeramente solubles en alcohol y glicerina. Su forma anhidrica (CuSO_4) es un polvo verde o gris-blanco pálido, mientras que la forma hidratada ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) es azul brillante.

3.1.3.3 Material de laboratorio seleccionado

Tabla 2: Material empleado en bioensayos con (*Lactuca sativa*)

MATERIAL	IMAGEN
Cajas de Petri de 100 mm de diámetro	
Papel de filtro Whatman N°3 (o equivalente), 90 mm de diámetro	
Balones aforados de 1000ml y 100ml	

<p>Pipetas aforadas de 0,1, 1, 2 y 5</p> <p>Pipeteadores</p>	
<p>Cuadrícula milimetrada como elemento de medición, Pinzas</p>	
<p>Bandejas</p> <p>Forros de tela negra</p>	
<p>Botellas ámbar 1L y 500ml</p>	
<p>Beaker, erlenmeyer</p> <p>y embudos de vidrio</p>	

Fuente: Autor

3.1.4 Montaje de las pruebas de sensibilidad. Estas pruebas de sensibilidad se llevaron a cabo con el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con el fin de garantizar la efectividad de las semillas hacia las pruebas posteriores. Para esta determinación se realizaron 20 pruebas de sensibilidad, con 3 replicas y su pectivo blanco.

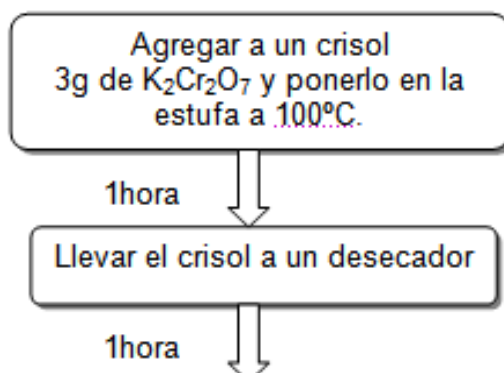
Foto 4: Montaje de las pruebas de sensibilidad

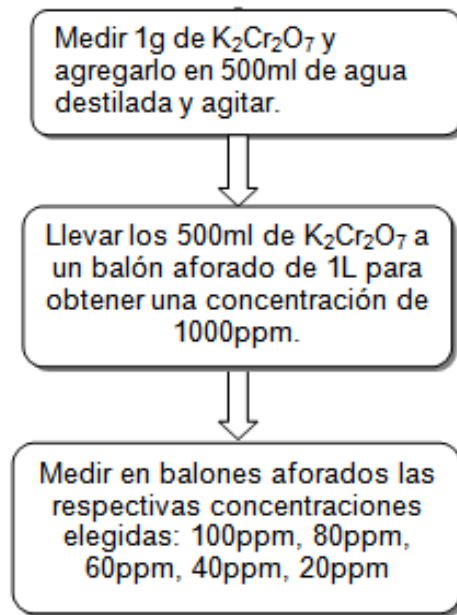


Fuente: Autor

3.1.4.1 Preparación de las diluciones. Se realizaron diluciones de 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm y 100ppm a partir de la muestra de dicromato de potasio obtenida, para lo cual se empleó el siguiente esquema:

Diagrama 2: Preparación de Diluciones





Fuente: Autor

3.1.4.2 Siembra de semillas. En cada caja de petri se ubica el papel filtro el cual es la cama de las 20 semillas, colocándolas en una secuencia de 2, 3, 5, 5, 3, 2; como se evidencia en la foto número cinco. Cabe mencionar que a cada una de las cajas se le agrega 2ml de la dilución del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), respectivamente cada una de las concentraciones tiene tres repeticiones. Obtenido el montaje las cajas son llevadas a las bandejas, para ser cubiertas por los forros de color negro y se almacenan durante 5 días lo que equivale a 120 horas en un lugar con condiciones estándares de temperatura y humedad.

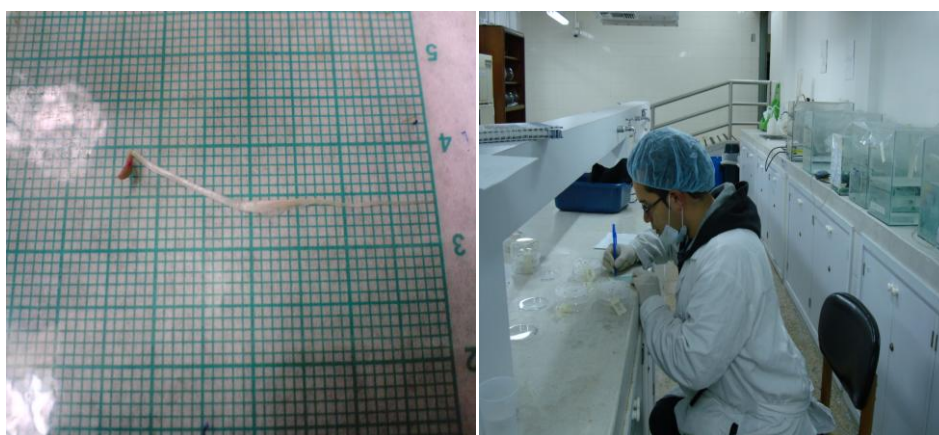
Foto 5: Elaboración y montaje de la siembra



Fuente: Autor (2009)

3.1.4.3 Mediciones de efecto. Al culminar el tiempo establecido previamente de 120 horas se procede a establecer los diferentes mediciones a las estructuras de las semillas, las cuales pueden estar afectadas por la exposición de las sustancias tóxicas. Se determinó el crecimiento de la radícula y el hipocotilo de cada una de las semillas, adicionalmente se estableció el número de semillas germinadas y no germinadas.

Foto 6: Medición de los efectos en los organismos

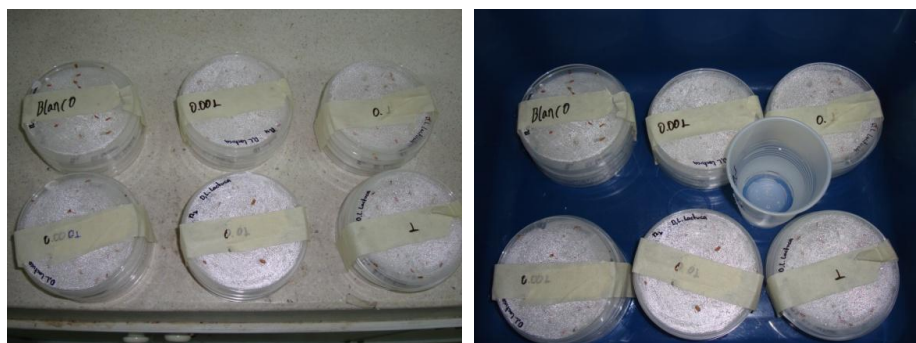


Fuente: Autor (2009)

3.2 SEGUNDA ETAPA

3.2.1 Montaje de las pruebas de sustancias puras. Estas pruebas para sustancias puras se llevaron a cabo mediante sulfato de níquel (NiSO_4) y sulfato de cobre (CuSO_4) con el fin de establecer la CE_{50} de las semillas. Con respecto a las sustancias para esta determinación se realizaron 10 pruebas para cada compuesto, con 3 réplicas y su respectivo blanco. Se establecen la CE_{50} del cromo a partir de los resultados obtenidos con el dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

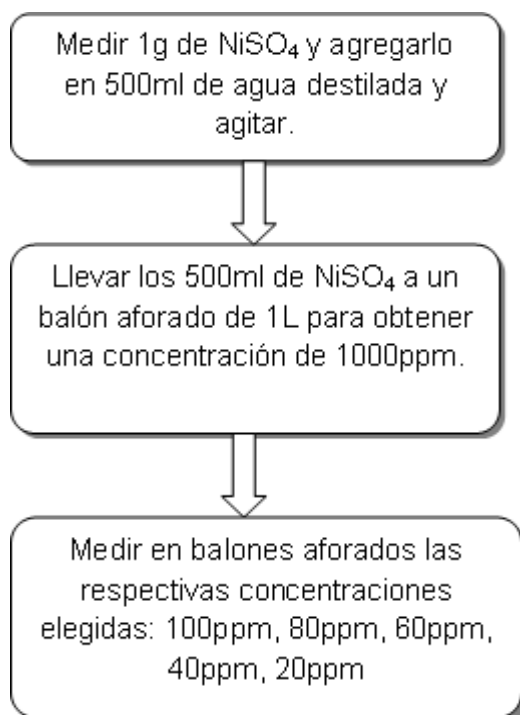
Foto 7: Montaje sustancias puras

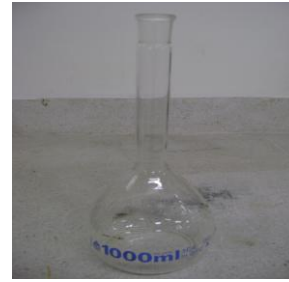
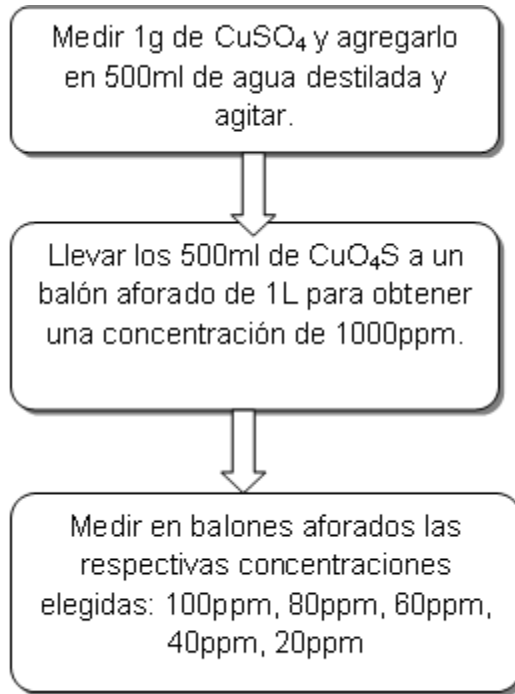


Fuente: Autor

3.2.2 Preparación de las diluciones. Se realizaron diluciones de 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm y 100ppm a partir de la muestra de sulfato de níquel (NiSO_4) y sulfato de cobre (CuSO_4), para lo cual se empleó el siguiente esquema:

Diagrama 3: Diluciones sustancias puras



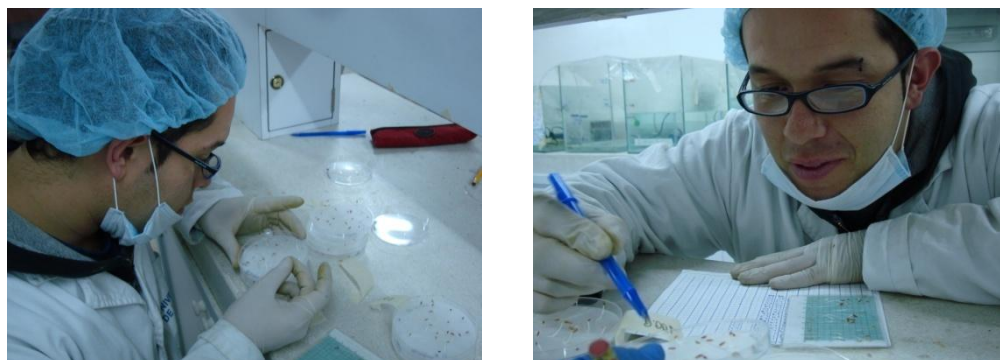


Fuente: Autor

3.2.3 Siembra de semillas. En cada caja de petri se ubica el papel filtro el cual es la cama de las 20 semillas, colocándolas en una secuencia de 2, 3, 5, 5, 3, 2 (como se evidencia en la siguiente imagen). Cabe mencionar que a cada una de las cajas se le agregó 2ml de cada una de las diluciones de sulfato de níquel (NiSO_4) y sulfato de cobre (CuSO_4). Obtenido el montaje las cajas son llevadas a las bandejas, para ser cubiertas por los forros y se almacenan durante 5 días lo que equivale a 120 horas.

3.2.4 Mediciones de efecto. Se determinó el crecimiento de la radícula y el hipocotilo de cada una de las semillas, adicionalmente se estableció el número de semillas germinadas y no germinadas.

Foto 8: Medición de efecto toxico



Fuente: Autor

3.2.5 Caracterización del vertimiento. Para determinar las características fisicoquímicas provenientes de la industria galvánica, se realizaron pruebas in-situ de: Conductividad, Oxígeno disuelto, Temperatura y pH, para cada una de las piscinas de almacenamiento de los metales pesados (Ni y Cu). En el caso de la Demanda Bioquímica de Oxígeno, la demanda Química de Oxígeno y los Sólidos Suspendidos Totales, se recolectó muestras del vertimiento con el fin de analizarlos en el laboratorio. En la fotografía número 8 se observan los puntos tomados para cada uno de los vertimientos dentro de la industria galvánica

Foto 9: Toma de muestras en la industria galvánica



Fuente: Autor

3.2.5.1 Técnicas utilizadas. Durante la caracterización in-situ se manipularon equipos de medición directa como el Multiparametro Hanna y el medidor de Oxígeno disuelto Hanna, los cuales estaban debidamente

calibrados. Conforme a las muestras recolectadas se utilizaron métodos de medición directa como:

- ♦ **La Respirimetría.**
- ♦ **El Reflujo Cerrado.**
- ♦ **La Gravimetría.**

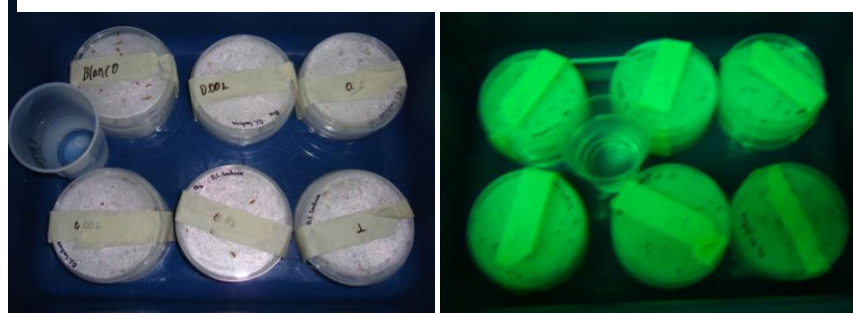
3.3 TERCERA ETAPA

3.3.1 Montaje de Pruebas del vertimiento. La generación de este tipo de pruebas es proveniente de la industria Galvánica. Se llevaron a cabo por separado para cada uno de los metales con el fin de establecer la CE_{50} , de las semillas con respecto a los vertimientos de Cobre y Níquel por lo que se realizaron 5 pruebas por cada uno, con 3 réplicas en cada una de sus concentraciones incluyendo el blanco como medio de control.

3.3.1.1 Preparación de las diluciones. Inicialmente se realizaron diluciones de 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm y 100ppm a partir de la muestras, pero debido a que en todas las pruebas el porcentaje de inhibición fue del 100% se procedió con el cambio de las concentraciones para cada uno de las muestras, quedando de la siguiente manera:

Para el vertimiento de cobre y níquel; las concentraciones elegidas fueron de 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm y 50ppm; Cabe mencionar que estas diluciones se manejaron volumen/volumen.

Foto 10: Inhibición total en las diluciones iniciales



Fuente: Autor (2009)

3.3.1.2 Siembra de semillas. En cada caja de petri se ubica el papel filtro el cual es la cama de las 20 semillas, colocándolas en una secuencia de 2, 3, 5, 5, 3, 2. Cabe mencionar que a cada una de las cajas se le agregan 2ml de cada una de las diluciones del vertimiento. Obtenido el montaje las cajas son llevadas a las bandejas, para ser cubiertas por los forros y se almacenan durante 5 días lo que equivale a 120 horas.

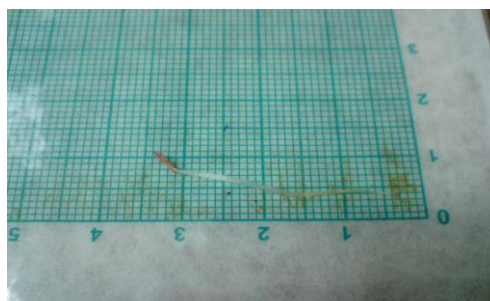
Foto 11: Siembra de semillas



Fuente: Autor (2009)

3.3.1.3 Mediciones del efecto tóxico. Se determinó el crecimiento de la radícula y el hipocotilo de cada una de las semillas, adicionalmente se estableció el número de semillas germinadas y no germinadas.

Foto 12: Medición del efecto toxico



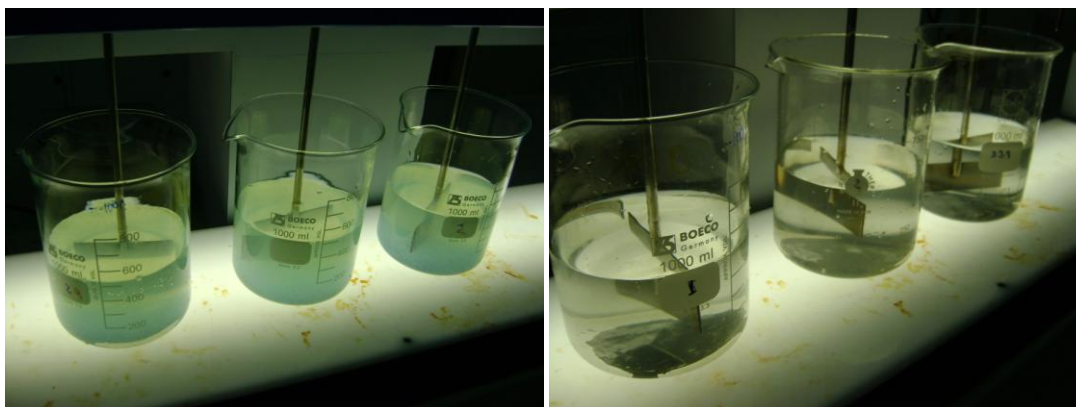
Fuente: Autor (2009)

3.3.2 Implementación del Pre-tratamiento a nivel de laboratorio para los vertimientos de cobre y níquel. se implemento un pre-tratamiento para cada uno de los vertimientos obtenidos de la industria galvánica después de sus actividades industriales; con el fin de reducir las concentraciones altas de cobre y níquel.

Para garantizar el proceso de los pre-tratamiento se realizan los siguientes pasos:

1. Se genera la Homogenización del vertimiento (Cobre y Níquel) en un beaker; Cada una de las muestras con un volumen de 3000 ml.
2. Se toma una muestra de 500ml del vertimiento, se determina el pH de la muestra el cual por su procedencia es de carácter ácido, el pH se modifica con hidróxido de sodio al 2 normal, el cual al ser mezclado con la muestra reacciona formando hidróxidos y estableciendo una precipitación física por medio de un proceso químico, el pH se debe llevar con la adición del hidróxido de sodio máximo a 10, para generar la formación de hidróxidos y establecer la precipitación del mismo.
3. Después de garantizar la precipitación del metal por medio de la conformación de hidróxidos se realiza un proceso de filtración, con el fin de retirar la formación de hidróxidos en la muestra pre-tratada.
4. Después del proceso de filtrado se obtiene un remanente al cual se le adiciona ácido sulfúrico al 1 normal para poder establecer el pH en 7.
5. Determinando previamente el pH del vertimiento obtenido en el pre-tratamiento se utiliza para realizar una serie de pruebas para obtener la CE_{50} con este tipo de nuevo vertimiento sin un nivel de concentración letal y otra parte del vertimiento pre-tratado se envía al laboratorio para obtener el nivel de concentración del metal en este tipo de vertimiento.

Foto 13: Montaje del pre-tratamiento para el níquel y el cobre



Fuente: Autor (2009)

3.3.2.1 Montaje de Pruebas con el Pre-tratamiento. Las pruebas del pre-tratamiento se llevaron a cabo para cada uno de los vertimientos cobre y níquel, con el fin de identificar el nivel de reducción en las concentraciones de cada una de estos metales en su vertimiento respectivo, obteniendo un paralelo con la pruebas iniciales sin tratar, para este tipo de ensayos se realizaron 5 pruebas por cada vertimiento, con 3 réplicas y su respectivo blanco.

3.3.2.2 Preparación de las diluciones. con la muestra del vertimiento de cobre y níquel pre-tratados de la industria galvánica se elaboran las siguientes concentraciones (20 ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm y 100ppm); para los dos tipos de vertimiento se desarrollo este tipo de diluciones, Cabe mencionar que estas diluciones se manejaron volumen/volumen.

3.3.2.3 Siembra de semillas. En cada caja de petri se ubica el papel filtro el cual se coloca en la base de cada caja convirtiéndose en la cama de las 20 semillas, colocándolas en una secuencia de 2, 3, 5, 5, 3, 2. Cabe mencionar que a cada una de las cajas se le agregan 2ml de cada una de las diluciones del vertimiento pre-tratado. Obtenido el montaje, las cajas son llevadas a las bandejas, para ser cubiertas por los forros y se almacenan durante 5 días lo que equivale a 120 horas.

3.3.2.4 Mediciones de efecto. Se determinó el crecimiento de la radícula y el hipocotilo de cada una de las semillas, adicionalmente se estableció el número de semillas germinadas y no germinadas.

3.4 CUARTA ETAPA

3.4.1 Determinación del efecto tóxico potencial del vertimiento sin tratar y pre-tratado. La toxicidad de un contaminante genera diferentes tipos de efectos tóxicos dentro de una población de semillas, estos efectos se pueden contemplar como niveles de clasificación para los vertimientos que se generan en las

diferentes actividades. Con el fin de establecer estos niveles de efecto se generan las siguientes ecuaciones, la primera para determinar la carga toxica y con esta poder resolver la segunda ecuación que nos genera la determinación de índice de efecto tóxico.

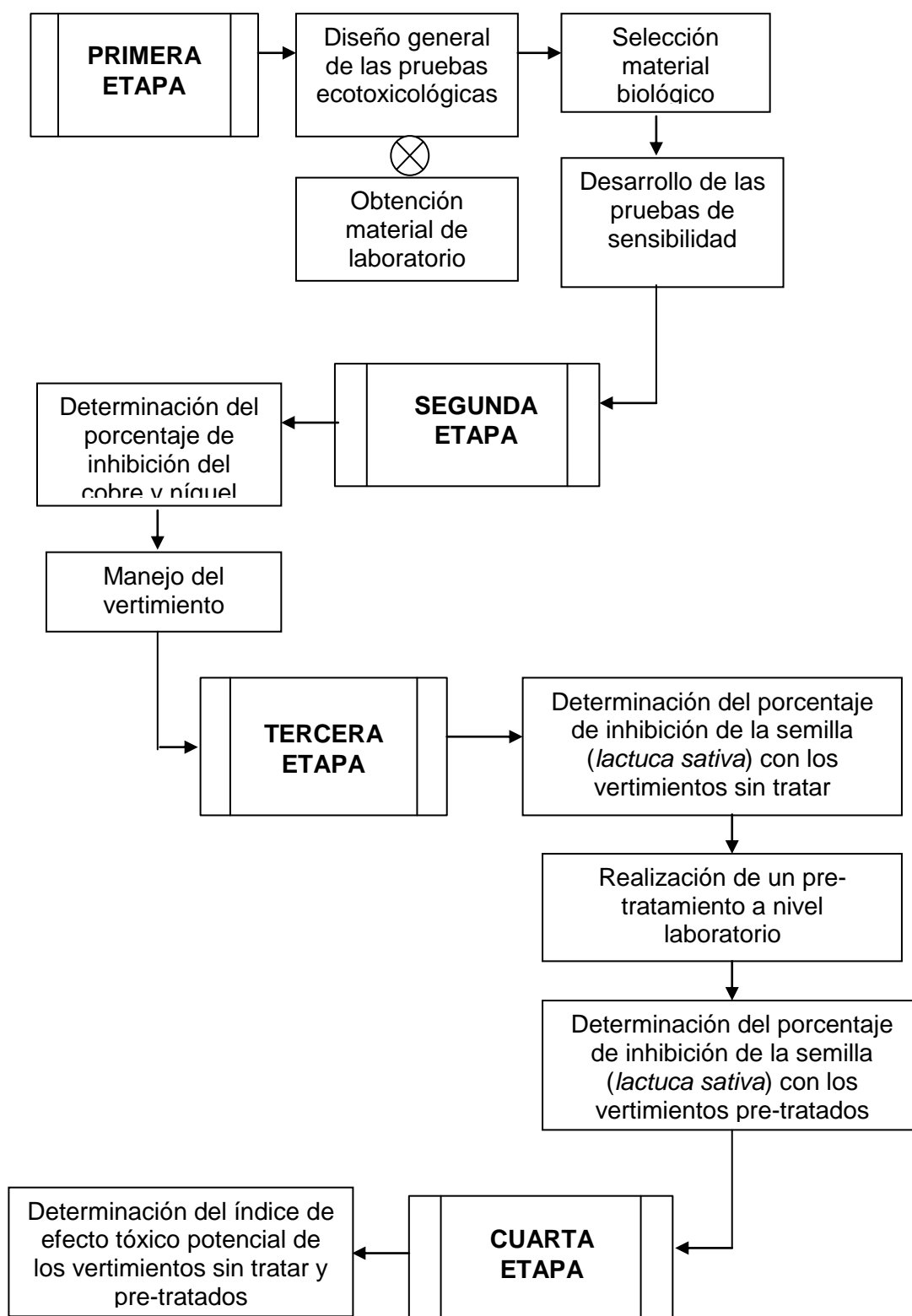
Ecuación 1
$$\text{Carga Tóxica (UT)} = \frac{100}{\text{CE50}} \cdot Q$$

Ecuación 2
$$\text{IT} = \text{Log} (1 + \text{UT})$$

Donde:

- ♦ Q: Caudal promedio del efluente, (m^3/mes) el cual varía según la producción de la Industria evaluada.
- ♦ CE 50: Concentración de Inhibición Media.
- ♦ CT: Carga Toxica, expresada en unidades toxicas.
- ♦ IT: Índice Toxicológico.

3.4.2 Diagrama de la metodológica. Se especifica de modo gráfico etapa por etapa de la metodología empleada en la investigación.



4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A partir de la metodología y etapas establecidas en la realización de esta investigación, al igual que los criterios generados para esta, se desarrollaron y emplearon las siguientes pruebas:

- ♦ Pruebas de sensibilidad con Dicromato de Potasio.
- ♦ Pruebas con sustancias puras.
- ♦ Pruebas con el vertimiento de Cobre y Níquel.

En los resultados obtenidos en relación con las pruebas mencionadas anteriormente, se desarrolló el análisis por cada una de estas como se evidencia a continuación:

4.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$).

Según la etapa de germinación de las plántulas, probablemente se presenta mayor sensibilidad al contacto con sustancias toxicas o agentes externos, los cuales pueden posibles efectos en el desarrollo de la plántula, la cual se debe determinar por el tiempo que toma la semilla en germinar. Esta etapa es de gran importancia para la definición de la duración de las pruebas a realizar; el tiempo de germinación fue de 120 horas. Al finalizar este periodo se puede realizar mediciones a esta plántula germinada además de determinar los niveles de afectación o generación de efectos negativos por el contacto con la sustancia ya mencionada.

En relación con el proceso de las pruebas de sensibilidad con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), se buscó ejecutar la carta de control de la especie en estudio, semilla de lechuga (*Lactuca sativa*). Según el análisis de estas pruebas se encontró:

- ♦ Las concentraciones efectivas media (CE_{50}), que afectaban la especie en un 50% de la población con un valor del 35.463 ppm.
- ♦ La desviación estándar registrada, tomada con la medición de la elongación de la radícula y el hipocotilo, los cuales fueron tomados cuando la semilla germinaba después de las 120 horas, estos datos fueron registrados en milímetros (mm).
- ♦ Se determinó los límites máximos y mínimos de la concentración efectiva media (CE_{50}) en el desarrollo de las pruebas.

4.1.1 Sensibilidad Valor de la concentración efectiva media (CE_{50}). Por medio de cada una de las pruebas realizadas con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), por medio del programa estadístico (Probit), se obtuvieron de cada una de las pruebas fitotóxicas los siguientes resultados (tabla numero 3):

Tabla 3: Resultados de CE_{50} de las pruebas de sensibilidad
Con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

PRUEBAS	CE_{50} mg/L	LIMITE INFERIOR CE_{50}	LIMITE SUPERIOR CE_{50}
1	31.724	24.948	37.640
2	34.803	29.722	39.499
3	44.142	35.764	51.978
4	30.052	22.059	36.809
5	43.687	39.099	48.166
6	34.646	22.962	43.909
7	31.423	20.514	40.262
8	31.095	44.081	57.862
9	37.291	31.961	42.288
10	35,383	26.728	42.934
11	41.338	33.061	48.803
12	32.326	22.620	40.407
13	36.463	28.234	43.209
14	40.811	33.698	53.278
15	32.544	25.722	38.538
16	30.645	23.581	36.702

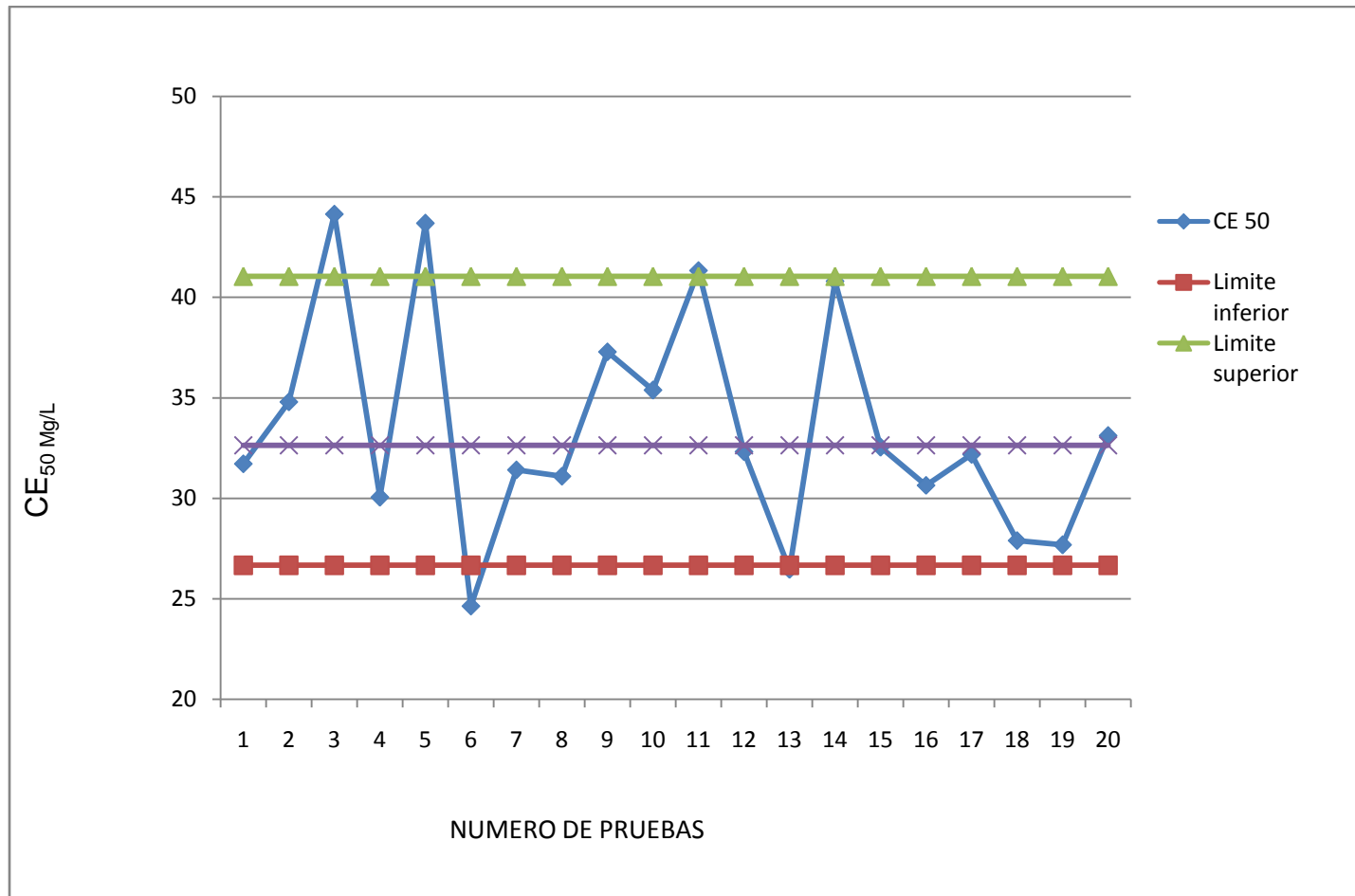
17	32.187	25.121	38.343
18	27.901	20.386	34.224
19	27.685	22.441	32.284
20	33.116	27.691	38.034
Promedio	35.463	28.019	42.258

Fuente: Autor (2009)

En la tabla 3 se establecen la CE_{50} de las pruebas fitotóxicas con Dicromato de Potasio desarrolladas en este ciclo con sus respectivos límites inferiores y superiores los cuales se obtuvieron por medio del programa estadístico Probit, se encontró una CE_{50} de 35,463, un límite inferior de 28,019 y uno superior de 42,258. Esto significa que 35,463 mg/L de Dicromato de Potasio producen el 50% de inhibición de la elongación de la radícula y del hipocotilo de la semilla expuesto. Se compararon estos resultados con diferentes trabajos investigativos que emplearon la semilla de lechuga Batavia (*Lactuca sativa*), dentro de los cuales se encontró la determinación del efluente de la (PTAR) de la calera cuyo bioindicador fue el mismo ya antes mencionado y se encontró que la sensibilidad de este trabajo investigativo se establece dentro del rango de sensibilidad establecido por los investigadores del proyecto de la determinación del efluente de la (PTAR) de La Calera.

4.1.2 Carta control para el dicromato de potasio. En la gráfica número 2 se representa el comportamiento que sostuvo la semilla expuesto a la sustancia de referencia tóxica (Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)) durante las diferentes pruebas fitotóxicas:

Grafica 1: Carta control para el Dicromato de Potasio



Fuente: Autor (2009)

En la grafica número 2 se puede observa que las pruebas toxicológicas con el Dicromato de Potasio se encuentran dentro de los límites inferior y superior establecidos por lo que se puede mencionar una estabilidad dentro de la mayoría de las pruebas. Se puede detectar que al comienzo del ciclo de pruebas se generaron puntos por fuera de los límites esto se pudo generar por influencia de agentes externos como alteraciones en la humedad y temperatura.

4.1.3 Análisis Anova para las pruebas fitotóxicas con Dicromato de Potasio.

Siguiendo la metodología del protocolo LB07 de “Análisis de Varianza” (Ver Anexo B), se realizó el análisis correspondiente de varianza para los ensayos sobre *Lactuca Sativa*, teniendo en cuenta los resultados en las lecturas de cada una de las pruebas.

A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el Dicromato de Potasio; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 5, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 6.

Tabla 4: Pruebas de Sensibilidad

Concentración Nominal	No. De réplicas			Total	Promedio
	1	2	3		
Control	0	0	0	0	0
20ppm	7	6	8	21	7
40 ppm	15	18	12	45	15
60 ppm	21	17	12	50	17
80 ppm	16	19	17	52	17
100 ppm	17	19	22	58	19
Total				226	75

Fuente: Autor (2009)

Tabla 5: Tratamientos Anova para las pruebas de sensibilidad

Tratamiento	6
Observaciones	3
Total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 6: Resultados Anova para las Pruebas de sensibilidad

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedios de Cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre Grupos	840,44	5	168,09	25,86	3,11
Dentro de Grupos	78,00	12	6,50		
Total	918,44	17			

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la tabla 6 el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis alterna (H_1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en las semillas de prueba.

Se realizó el mismo análisis para las 20 pruebas, obteniendo:

Tabla 7: Resultados Anova para Todas las pruebas de Sensibilidad

No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado
1	28/07/2008	25,86	3,11	Se acepta H_1
2	28/07/2008	26,00	3,11	Se acepta H_1
3	28/07/2008	35,40	3,11	Se acepta H_1
4	28/07/2008	63,35	3,11	Se acepta H_1
5	28/07/2008	13,54	3,11	Se acepta H_1

6	06/08/2008	42,49	3,11	Se acepta H1
7	06/08/2008	34,21	3,11	Se acepta H1
8	06/08/2008	84,59	3,11	Se acepta H1
9	06/08/2008	94,45	3,11	Se acepta H1
10	06/08/2008	77,79	3,11	Se acepta H1
11	13/08/2008	27,50	3,11	Se acepta H1
12	13/08/2008	24,06	3,11	Se acepta H1
13	13/08/2008	18,25	3,11	Se acepta H1
14	13/08/2008	38,38	3,11	Se acepta H1
15	13/08/2008	46,66	3,11	Se acepta H1
16	20/08/2008	42,11	3,11	Se acepta H1
17	20/08/2008	36,81	3,11	Se acepta H1
18	20/08/2008	28,29	3,11	Se acepta H1
19	20/08/2008	60,73	3,11	Se acepta H1
20	20/08/2008	65,96	3,11	Se acepta H1

Fuente: Autor (2009)

La tabla 7 muestra que el F calculado para cada una de las pruebas realizadas, es mayor al F teórico 3,11, dando como resultado la aceptación de H1, lo cual indica que al aumentar la concentración de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), aumenta también la inhibición de las plántulas expuestas, por tanto los datos demuestran confiabilidad para la CE_{50} para el Dicromato de Potasio.

4.1.4 Relación Dosis-Respuesta con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$). En esta relación se indican las diferencias de porcentaje en la inhibición de la plántula, cuando se modifican las concentraciones a las que se someten las semillas, definiendo los efectos que produce cada una de estas concentraciones (100, 80, 60, 40, 20) mg/l; dichas concentraciones fueron determinadas por investigaciones anteriores, las cuales revelan que estos valores promedio se emplean en tipos de pruebas de investigación como ésta.

En tabla 8 se mencionan los diferentes rangos de germinación determinados por las diversas concentraciones.

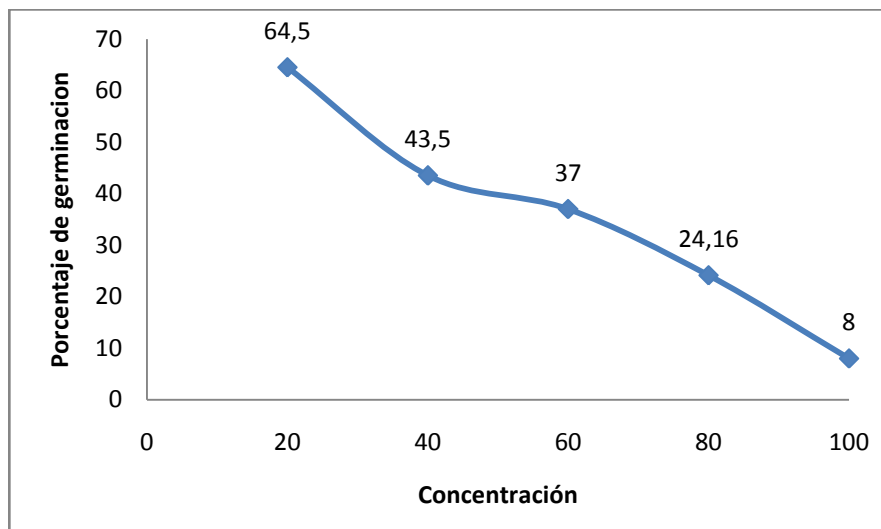
Tabla 8: Porcentaje de germinación dosis-respuesta

CONCENTRACIONES (ppm)	% GERMINACION
100	8,0
80	24,16
60	37,0
40	43,5
20	64,5
BLANCO	96,66

Fuente: Autor (2009)

En la gráfica número 2 se observa la diferencia presente entre la reducción de las concentraciones y los niveles de germinación, en cada una de estas.

Grafica 2: Comparación dosis-respuesta con Dicromato de Potasio



Fuente: Autor (2009)

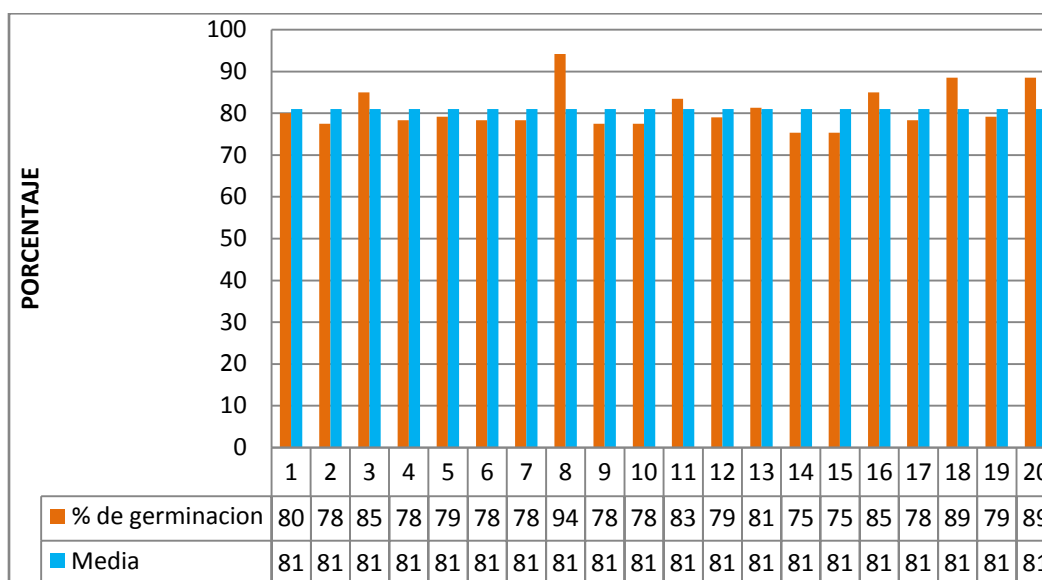
Según los resultados obtenidos en la gráfica número 2, se evidencian los niveles de afectación directa que puede generar las sustancias tóxicas al interactuar con semillas como la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*). Se observó que a medida que disminuyen las concentraciones (100, 80, 60, 40, 20 y Blanco (ppm)) sus niveles de germinación se presentan de manera creciente, indicando que en las concentraciones altas como la de 100 y 80 ppm, estos niveles de germinación se encuentran entre el 8% y 24,16 % los cuales son muy bajos y su afectación sobre

las semillas genera una inhibición alta. De igual modo, genera por medio de su Fitotoxicidad síntomas de necrosis y retraimiento de la plántula reflejándose en las partes de medición las cuales corresponden a la radícula e hipocotilo.

En la gráfica número 2 se pueden evidenciar los diferentes efectos generados por el agente tóxico, observando que las concentraciones altas en las semillas, generan una inhibición elevada casi del 90 al 95%; por ende se puede identificar la presencia del pre-tratamiento en la plántula, determinando en la parte superior (punta) de la radícula y del hipocotilo una quema por la exposición del agente tóxico al semilla. Sin embargo, en las concentraciones más bajas el nivel de germinación se determinó entre el 70% al 95 % con lo cual se puede identificar que la germinación es directamente proporcional al nivel de la concentración y que esta afecta de forma directa a las semillas expuestas en la prueba.

En la gráfica número 4, se puede observar un paralelo entre las diversas pruebas de sensibilidad realizadas durante la investigación para determinar los diferentes porcentajes de germinación en cada uno de los ensayos:

Grafica 3: Porcentaje de germinación para sensibilidad con Dicromato de Potasio



Fuente: Autor (2009)

Como se evidencia en la grafica 4 y despues del análisis estadístico, la media se determinó como la constante de germinación en las pruebas realizadas con dicromato de potasio; la media obtuvo un valor de 80.99, este dato nos indica que

las semillas bajan sus especificaciones de germinación de un 90 a 95% otorgadas por el proveedor en presencia del agente tóxico, indicándonos una reducción del casi 10% en la germinación de la semilla. Manifestando influencia en el desarrollo de ésta directamente por la presencia del dicromato de potasio y generando alteraciones en la semilla.

4.1.5 Medición de la radícula y hipocotilo para pruebas de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$). En el desarrollo de las pruebas de sensibilidad, se empleó como agente tóxico el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), generando mediciones de la radícula y el hipocotilo, con el cual se definieron los niveles de afectación en el crecimiento de la plántula.

A continuación se encuentra la tabla 9 en la cual se relacionan los datos con énfasis en crecimiento de la radícula y del hipocotilo en cada una de las 20 pruebas fitotóxicas realizadas.

Tabla 9: Mediciones del crecimiento para el radículo y el hipocotilo en las pruebas de sensibilidad (mm)

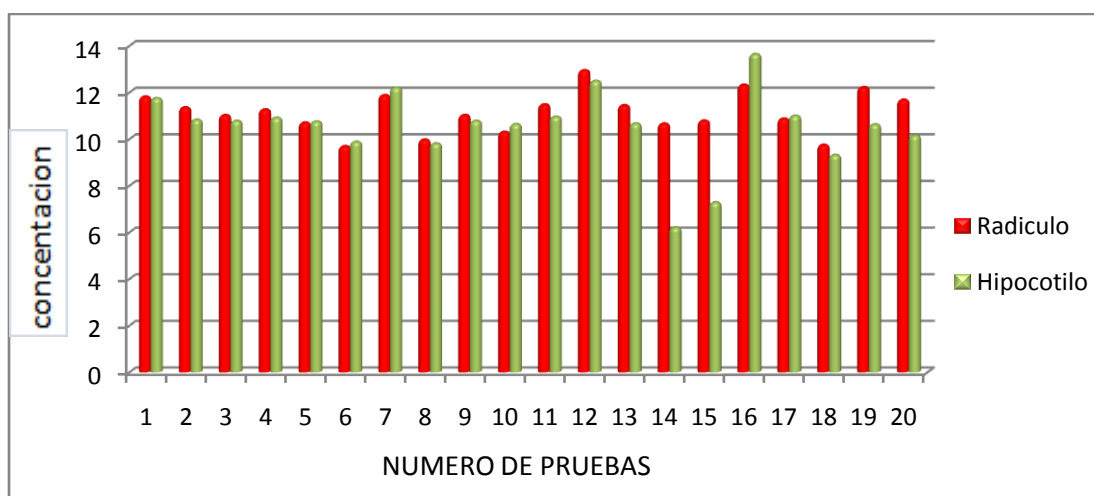
PRUEBAS	RADÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	11.828	11.759
2	11.366	10.836
3	11.034	10.787
4	11.276	10.920
5	10.713	10.758
6	9.700	9.888
7	11.886	12.212
8	9.980	9.813
9	11.034	10.787
10	10.315	10.641
11	11.49	10.965
12	12.957	12.502
13	11.458	10.670

14	10.670	6.210
15	10.798	7.289
16	12.331	13.650
17	10.884	11.005
18	9.757	9.320
19	12.229	10.633
20	11.691	10.156
promedio	11.1698	10.5400

Fuente: Autor (2009)

En la tabla 9 se generó la comparación de las longitudes para cada una de las pruebas enfrentando la radícula con el hipocotilo; generando un promedio para todas las pruebas fitotóxicas en este ciclo, donde se menciona que la radícula obtuvo un promedio de 11.1698mm y el hipocotilo un promedio de 10.5400mm con el que se puede mencionar que el hipocotilo tiene un mayor nivel de afectación que la radícula, la cual se desarrolla en un porcentaje mayor que el hipocotilo.

Grafica 4: Medición del crecimiento para la Radícula y el Hipocotilo en las pruebas de sensibilidad



Fuente: Autor (2009)

La gráfica 5 muestra la influencia durante todas las pruebas por parte del agente tóxico y determina la misma intensidad en cada una de ellas, de igual manera el montaje de las pruebas fitotóxicas se realizó bajo los mismos parámetros; el crecimiento de la radícula fue mayor presentando un porcentaje entre el 80% y

85%, lo que no ocurrió con el hipocotilo como se evidencia en la gráfica generando un porcentaje menor de longitud de la semilla. De las pruebas se debe destacar las números 14 y 15 en las cuales el crecimiento de la radícula fue superior que el del hipocotilo; en el crecimiento del hipocotilo podemos mencionar que en la mayoría de las pruebas se mantuvo un crecimiento cercano al de la radícula como se observa en las pruebas iniciales de la 1 a la 10 y se discrimina la número 16, ya que en ella se generó un crecimiento mayor que el de la radícula en un porcentaje considerable.

4.2 ANÁLISIS DE PRUEBAS TÓXICOLÓGICAS DE COBRE Y NÍQUEL A PARTIR DE LAS SALES SULFATO DE COBRE Y SULFATO DE NÍQUEL.

Se determina las sustancias a emplear, para cada uno de los elementos, para el cobre se empleo el sulfato de cobre (CuSO_4) en el caso del níquel el sulfato de níquel (NiSO_4); los cuales se eligieron por sus características de concentración, su fácil acceso, además, de su disponibilidad para la elaboración de las pruebas.

4.2.1 Bioensayos realizados con sustancias puras. Se procede con el montaje pertinente de las pruebas fitotóxicas, donde se contó con 10 bioensayos por cada uno de las sustancias puras evaluadas (Cobre y níquel), estos bioensayos manejan tres réplicas las cuales minimizan y garantizan los datos obtenidos dentro de cada una de ellas; realizando las siguientes diluciones (100, 80, 60, 40, 20 y blanco) esta última como sistema de control del medio de germinación, asegurando el desarrollo de las pruebas de manera adecuada. Las pruebas se aceptan en primera instancia si no se presentan anomalías graves dentro del control, en este caso las réplicas del blanco las cuales no deben presentar una inhibición alta de sus semillas.

4.3 VALOR DE LA CONCENTRACIÓN MEDIA DE INHIBICION (CE_{50}) PARA EL COBRE A PARTIR DE LA SUSTANCIA PURA (CuSO_4).

Las pruebas expuestas a continuación se realizaron con el fin de determinar la CE_{50} , que generan las concentraciones de inhibición media de las semillas frente al agente tóxico de referencia (cobre) por medio del programa estadístico (PROBIT). Con el desarrollo de estas pruebas se generó la necesidad de modificar las concentraciones del agente tóxico, cambiando las concentraciones iniciales de (100, 80, 60, 40 y 20) mg/L; a las concentraciones finales de (20, 15, 10, 5 y 1) mg/L. estas concentraciones se prepararon a partir de la sal sulfato de cobre ($CuSO_4$).

En la tabla 10 se registra las CE_{50} determinadas por medio de las pruebas realizadas con el agente tóxico cobre.

TABLA 10: La CE_{50} registrada con las pruebas de Cobre

PRUEBAS	CE_{50}	CE_{50} INFERIOR	CE_{50} SUPERIOR
1	6.754	2.258	9.432
2	3.489	2.279	4.727
3	4.897	3.057	6.927
4	2.712	1.414	7.866
5	2.782	0.786	5.072
6	5.838	2.428	8.992
7	3.615	2.053	5.252
8	4.716	3.1794	6.306
9	2.717	1.814	3.657
10	3.665	2.143	5.293
Promedio	4.119	2.141	6.352

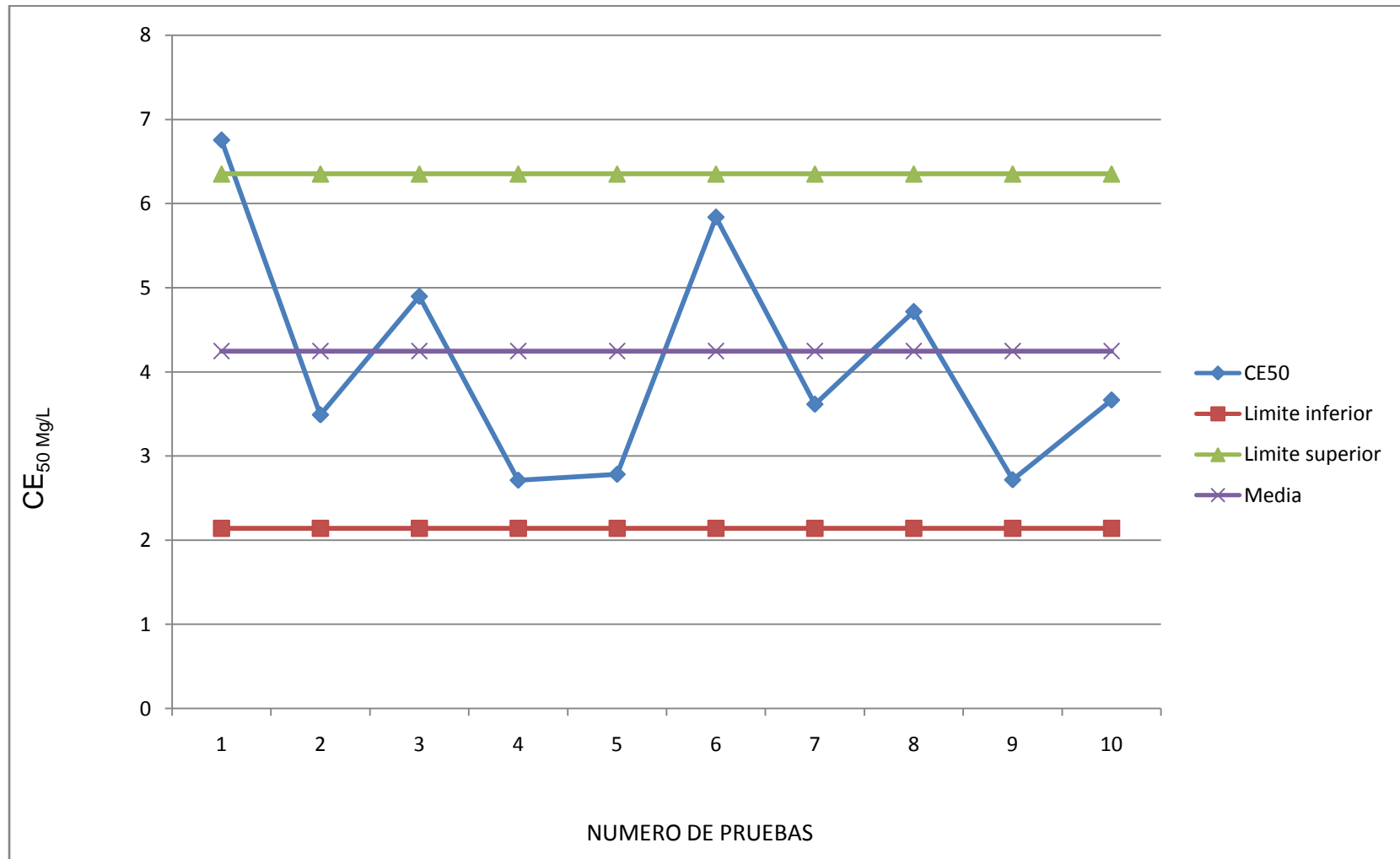
Fuente: Autor (2009)

En la tabla 10 se muestra los resultados de las CE_{50} , determinadas por el programa (PROBIT); revelando las concentraciones en las que las semillas expuestas a las sustancias toxicas generan inhibición de más del 50%. De igual modo se establece el valor promedio de la CE_{50} , con un valor de 4.119 mg/L, y estableciendo la zona de aceptación con un límite inferior de 2.141mg/L y límite superior de 6.352mg/L; indicando la zona donde se pueden establecer las diferentes pruebas fitotóxicas para este tipo de sustancia.

4.3.1 Grafica número 5, carta de control para cobre a partir de la sustancia pura.

Por medio de la carta control realizada, se identifica el comportamiento de las semillas dentro de la exposición al agente tóxico (cobre), observando la ubicación de un punto fuera de la zona establecida por los límites superior y el inferior, sin manifestar una distancia alta de la zona de aceptación, con una concentración del 6.754 mg/L; En las demás pruebas realizadas, se establece un comportamiento normal y equilibrado frente a la zona delimitada, es válido hacer referencia a la prueba numero 4, ya que desarrolló un nivel elevado de inhibición frente a las demás, con una concentración del 2.712 mg/L. Esta prueba genero afectación externa por una concentración mayor del agente tóxico o por afectaciones del ambiente en el cambio de humedad y temperatura desarrollando un nivel más alto de inhibición de las semillas. En esta carta control se ejecutaron 10 pruebas fitotóxicas, garantizando la veracidad de los resultados obtenidos.

Grafica 5: Carta control para el Cobre a partir de la sustancia pura



Fuente: Autor (2009)

4.3.2 Anova de cobre a partir de la sustancia pura. A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el Cobre a partir de la sustancia pura; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 12, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 13.

Tabla 11: Pruebas de cobre a partir de la sustancia pura

concentración	Número de réplicas			total	promedio
	R1	R2	R3		
20	17	14	19	50.0	16.67
15	15	13	13	41.0	13.67
10	5	6	7	18.0	6.00
5	5	7	6	18.0	6.00
1	3	3	1	7.0	2.33
Blanco	0	0	0	0.0	0.00
total				134	44.67

Fuente: Autor (2009)

Tabla 12: Tratamientos Anova para Pruebas de cobre con sustancia pura

Tratamiento	6
Observaciones	3
Total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 13: Resultados Anova para Pruebas de cobre con sustancia pura

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	471.33	5	94.27	3.96	3.11
Dentro de Grupos	428.5	18	23.81		
Total	899.83	23			

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis alterna

(H1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en las semillas prueba.

Para las demás pruebas los resultados se encuentran en la tabla numero 14.

Tabla 14: Resultados Anova para todas las Pruebas de cobre a partir de sustancia pura

No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado
1	03/09/2008	3,96	3,11	Se acepta H1
2	03/09/2008	5,87	3,11	Se acepta H1
3	10/09/2008	4.95	3,11	Se acepta H1
4	10/09/2008	13,46	3,11	Se acepta H1
5	17/09/2008	7,11	3,11	Se acepta H1
6	17/09/2008	4,86	3,11	Se acepta H1
7	24/09/2008	5,32	3,11	Se acepta H1
8	24/09/2008	3,74	3,11	Se acepta H1
9	01/10/2008	4,39	3,11	Se acepta H1
10	01/10/2008	5,03	3,11	Se acepta H1

Fuente: Autor (2009)

4.3.3 Relación dosis-respuesta para el cobre. En el análisis referente a las dosis administradas del agente tóxico y la exposición generada frente a las semillas, se obtuvieron diferentes niveles de germinación establecidos en la tabla número 15.

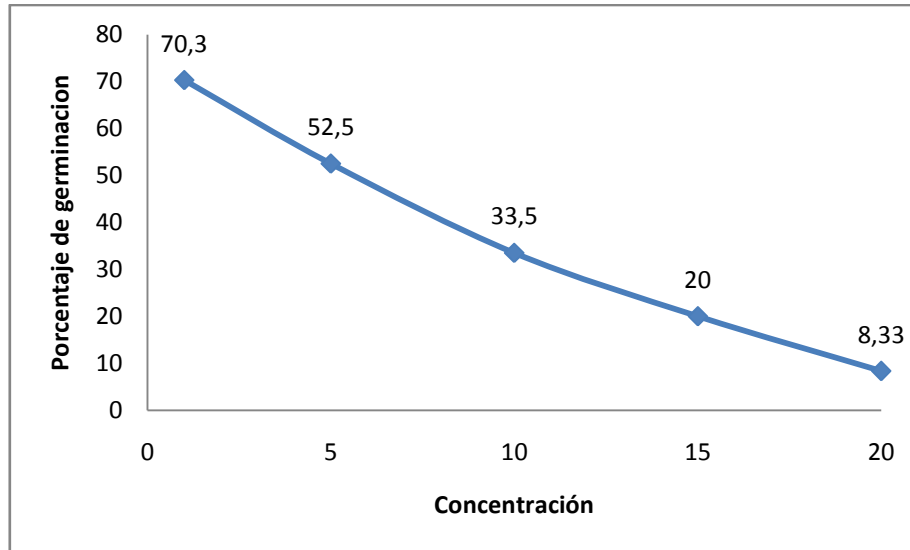
Tabla 15: Paralelo de Concentración vs Germinación

CONCENTRACIONES (ppm)	% GERMINACIÓN
20	8.33
15	20.67
10	33.50
5	52.50
1	70.33
BLANCO	93.17

Fuente: Autor (2009)

Los resultados obtenidos, nos indican el porcentaje de germinación el cual cambia notablemente con la modificación de las concentraciones de las pruebas realizadas con el agente tóxico (cobre), además de establecer que la relación dosis-respuesta es directamente proporcional como se nota en la gráfica número 6.

Grafica 6: Dosis-respuesta de Cobre



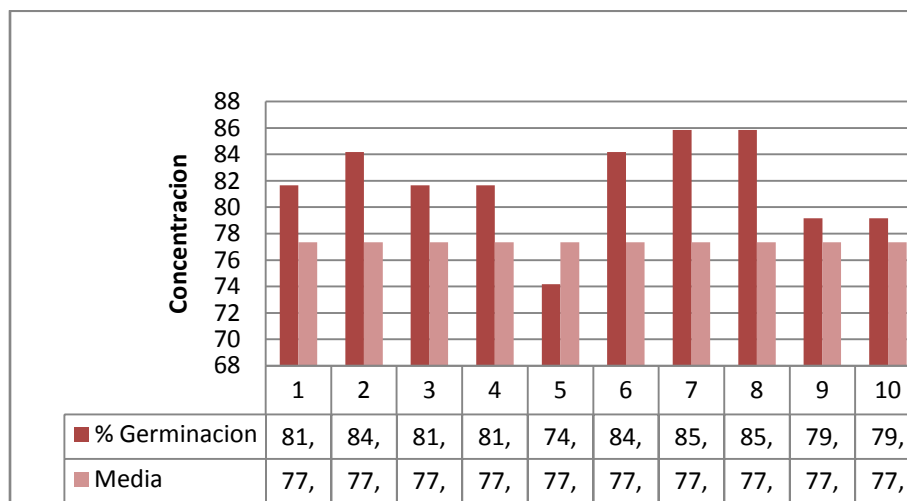
Fuente: Autor (2009)

En la gráfica número 6 se confrontan las concentraciones realizadas a estas pruebas fitotóxicas, al mismo tiempo se obtuvo el porcentaje de germinación de cada una de estas, para determinar el efecto generado a la exposición de las semillas de lechuga Batavia (*Lactuca sativa*).

Se reafirmo lo mencionado anteriormente que la dosis-respuesta es directamente proporcional y cuando se aumente las concentraciones de cobre se genera una inhibición más alta en los semillas expuestos durante las pruebas.

4.3.4 Tabla de germinación para el cobre. Al obtener los datos de germinación es propicio desarrollar una tabla y a su vez una gráfica en la que se permita observar la comparación entre las pruebas realizadas y la media de germinación.

Grafica 7: Porcentaje de germinación para **cobre**



Fuente: Autor (2009)

La gráfica 8 muestra la comparación de las 10 pruebas realizadas en esta fase, al igual que los diferentes porcentajes obtenidos con los que se halló la media, esta fue de 77.35, indicando que la prueba número 5 se encuentra en un nivel bajo con un porcentaje del 74.1%; en relación con las demás pruebas realizadas, obtuvieron un porcentaje de germinación mayor al de la media, como las pruebas número 7 y 8 que obtuvieron valores más altos con un porcentaje del 86 % cada una de ellas.

4.3.5 Mediciones de la longitud de la radícula y el hipocotilo para el cobre.

Las diferentes mediciones aplicadas a la radícula y al hipocotilo, fue una de las fases de mayor importancia en la obtención de los resultados, ya que en esta se pudo determinar los efectos, que puede desencadenar el agente tóxico en los semillas expuestos en cada una de las concentraciones y por ende en cada una de las pruebas.

En la tabla 16 se muestra las mediciones de la radícula y del hipocotilo generando un promedio de crecimiento de cada uno de ellos, con la generación del promedio se puede observar que el hipocotilo tuvo un promedio de 12, 296 mm y la radícula uno de 11,771mm indicando que se generó una mayor afectación a la radícula que al hipocotilo durante este ciclo de pruebas y en complemento de esta se desarrolla

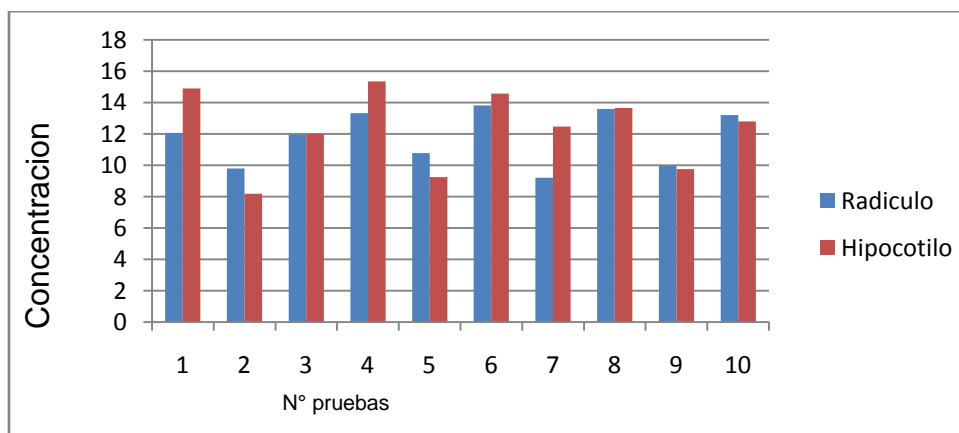
la gráfica 9, en la cual se puede observar las diferencias entre los datos de las pruebas realizadas con el cobre a partir de la sustancia pura.

Tabla 16: Mediciones del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas con cobre a partir de la sustancia pura (mm)

PRUEBAS	RADÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	12.06	14.9
2	9.79	8.19
3	11.95	12.01
4	13.32	15.35
5	10.78	9.25
6	13.81	14.58
7	9.21	12.47
8	13.6	13.65
9	9.98	9.76
10	13.21	12.8
Promedio	11.771	12.296

Fuente: Autor (2009)

Grafica 8: Medición del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas de Cobre a partir de sustancias puras (mm)



Fuente: Autor (2009)

La gráfica número 8 permite desarrollar la comparación de la elongación de la radícula y del hipocotilo observando dos zonas, en la primera se observa que la medición de la radícula es menor a la del hipocotilo y en la segunda zona indica que la radícula tiene casi la misma medición que el hipocotilo y se reafirma que en

este tipo de pruebas se afecta más la radícula que el hipocotilo durante todas las pruebas.

4.4 VALOR DE LA CONCENTRACIÓN MEDIA DE INHIBICION (CE₅₀) PARA EL NIQUEL A PARTIR DE LA SUSTANCIA PURA (NiSO₄)

Estas pruebas se realizaron con el fin de determinar la CE₅₀ de los semillas expuestos frente al agente tóxico en esta fase el níquel, a continuación se delimita las diferentes CE₅₀ establecidas por cada una de las pruebas con el programa estadístico (PROBIT).

Tabla 17: Inhibición media de la población afectada con níquel a partir de la sustancia pura

PRUEBAS	CE ₅₀	CE ₅₀ INFERIOR	CE ₅₀ SUPERIOR
1	4.288	1.407	7.499
2	9.654	5.881	12.498
3	6.27	3.494	9.798
4	10.951	9.268	12.334
5	6.854	4.564	8.952
6	10.134	5.977	13.037
7	4.411	1.533	7.736
8	11.904	7.465	14.842
9	6.742	4.06	9.231
10	3.897	1.638	6.243
Promedio	7.511	4.529	10.217

Fuente: Autor (2009)

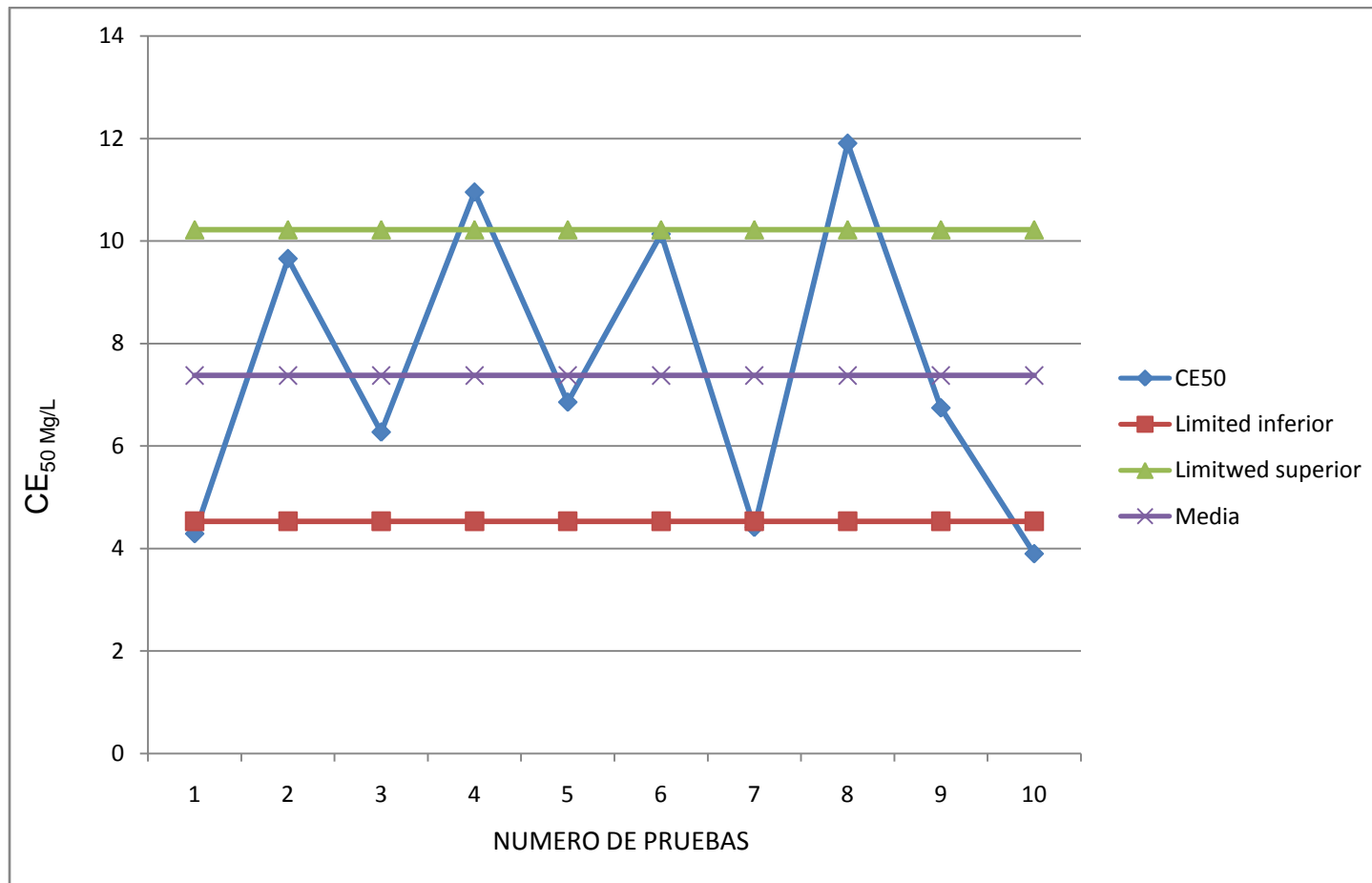
En la tabla número 17 se muestra los valores obtenidos de la CE₅₀ de las semillas expuesto durante este ciclo de pruebas fitotóxicas Como se puede observar en los resultados expuestos anteriormente, para esta fase, la cual fue de 7.511mg/L, con un límite mínimo de 4.529 mg/L y uno máximo de 10.217 mg/L, lo cual indica que a 7.511 mg/L de cobre se genera inhibición de la mitad de las semillas; de igual modo la inhibición de la mitad de las semillas para este agente tóxico se

establecerá en una zona con límite inferior de 4.529 y uno superior de 10.217 mg/L. A partir de lo mencionado se presenta la carta de control para el Cobre.

4.4.1 Gráfica número 9 cartas de control del níquel a partir de la sustancia pura.

En la realización de la carta control de níquel a partir de la sustancia pura se establece la zona de límites la cual se constituyó entre 4.259 y 10.217 mg/L, en esta zona se puede prestar atención al comportamiento adecuado de las pruebas, identificando las prueba número 4 y 8 las cuales se encuentran fuera de esta zona, estas pruebas generaron mayor resistencia frente al agente tóxico por lo cual se amplió su concentración de inhibición media de la elongación de la radícula y del hipocotilo a una mayor que las demás pruebas; por el contrario se evidenció una prueba por debajo de la zona límite, la prueba 10 estuvo bajo el límite inferior, pero su CE_{50} fue cercana a la zona delimitada con un valor de 3.897 mg/L indicando una posible afectación de agentes externos como el medio (humedad y temperatura).

Grafica 9: Carta control para níquel a partir de la sustancia pura



Fuente: Autor (2009)

4.4.1 Anova de níquel a partir de la sustancia pura. A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el níquel a partir de la sustancia pura; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 19, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 20.

Tabla 18: Pruebas de níquel a partir de la sustancia pura

concentración	Número de réplicas			total	promedio
	R1	R2	R3		
20	16	15	18	49.0	16.33
15	14	11	13	38.0	12.67
10	4	6	0	10.0	3.33
5	5	0	2	7.0	2.33
1	2	2	1	5.0	1.67
Blanco	0	1	2	3.0	1.00
total				112	37.33

Fuente: Autor (2009)

Tabla 19: Tratamientos Anova para Pruebas de Níquel con sustancia pura

tratamientos	6
observaciones	3
total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 20: Resultados Anova para Pruebas de Níquel con sustancia pura

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	482.08	5	96.42	4.61	3.11
Dentro de Grupos	376.25	18	20.90		
Total	858.33	23			
No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado	
1	10/10/2008	4,61	3,11	Se acepta H1	
2	10/10/2008	8,92	3,11	Se acepta H1	
3	10/10/2008	6,15	3,11	Se acepta H1	
4	10/10/2008	9,47	3,11	Se acepta H1	
5	10/10/2008	4,57	3,11	Se acepta H1	

6	10/10/2008	5,38	3,11	Se acepta H1
7	10/10/2008	4,59	3,11	Se acepta H1
8	10/10/2008	7,02	3,11	Se acepta H1
9	10/10/2008	3,98	3,11	Se acepta H1
10	10/10/2008	4,27	3,11	Se acepta H1

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la tabla 20 el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis alterna (H_1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en las semillas prueba.

4.4.3 Relación dosis-respuesta para Níquel. Al identificar los niveles de germinación de las semillas expuestos al agente tóxico (Níquel) y al realizar la modificación de la concentración, esta incide en el porcentaje de germinación como se muestra en la tabla 21.

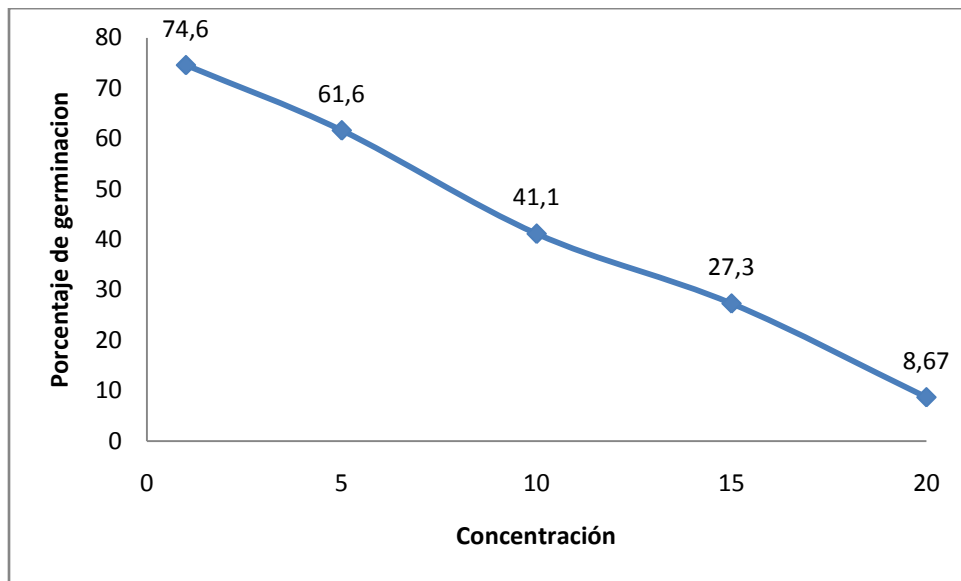
Tabla 21: Porcentajes de geminación vs concentración.

CONCENTRACIONES (ppm)	% GERMINACION
20	8.33
15	20.67
10	33.50
5	52.50
1	70.33
BLANCO	93.17

Fuente: Autor (2009)

En la gráfica numero 10, se desarrolla como complemento de la tabla número 21 donde se puede visualizar con mayor claridad todos los datos obtenidos en esta prueba.

Grafica 10: Dosis-respuesta del níquel a partir de la sustancia pura

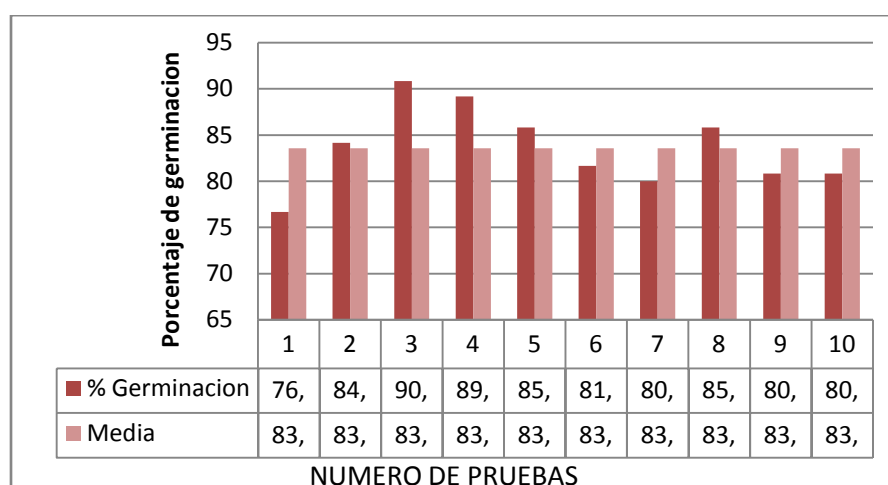


Fuente: Autor (2009)

En la gráfica 10 se puede identificar que su comportamiento es inversamente proporcional, al igual que las demás pruebas, donde se aplica la relación de dosis-respuesta para cada uno de los agentes, demostrando un comportamiento normal, indicando una germinación baja en las concentraciones altas como las de 20 y 15 mg/L, en el cual la germinación es menor del 28% como se establece en la tabla 21, la germinación de los semillas expuestos aumenta alcanzando niveles de más del 90% en las concentraciones de 1 mg/L. La gráfica 10 nos muestra un comportamiento constante en el aumento de la germinación, indicando que la semilla de lechuga Batavia (*Lactuca sativa*) es un aceptable bioindicador, ya que reacciona correctamente a las diferentes concentraciones que afecta a las semillas expuestas.

4.4.4 Tabla de germinación para pruebas con níquel a partir de la sustancia pura. Al obtener los datos es propicio desarrollar una tabla y a su vez una gráfica en la que se permita observar la comparación entre las pruebas realizadas y la media de germinación.

Grafica 11: Comparación de la germinación en todas las pruebas



Fuente: Autor (2009) blanco

Con la gráfica 11 se establece la media con un valor de 83.58, se enfatiza en algunas pruebas que expresan diferencias en la gráfica, estas pruebas son la número 3 y 4 las cuales tienen un nivel más alto de germinación con un valor del 90% presentando un nivel más alto de resistencia a las concentraciones propuestas en esta fase. También se reitera la prueba número 1 por obtener el porcentaje de germinación más bajo identificando una mayor sensibilidad en esta prueba generando un ajuste al medio durante la realización de la totalidad de las pruebas fitotóxicas.

Se establece que la mayoría de pruebas en esta fase son cercanas a la media generando un comportamiento homogéneo en la gráfica.

4.4.5 Mediciones de la longitud de la radícula y el hipocotilo para el níquel a partir de la sustancia pura. Las mediciones se realizan directamente en dos partes de la semilla como lo son: la radícula y el hipocotilo, los cuales pueden sufrir cambios en su estructura, como disminución en su tamaño, retraimiento de la plántula e inhibición de la semilla. Dicha medición de las semillas en esta fase de la investigación indica los efectos fitotóxicos que desarrollan estos al tener contacto con el agente tóxico; el promedio de longitud de la radícula e hipocotilo se registran en la tabla número 22.

Tabla 22: Mediciones del crecimiento de la radícula y el hipocotilo en pruebas con níquel a partir de sustancia pura

PRUEBAS	RADÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	13.37	11.52
2	15.38	12.65
3	12.92	10.32
4	14.38	12.41
5	13.81	11.11
6	14.36	11.49
7	14.97	11.94
8	14.56	12.23
9	15.19	12.78
10	14.66	11.78
Promedio	14.36	11.82

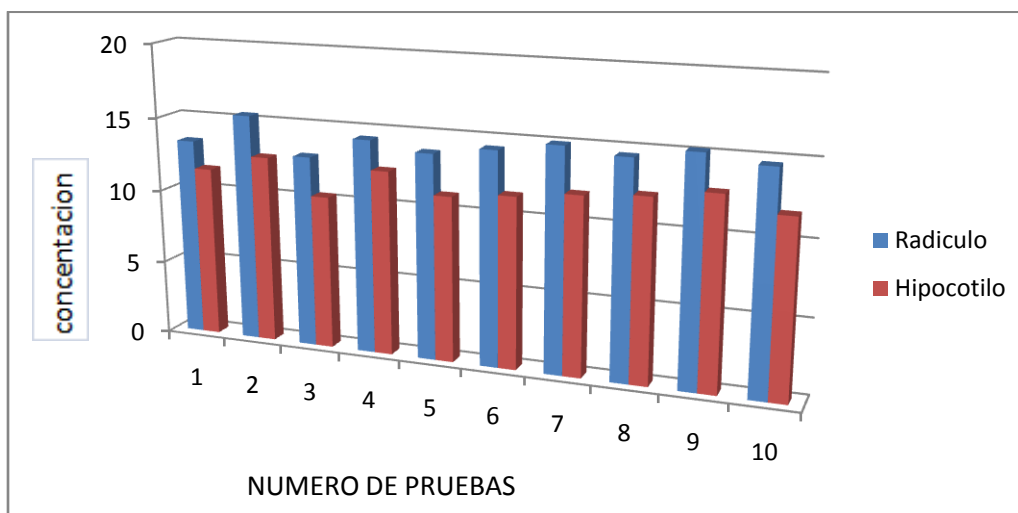
Fuente: Autor (2009)

A través del análisis de datos, se indica un promedio de longitud lograda por la totalidad de las pruebas realizadas con este tipo de semillas, determinando la vulnerabilidad de los componentes de las semillas y generando un mayor nivel de toxicidad en el hipocotilo el cual desarrolló un promedio de 11.82mm frente al alcanzado por la radícula con un valor de 14.36 mm. Con estos datos se afirma que este tipo de toxico genera mayor alteración en el hipocotilo que en la radícula al finalizar este ciclo de pruebas.

Al observar la gráfica 13, se evidencia la comparación de la radícula e hipocotilo en las diferentes pruebas realizadas, indicando que el Níquel afecta en mayor porcentaje al hipocotilo que a la radícula, teniendo en cuenta que la germinación de las semillas obtuvo un porcentaje inferior. Las pruebas de mayor determinación como se muestra en la gráfica son la número 2 por su longitud a nivel de la radícula la cual obtuvo un valor de 15 (mm). De igual modo la número 7 y 9 tienen valores cercanos a los anteriores, se encontró también una de estas (3) con un nivel menor a la radícula, obteniendo a su vez el registro con poca longitud del hipocotilo, determinando que esta prueba tuvo mayor sensibilidad frente al tóxico que las demás pruebas. Igualmente esta gráfica se manifiesta que el

comportamiento entre la radícula y el hipocotilo fue constante y el nivel de longitud del hipocotilo fue menor que la de la radícula.

Grafica 13: Medición del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas con níquel a partir de la sustancia pura (mm)



Fuente: Autor (2009)

4.5 Valor de la concentración efectiva media (CE_{50}) para el vertimiento de cobre.

El fin de la obtención de la CE_{50} , es identificar el nivel de inhibición reflejada por los semillas; dentro de esta investigación se busca definir la CE_{50} , para el vertimiento de cobre, proveniente de la industria galvánica, para así evaluar el efecto que produce en los semillas y poder realizar una comparación final con el vertimiento, luego de aplicar el pre-tratamiento.

En la tabla número 23 se indican los valores obtenidos de la CE_{50} , en las pruebas realizadas con el programa estadístico (PROBIT), por medio de esta se referencia los límites inferior, superior, y el promedio de la CE_{50} para el vertimiento de cobre.

Tabla 23: Inhibición media de la población para el vertimiento de cobre

PRUEBAS	CE_{50}	CE_{50} INFERIOR	CE_{50} SUPERIOR
---------	-----------	-----------------------	-----------------------

1	9.791	8.163	11.223
2	8.378	5.027	10.926
3	9.276	7.763	10.653
4	8.743	5.385	15.053
5	11.084	9.332	12.703
Promedio	9.454	7.134	12.112

Fuente: Autor (2009)

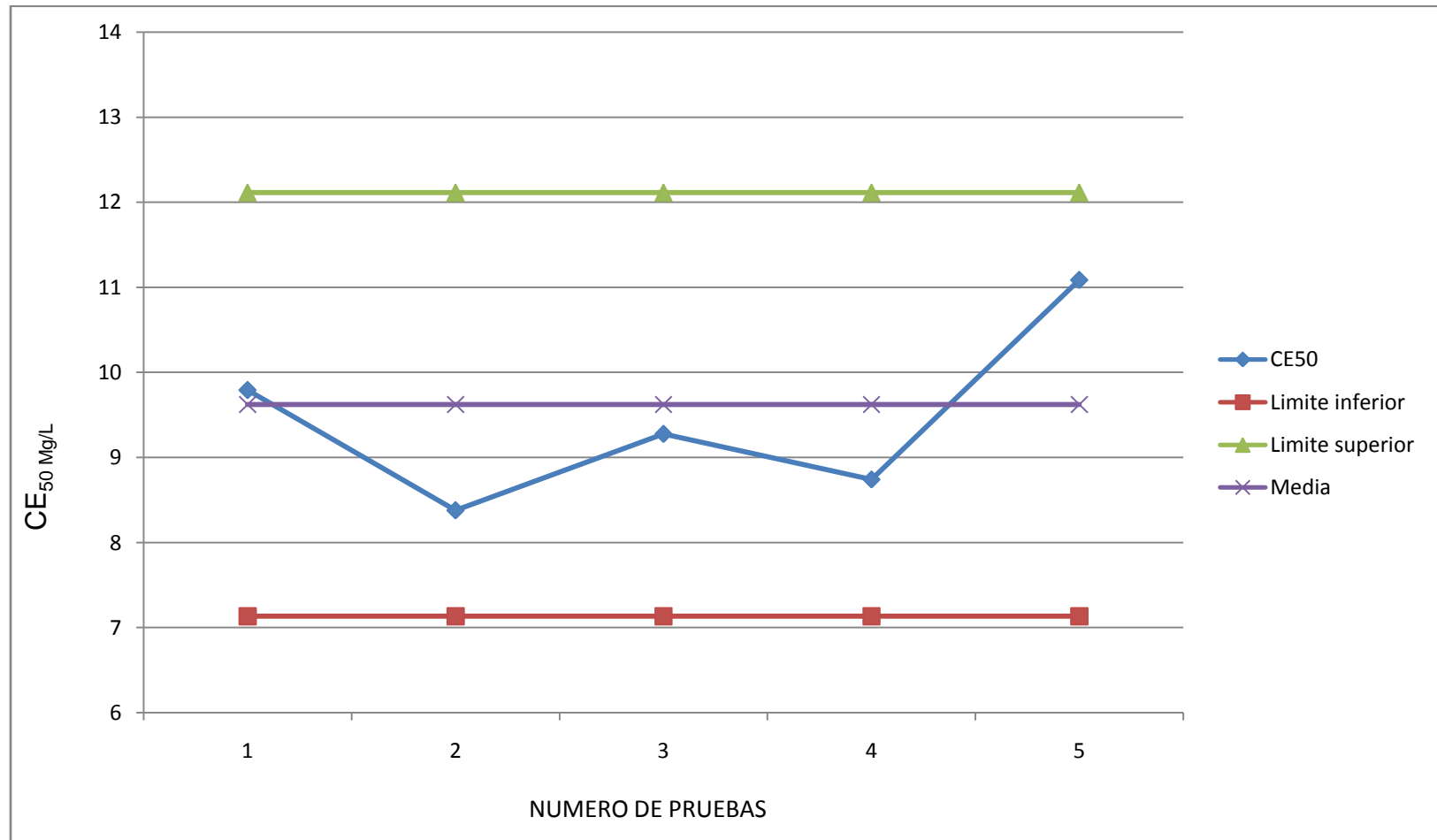
De acuerdo con los datos de la tabla 23 se estableció un promedio de 9,454 mg/L del vertimiento de cobre lo cual nos indica que con esta concentración se produce la inhibición del 50% de la población expuesta y también, se determinó la zona de aceptación para este tipo de toxico; la zona se encuentra delimitada por un límite inferior de 7,134 mg/L y uno superior de 12,112 mg/L generando la zona dentro de la cual se deben ubicar las pruebas para ser aceptadas en el manejo de este tóxico.

Por medio de los datos de la tabla 23 se realizará la carta control indicando las pruebas más vulnerables durante la realización de las pruebas fitotóxicas.

4.5.1 Carta de control para el vertimiento de cobre de la Industria Galvánica

El objetivo de la gráfica 13, es delimitar la zona de aceptación para este tipo de tóxico, la cual se obtiene con el promedio de la CE_{50} con un valor de 9,454 mg/L y desarrollando también un promedio para la CE_{50} inferior y superior, encontrándose con los siguientes valores para cada una de ellas, límite inferior 7.134 mg/L y límite superior 12.112 mg/L; se observó que el comportamiento de las pruebas fue adecuado, registrándose la totalidad de las pruebas dentro de la zona de aceptación para este tóxico..

Grafica 13: Carta control para el vertimiento de cobre



Fuente: Autor (2009)

4.5.2 Anova para el vertimiento de cobre. A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el vertimiento de Cobre proveniente de la industria Galvánica; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 25, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 26.

Tabla 24: Pruebas del vertimiento de cobre provenientes de la Industria

Concentración	Número de réplicas			total	promedio
	R1	R2	R3		
20	18	19	18	55.0	18.33
15	16	15	14	45.0	15.00
10	5	3	5	13.0	4.33
5	2	4	3	9.0	3.00
1	3	0	1	4.0	1.33
Blanco	1	0	0	1.0	0.33
			total	127	42.33

Fuente: Autor (2009)

Tabla 25: Tratamientos Anova para Pruebas del vertimiento de cobre

tratamientos	6
observaciones	3
total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 26: Resultados Anova para Pruebas del vertimiento de cobre

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	656.96	5	131.39	5.20	3.11
Dentro de Grupos	455	18	25.28		
Total	1111.96	23			

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la tabal 26 el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (Ho), y se acepta la hipótesis alterna

(H1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en las semillas prueba.

Para las demás pruebas, los resultados se encuentran en la tabla número 27 realizada a continuación.

Tabla 27: Resultados Anova para todas las Pruebas del vertimiento de cobre

No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado
1	04/03/2009	5,20	3,11	Se acepta H1
2	04/03/2009	6,73	3,11	Se acepta H1
3	04/03/2009	4,99	3,11	Se acepta H1
4	04/03/2009	5,67	3,11	Se acepta H1
5	04/03/2009	7,03	3,11	Se acepta H1

Fuente: Autor (2009)

4.5.3 Relación dosis-respuesta para vertimiento de Cobre. Con la relación dosis-respuesta del agente tóxico, en este caso el vertimiento de cobre de la industria, indica que es directamente proporcional al porcentaje de germinación con respecto al nivel de la concentración suministrada a las semillas expuestas en el desarrollo de la pruebas fitotóxicas; por medio de las distintas concentraciones utilizadas para estas pruebas se desarrollaron diferentes porcentajes de germinación los cuales se colocan en la tabla número 28 realizada a continuación.

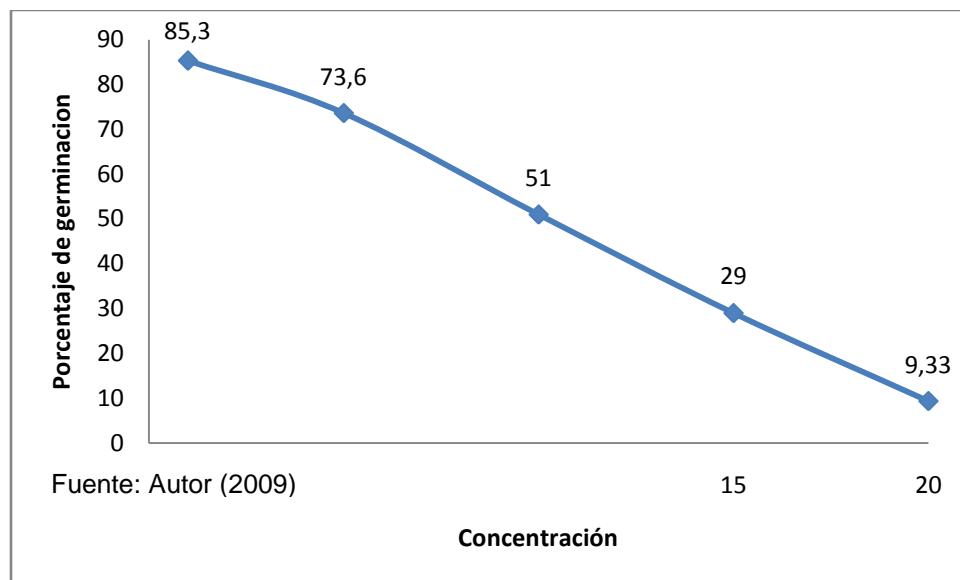
Los valores incluidos en la tabla 28, muestran el porcentaje de germinación en las diversas concentraciones presentes en el desarrollo de estas pruebas, en las que se observa aumento en la germinación de las semillas a medida que se reduce la concentración. Para tener mayor claridad se realizó la gráfica número 14.

Tabla 28: Porcentaje de germinación vs concentración

CONCENTRACIONES <i>(ppm)</i>	% GERMINACIÓN
20	9.33
15	29.00
10	51.00
5	73.67
1	85.33
BLANCO	95.00

Fuente: Autor (2009)

Grafica 14: Dosis-respuesta en pruebas con vertimiento de cobre

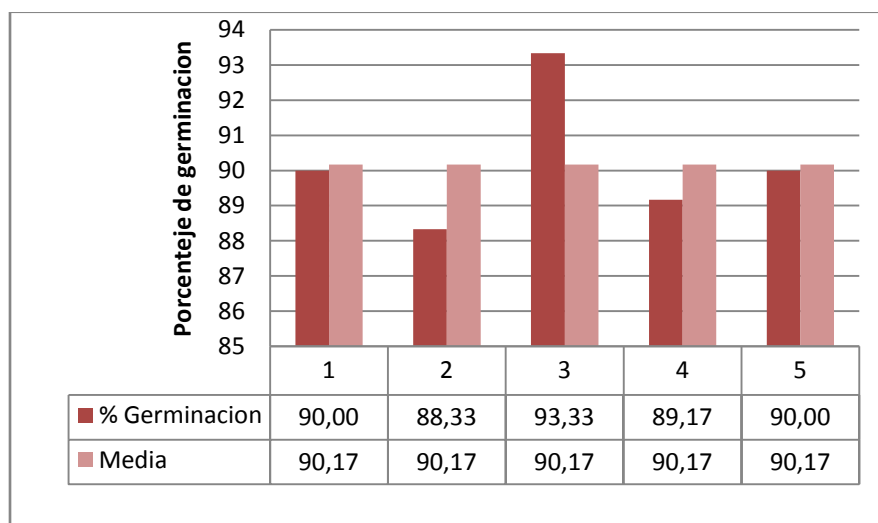


Fuente: Autor (2009)

Podemos observar que la dosis aplicada en las semillas a medida que disminuye ejerce un aumento en la germinación de forma ascendente como lo plasma la grafica 15; reflejando que las concentraciones de 20 mg/L, se genera una germinación del 9.33% y en la concentración más bajas se genera el 85.33% de germinación.

4.5.4 Tabla de germinación para vertimiento de cobre. Para obtener el paralelo y posibles diferencias entre las diversas pruebas e igualmente para generar confrontación con la medida de estas; se presenta en la siguiente gráfica:

Grafica 15: Comparación de la germinación en las diferentes pruebas



Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la gráfica 15, la prueba número 3 sobresale ya que manifiesta un índice elevado de germinación con el 93.33%, demostrando un nivel superior a la media (90.17%) teniendo mayor resistencia al agente tóxico, por el contrario se observan que la prueba 2 se encuentra en un nivel bajo de germinación del 88.33%; la gráfica evidencia un comportamiento similar en las pruebas evidenciando un porcentaje de germinación pertinente a lo generado en la prueba dosis-respuesta y a la media de la germinación.

4.5.5 Medición de la Longitud de la radícula y el hipocotilo para vertimiento de cobre. Con la longitud obtenida de la radícula e hipocotilo se comprueba los efectos generados por el agente tóxico (vertimiento de cobre) y se puede determinar en cuales desencadenó mayor influencia por parte del agente, identificando afectación en la estructura de la radícula y/o hipocotilo durante este proceso, el resultado de ello se muestra en la tabla número 29.

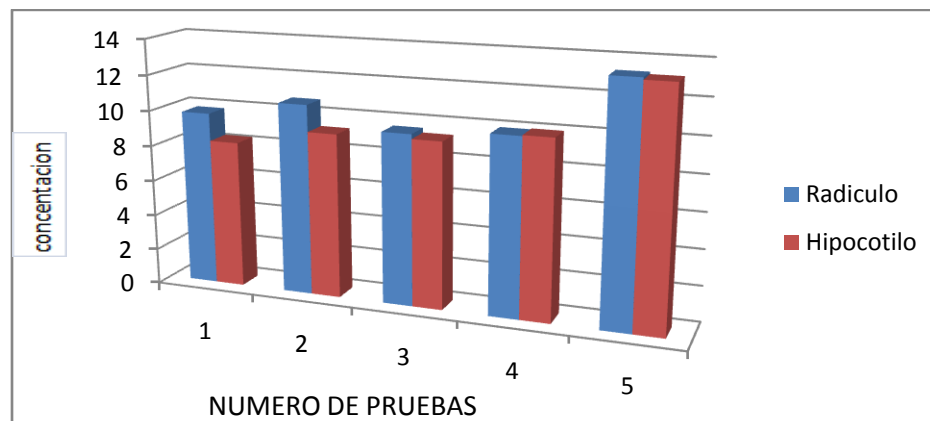
Tabla 29: Mediciones del crecimiento para la raíz y el hipocotilo en pruebas del vertimiento de cobre.

PUREBAS	RIDÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	9.81	8.27
2	10.71	9.22
3	9.56	9.3
4	9.92	9.97
5	13.29	13.17
PROMEDIO	10,658	9,986

Fuente: Autor (2009)

Según los datos obtenidos en la tabla 29, se ve la afectación de manera semejante en las extremidades de la plántula, directamente en la longitud de la raíz y del hipocotilo. Por medio del promedio definido en la tabla 29 se puede detectar que el hipocotilo su efecto en un nivel más alto con un valor de 9,986 mm en su longitud que la raíz con un valor de 10,658 mm.

Grafica 16: Gráfico de barras de la elongación en las diferentes pruebas con el vertimiento de cobre (mm)



Fuente: Autor (2009)

Como se ha mencionado la semilla reaccionó tanto en la raíz como en el hipocotilo, indicando una alteración semejante ante los componentes empleados. La prueba número 5 tuvo un crecimiento mayor tanto en la raíz con un valor de 13.29 mg/L y el hipocotilo con 13.17 mg/L; como lo demuestra esta prueba la

diferencia entre los componentes a la exposición toxica es mínima; las demás pruebas presentan normalidad frente a lo evidenciado por la gráfica, presentan una media de 10.66 mg/L en la radícula y una media de 9.98 mg/L en el hipocotilo.

4.6 Valor de la Concentración Efectiva Media (CE₅₀) para el vertimiento de Níquel.

Por medio de la CE₅₀ se puede determinar las concentraciones medias de inhibición, es decir las que generan la muerte de la mitad de las semillas; por medio de la investigación se define la concentración del agente tóxico (vertimiento de Níquel) proveniente de la industria galvánica. Este agente permite definir los efectos a los que está expuesta la semilla durante las pruebas, como se muestra en la tabla 30.

Tabla 30: Inhibición media de la población para pruebas con vertimiento de Níquel

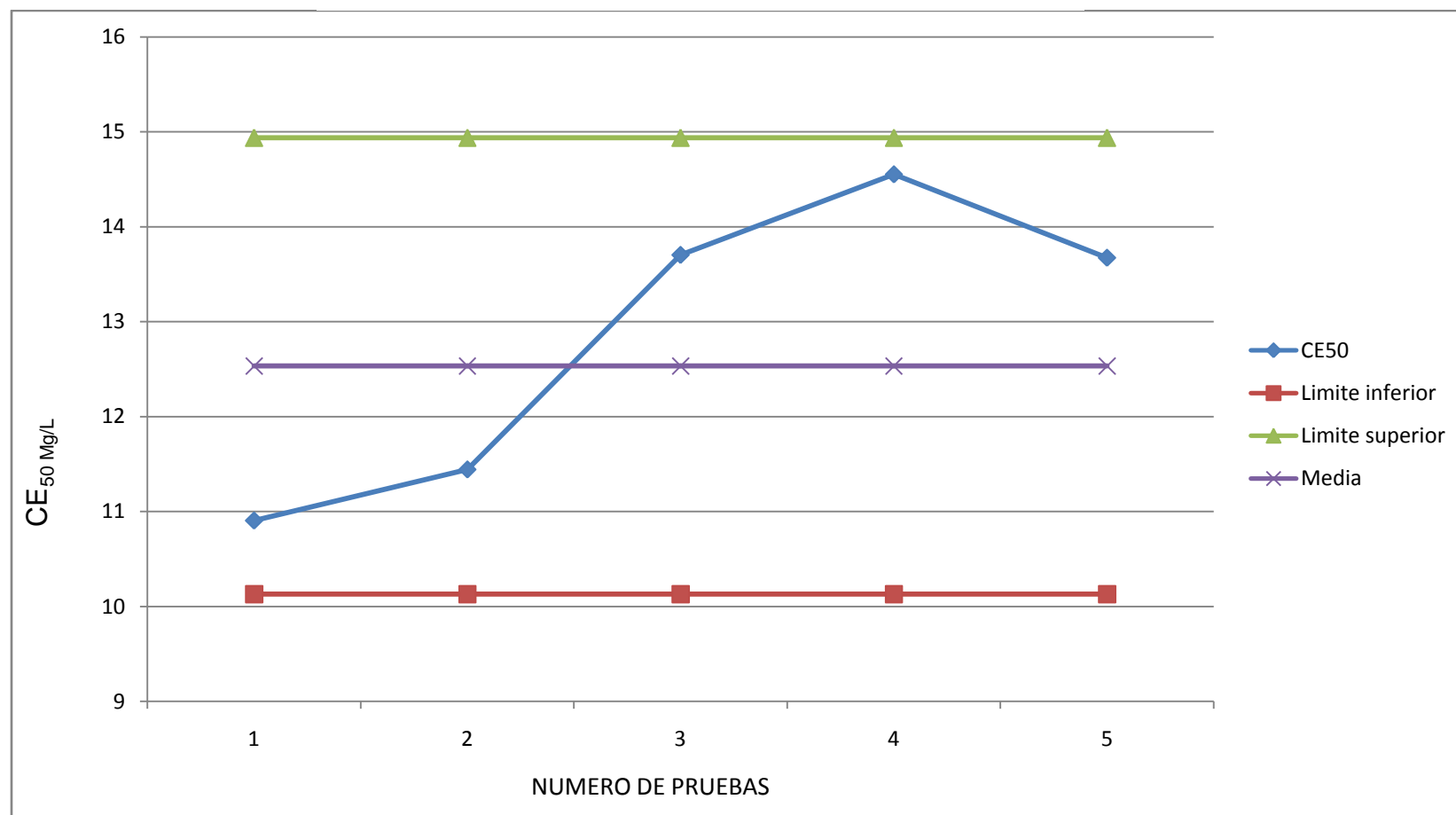
BIOENSAYOS	CE ₅₀	CE ₅₀ INFERIOR	CE ₅₀ SUPERIOR
1	10.904	8.383	13.063
2	11.442	9.894	12.774
3	13.702	10.902	15.822
4	14.553	11.058	16.925
5	13.674	10.407	16.095
Promedio	12.855	10.129	14.936

Fuente: Autor (2009)

En la tabla 31 se define el promedio de la CE₅₀ con un valor de 12,855 mg/L; esta concentración indica que el 50% de la población genera inhibición durante el desarrollo de la pruebas. Se determinó la zona de aceptación para este tipo de toxicó con un límite inferior de 10,129 mg/L y un límite superior de 14,936 mg/L estableciendo la zona de ubicación de las diferentes pruebas para este tipo de toxico.

4.6.1 Carta de control para el vertimiento de Níquel de la Industria Galvánica.

Grafica 17: Carta control para el vertimiento de níquel



Fuente: Autor (2009)

La realización de la carta de control expuesta en la gráfica 17, permitió establecer que pruebas se ubican en la zona de aceptación por los límites inferior y superior, determinados por el programa estadístico (PROBIT), luego del análisis de inhibición de los semillas; de esta manera y como se puede observar, las primeras pruebas generaron mayor sensibilidad frente al agente tóxico en las tres últimas se evidenció menor sensibilidad en relación a dicho agente tóxico con una diferencia de 2 mg/L en la concentración media de inhibición.

4.6.2 Anova para el vertimiento de níquel. A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el vertimiento de Níquel proveniente de la industria Galvánica; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 32, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 33.

Tabla 31: Pruebas del vertimiento de níquel provenientes de la Industria Galvánica.

concentración	Número de réplicas			total	Promedio
	R1	R2	R3		
20	20	19	16	55.0	18.33
15	13	10	11	34.0	11.33
10	7	5	7	19.0	6.33
5	3	4	6	13.0	4.33
1	2	3	1	6.0	2.00
Blanco	1	2	0	3.0	1.00
			total	130	43.33

Fuente: Autor (2009)

Tabla 32: Tratamientos Anova para Pruebas del vertimiento de Níquel

tratamientos	6
observaciones	3
total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 33: Resultados Anova para Pruebas del vertimiento de Níquel

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	482.58	5	96.52	4.15	3.11
Dentro de Grupos	418.25	18	23.24		
Total	900.83	23			

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la tabal 33, el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis alterna (H_1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en los semillas prueba.

Para las demás pruebas los resultados se encuentran en la tabla número 34:

Tabla 34: Resultados Anova para todas las Pruebas del vertimiento de níquel

No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado
1	25/03/2009	4.15	3,11	Se acepta H_1
2	25/03/2009	4.35	3,11	Se acepta H_1
3	25/03/2009	4,07	3,11	Se acepta H_1
4	25/03/2009	4,29	3,11	Se acepta H_1
5	25/03/2009	4,12	3,11	Se acepta H_1

Fuente: Autor (2009)

4.6.3 Relación dosis-respuesta para vertimiento de níquel. En la tabla número 35 se reúne los datos obtenidos para la CE_{50} , estableciendo el porcentaje de germinación por cada concentración.

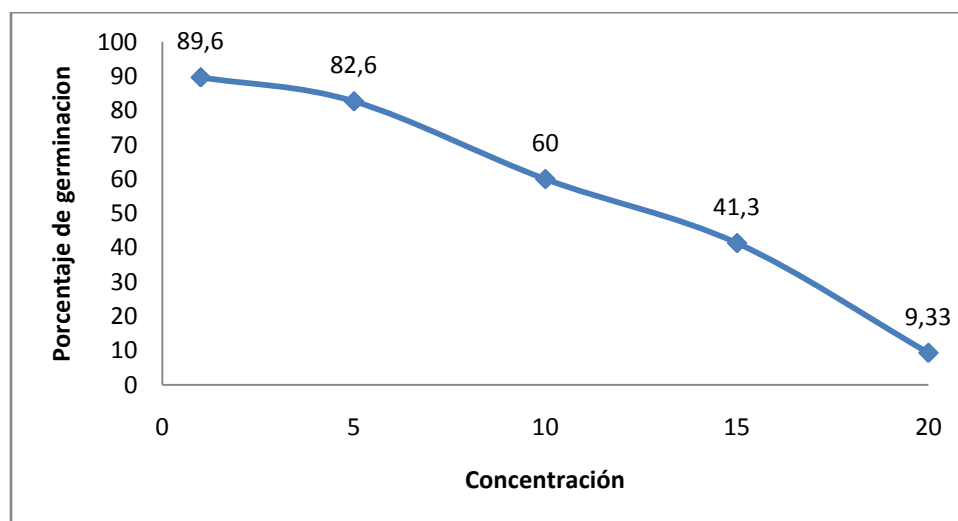
Tabla 35: Porcentaje de germinación vs concentración

CONCENTRACIONES (ppm)	% GERMINACIÓN
20	9.33
15	41.33
10	60.00
5	82.67
1	89.67
BLANCO	92.67

Fuente: Autor (2009)

El porcentaje obtenido de germinación en la prueba con vertimiento de Níquel, no manifiesta diferencia en relación con las demás fases de las diversas pruebas, considerando que a niveles altos de concentración este porcentaje de germinación es mínimo. Sin embargo, cuando hay modificaciones de la concentración aumenta dicho porcentaje, para mayor claridad en las diferencias mencionadas se presenta la gráfica 18.

Gráfica 18: Dosis-respuesta del vertimiento de níquel

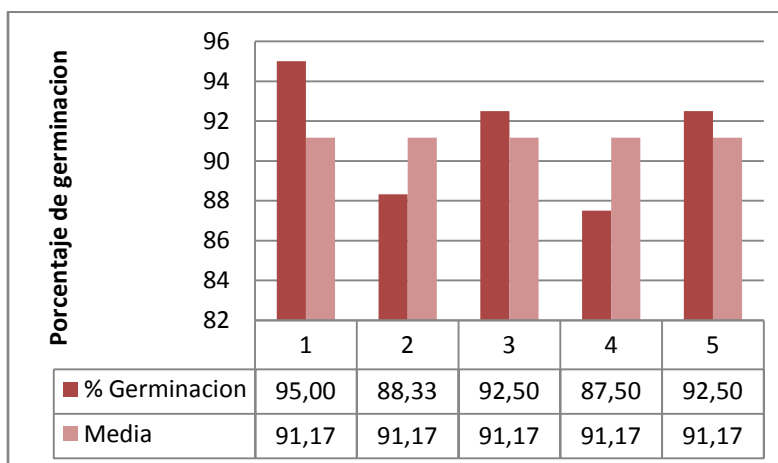


Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar, al aumentar las concentraciones la germinación es menor como sucede para 20 y 15 mg/L donde la concentración tiene un porcentaje del 20% y las concentraciones más bajas mantienen porcentajes mayores de germinación casi del 85% en las semillas expuestas.

4.6.4 tabla de germinación para el vertimiento de Níquel. En la gráfica número 19 se muestra con mayor claridad la media y comparación entre las diferentes pruebas realizadas

Grafica 19: Germinación de los organismos para el vertimiento de níquel en cada una de las pruebas



Fuente: Autor (2009)

En la gráfica 19 el porcentaje en la media de las pruebas fue de 91.17%; dentro de esta se establecen comparaciones entre la media y el porcentaje de germinación, en relación con la media de las pruebas número 1,3 y 5 con un porcentaje del 92% por encima de la germinación obtenida con la media, por último las pruebas con un nivel bajo con el 87.64% de dicha germinación con respecto a la media. Esta gráfica indica que las semillas empleadas cumplen con las características de los bioindicadores frente a este tipo de tóxico.

4.6.5 Medición de la longitud de la radícula y el hipocotilo para el vertimiento de níquel. El promedio de longitud de la radícula y del hipocotilo que alcanzan estas semillas o bioindicadores durante la aplicación de las diferentes pruebas, contribuye a la definición de la presencia de algún tipo de influencia en la semilla, ya sea por parte o no del agente tóxico, por esta razón las longitudes de la radícula y del hipocotilo se establecen dentro de la siguiente tabla como un indicador de la presencia tóxica.

Con los resultados obtenidos en la tabla número 36 se estableció el promedio de la elongación para la radículo y para el hipocotilo indicando que la estructura de la semilla fue la más vulnerada por la exposición del agente toxico; se determinó que

el hipocotilo fue la estructura de la semilla más afectada al generar un promedio de 12,252 mm con respecto al de la radícula con un valor de 15,028 mm, lo cual indica una mayor afectación sobre el hipocotilo por parte del agente tóxico.

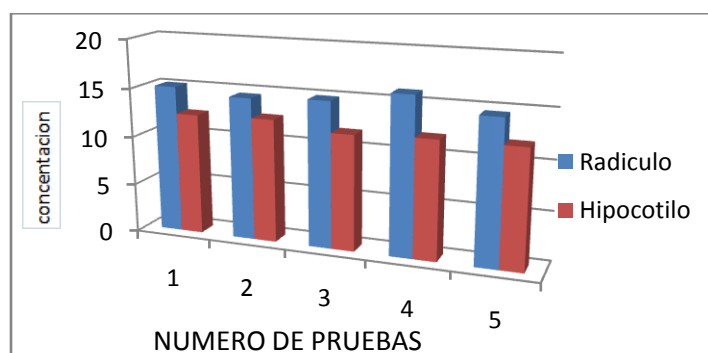
Tabla 36: Mediciones del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas con el vertimiento de níquel.

PRUEBAS	RIDÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	15.11	12.38
2	14.53	12.56
3	14.86	11.75
4	16.06	12.56
5	14.58	12.01
PROMEDIO	15.028	12.252

Fuente: Autor (2009)

Esta gráfica permite observar el comportamiento de las pruebas ha sido homogéneo, la radícula tuvo menor afectación que la producida en el hipocotilo, indicando que la plántula obtuvo una influencia semejante en todas las pruebas, manejadas con una misma intensidad, identificándonos que en la aplicación de las pruebas se realizó un adecuado proceso en cada una de estas.

Grafica 21: Medición del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas de vertimiento de níquel.



Fuente: Autor (2009)

4.7 Proceso de pre-tratamiento para los vertimientos de cobre y níquel.

En el proceso de la investigación, al igual que en la aplicación y desarrollo en cada una de pruebas ya mencionadas a lo largo de los resultados, ha permitido

identificar los posibles daños que puede generar los residuos de las concentraciones empleadas al contacto con el medio ambiente; es por la cual se desarrolla la fase en la investigación denominada Pre-Tratamiento, para cada uno de los vertimientos (Cobre y Níquel), en pro de trabajar por la reducción de las concentraciones y efectos desencadenados por los agentes tóxicos implementados en la exposición con los bioindicadores. Este pre-tratamiento se realiza por medio de una precipitación física generada por la formación del hidróxido en un proceso químico.

Los valores obtenidos en esta fase de la investigación reflejarán las diferencias entre el vertimiento producido por la industria y el obtenido luego de un proceso químico, con el fin de reducir las concentraciones contaminantes; la realización de las diferentes pruebas, da paso al establecimiento de la CE_{50} de cada uno de los vertimientos propuestos en esta investigación. A continuación, se presentan el análisis de los resultados obtenidos en el pre-tratamiento, con los diferentes vertimientos y el efecto tóxico frente al bioindicador.

4.7.1 Valor de la concentración efectiva media (CE_{50}) para el pre-tratamiento de cobre. La concentración de inhibición media, generada a lo largo de la aplicación y realización de las diversas pruebas, permite indicar el grado de reducción evidenciado en el proceso químico, en el pre-tratamiento empleado para este tipo de vertimientos; en la tabla número 37 se presentan las mediciones significativas y los límites para la CE_{50} .

Tabla 37: Inhibición del 50% de la población con el pre-tratamiento de cobre

PRUEBAS	CE_{50}	CE_{50} INFERIOR	CE_{50} SUPERIOR
1	36,359	30,167	41,729
2	40,608	35,001	45,58
3	42,268	36,653	47,137
4	41,89	35,929	46,941

5	38,401	32,473	43,513
Promedio	39,905	34,045	44,980

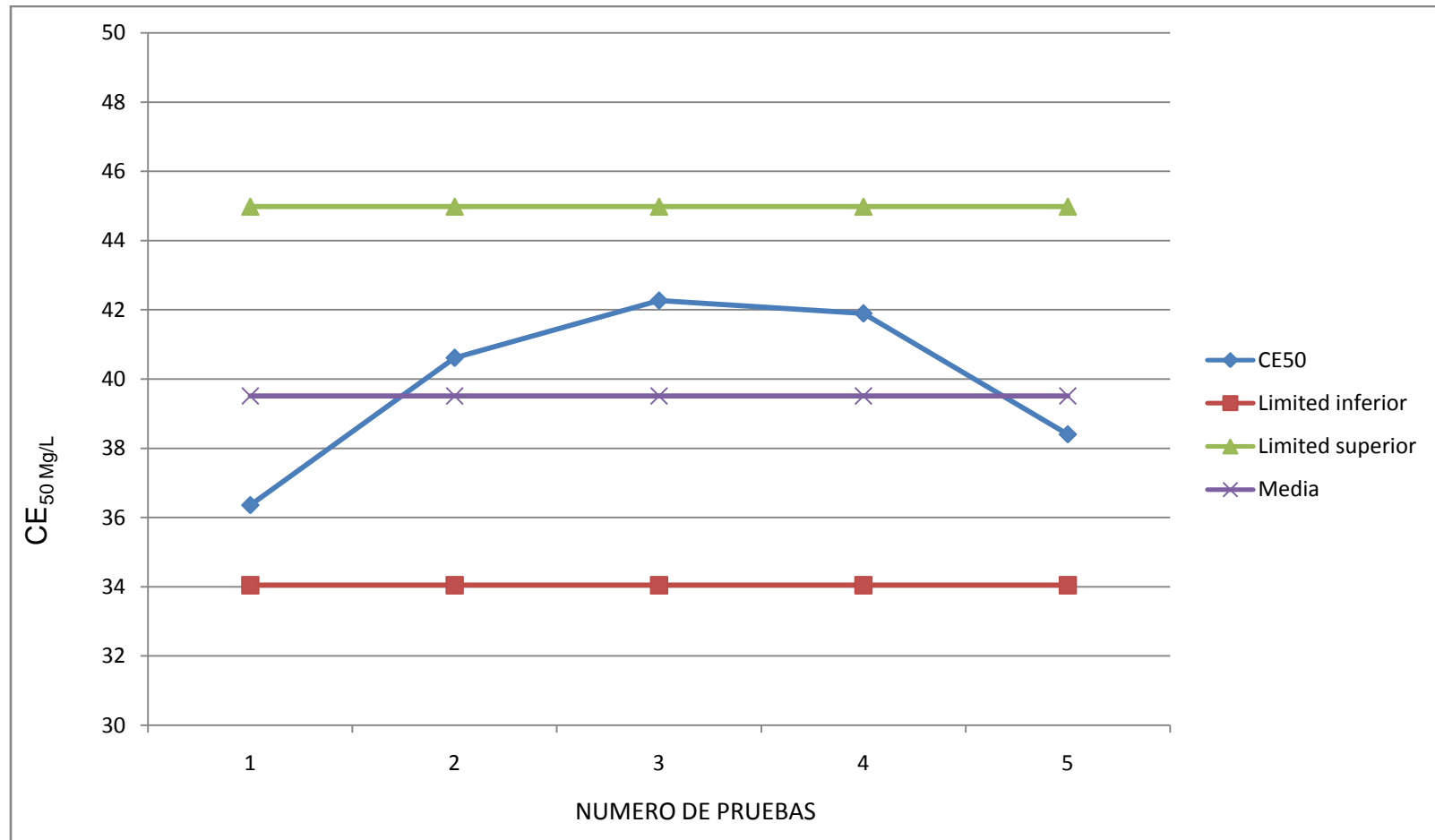
Fuente: Autor (2009)

Con las mediciones de la CE_{50} , se determinó el promedio de esta dando como resultado 39.905 mg/L, indicando el nivel de concentración se produce el 50% de inhibición de la población expuesta en las pruebas; también estableció la zona de aceptación indicada por los promedios de los límites inferiores con un valor de 34,045 mg/L y un límite superior de 44,980 mg/L para la ubicación de las diferentes pruebas con este tipo de toxico pre-tratado.

4.7.2 Carta de control para el pre-tratamiento del vertimiento de cobre proveniente de la industria galvánica

La carta de control de la grafica 22, muestra los rangos obtenidos con el programa estadístico (PROBIT), para determinar la zona de equilibrio de las CE_{50} , para este tipo de bioindicadores como en la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*); indicando que las diferentes pruebas se manejaron bajo los mismos parámetros de diseño y duración en este ciclo de la investigación.

Grafica 21: Carta control para el pre-tratamiento del vertimiento de cobre



Fuente: Autor (2009)

4.7.3 Anova para el pre-tratamiento del vertimiento de cobre. A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el pre-tratamiento de Cobre proveniente de la industria Galvánica; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 39, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 40.

Tabla 38: Pruebas del pre-tratamiento de cobre

concentración	Número de réplicas			total	promedio
	R1	R2	R3		
100	18	17	17	52.0	17.33
80	14	9	11	34.0	11.33
60	8	8	11	27.0	9.00
40	0	2	3	5.0	1.67
20	2	2	2	6.0	2.00
Blanco	1	1	2	4.0	1.33
			total	128	42.67

Fuente: Autor (2009)

Tabla 39: Tratamientos Anova para Pruebas del pre-tratamiento de cobre

tratamientos	6
observaciones	3
total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 40: Resultados Anova para Pruebas del pre-tratamiento de cobre

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	479.83	5	95.97	4.20	3.11
Dentro de Grupos	411.5	18	22.86		
Total	891.33	23			

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la tabla 40, el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis alterna (H_1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en las semillas de la prueba.

Para las demás pruebas los resultados se encuentran en la tabla número 41:

Tabla 41: Resultados Anova para todas las Pruebas del pre-tratamiento de cobre

No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado
1	08/04/2009	4,20	3,11	Se acepta H1
2	08/04/2009	4,67	3,11	Se acepta H1
3	08/04/2009	4,89	3,11	Se acepta H1
4	08/04/2009	4,19	3,11	Se acepta H1
5	08/04/2009	4,25	3,11	Se acepta H1

Fuente: Autor (2009)

4.7.4 Relación dosis-respuesta para el pre-tratamiento de cobre. En la relación dosis-respuesta para el pre-tratamiento de cobre, se desarrolló un paralelo para determinar por medio de las siguientes tablas y/o gráficos la incidencia que tiene un agente tóxico en el medio de descarga, identificando de igual modo las diferentes concentraciones, además de su incidencia indicando qué porcentaje de germinación es mayor en concentraciones bajas y presenta una alta reducción en las concentraciones elevadas.

Tabla 42: Comparación de los porcentajes de germinación con las concentraciones del pre-tratamiento de cobre

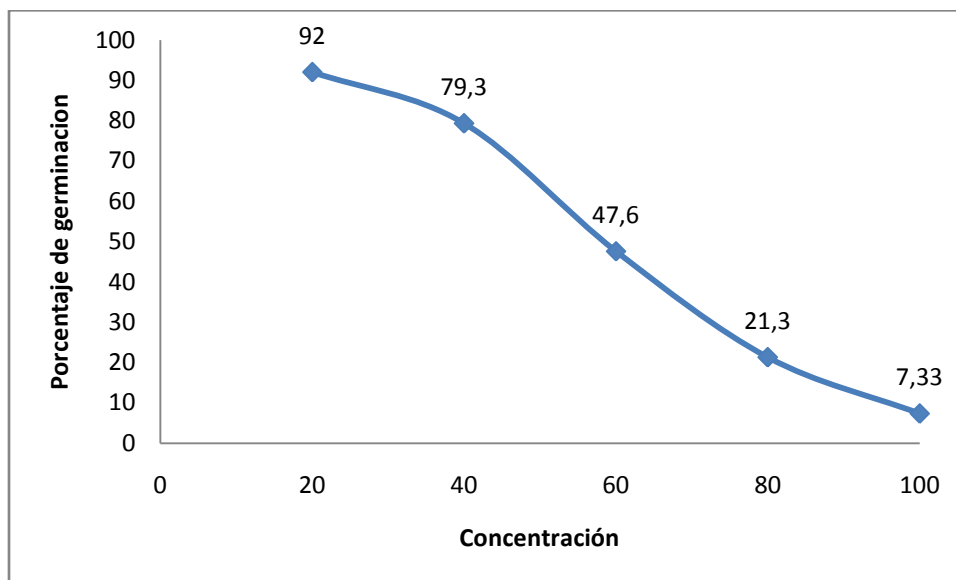
CONCENTRACIONES (ppm)	% GERMINACION
100	7.33
80	21.33
60	47.67
40	79.33
20	92.00
BLANCO	94.67

Fuente: Autor (2009)

En la aplicación de las diferentes concentraciones, se indicó que la germinación reaccionó de igual modo que las anteriores pruebas de este tipo. Es cambiante de manera proporcional a una mayor concentración por parte del agente tóxico,

manifestando reducción en la germinación; en el desarrollo del pre-tratamiento en nivel de germinación presenta incremento con respecto a las concentraciones establecidas en la germinación del vertimiento de cobre sin previo tratamiento; estos aumentaron los niveles de expectativa del contaminante satisfacen el medio y los bioindicadores para esto se generó la gráfica número 22.

Grafico 22: Dosis-respuesta del pre-tratamiento para el vertimiento de Cobre

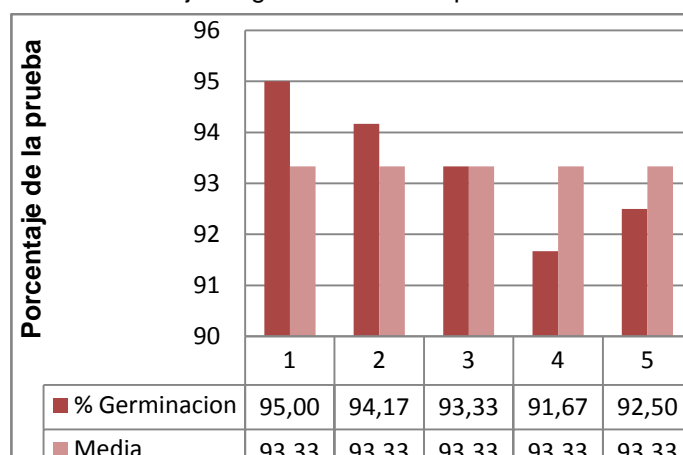


Fuente: Autor (2009)

Como se evidencia en los datos arrojados en las concentraciones (100 y 80 mg/L) obteniendo un porcentaje de 14.33% de germinación, en las concentraciones bajas de (40 y 20 mg/L) se obtuvo un porcentaje del 85.66% de germinación estableciendo una relación directamente proporcional.

4.7.5 Tabla de germinación para Pre-tratamiento del vertimiento de cobre. La germinación es un indicador fundamental para la detección del efecto tóxico en el bioindicador; en el análisis realizado en esta investigación, se evidencia el crecimiento de los bioindicadores, al igual que en las pruebas más vulnerables al agente tóxico, o por el contrario a las que manifiestan mayor resistencia a este tipo de contaminantes expuesto a la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*); con el estudio de las diferentes pruebas y la obtención de la media se genera la gráfica número 23.

Grafica 23: Porcentaje de germinación con pre-tratamiento de cobre



Fuente: Autor (2009)

En el gráfico 24 se muestra, las pruebas número 1, 2 y 3, con resultados superiores al 93% de germinación. De igual modo estas se encuentran por encima de la media establecida para este grupo de pruebas, indicando que estas generaron mayor resistencia al agente tóxico que las pruebas 4 y 5, ya que estas últimas pruebas mantienen un porcentaje inferior a las anteriores; desencadenando mayor interés por la prueba número 4 la cual obtuvo bajo porcentaje (91,67%) obteniendo menor resistencia de los bioindicadores al agente tóxico o posiblemente una influencia externa; dentro de estos casos se establece un incremento en la germinación luego del proceso de pre-tratamiento con el vertimiento.

4.7.6 Medición de la longitud del radículo y el hipocotilo con el pre-tratamiento de cobre. En relación con el promedio de la longitud de la radícula e hipocotilo, se generó para cada una de las pruebas diferentes gráficos comparativos de dichas mediciones, donde se puede establecer que el componente de la plántula no obtuvo mayor afectación por el agente tóxico en la aplicación de las diferentes pruebas.

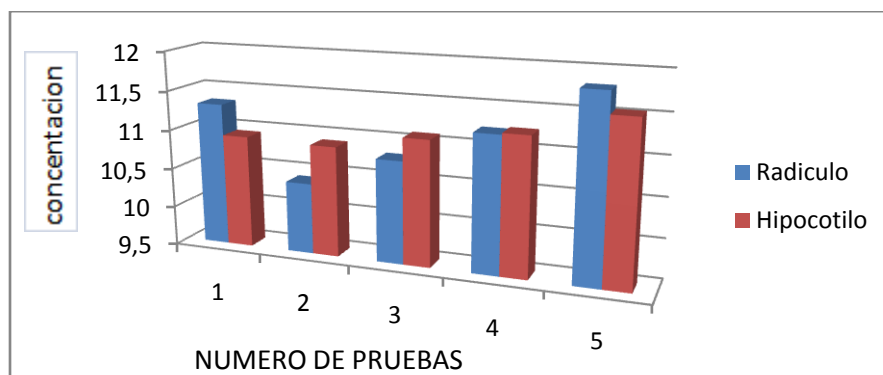
Tabla 43: mediciones del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas del pre-tratamiento de cobre.

BIOENSAYOS	RIDÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	11.32	10.82
2	10.40	10.79
3	10.67	11.13
4	11.10	11.03
5	11.69	11.48
PROMEDIO	11.47	10.89

Fuente: Autor (2009)

Por medio de la tabla número 43 se estableció el promedio de la radícula con un valor de 11.47mm y el promedio del hipocotilo con un valor de 10.89mm; estos resultados nos indican que la radícula generó una mayor afectación con la exposición del agente tóxico que el hipocotilo el cual desarrolló una mayor elongación al finalizar las pruebas fitotóxicas del tóxico.

Grafica 24: Medición del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas de pre-tratamiento con cobre.



Fuente: autor (2009)

Con el análisis de datos, se muestra que el promedio de la radícula e hipocotilo en las diferentes pruebas, constituye un incremento de la longitud en las pruebas número 2 y 3 las cuales desarrollaron una afectación toxica influyente en la radícula que en el hipocotilo con un promedio de longitud de 10.85 mm en comparación con los 10.55 mm que alcanzo la radícula; estas pruebas evidencian un nivel de efecto tóxico sobre los bioindicadores, el cual es leve en el desarrollo de las plántulas durante el ciclo de pruebas.

En esta fase de desarrollo, cabe destacar la prueba número 5 con una longitud de la radícula de 11.75 mm y una del hipocotilo de 11.50 mm, indican una afectación baja, por parte del vertimiento tratado de cobre dentro del sistema de la plántula.

4.8 valor de la concentración efectiva media (ce_{50}) para el pre-tratamiento de níquel

Este pre-tratamiento de níquel, busca generar incremento positivo en todos los valores estudiados anteriormente; a continuación se muestra una tabla con los valores de la CE_{50} en cada una de las pruebas.

Tabla 44: Inhibición del 50% de la población expuesta con el pre-tratamiento de níquel

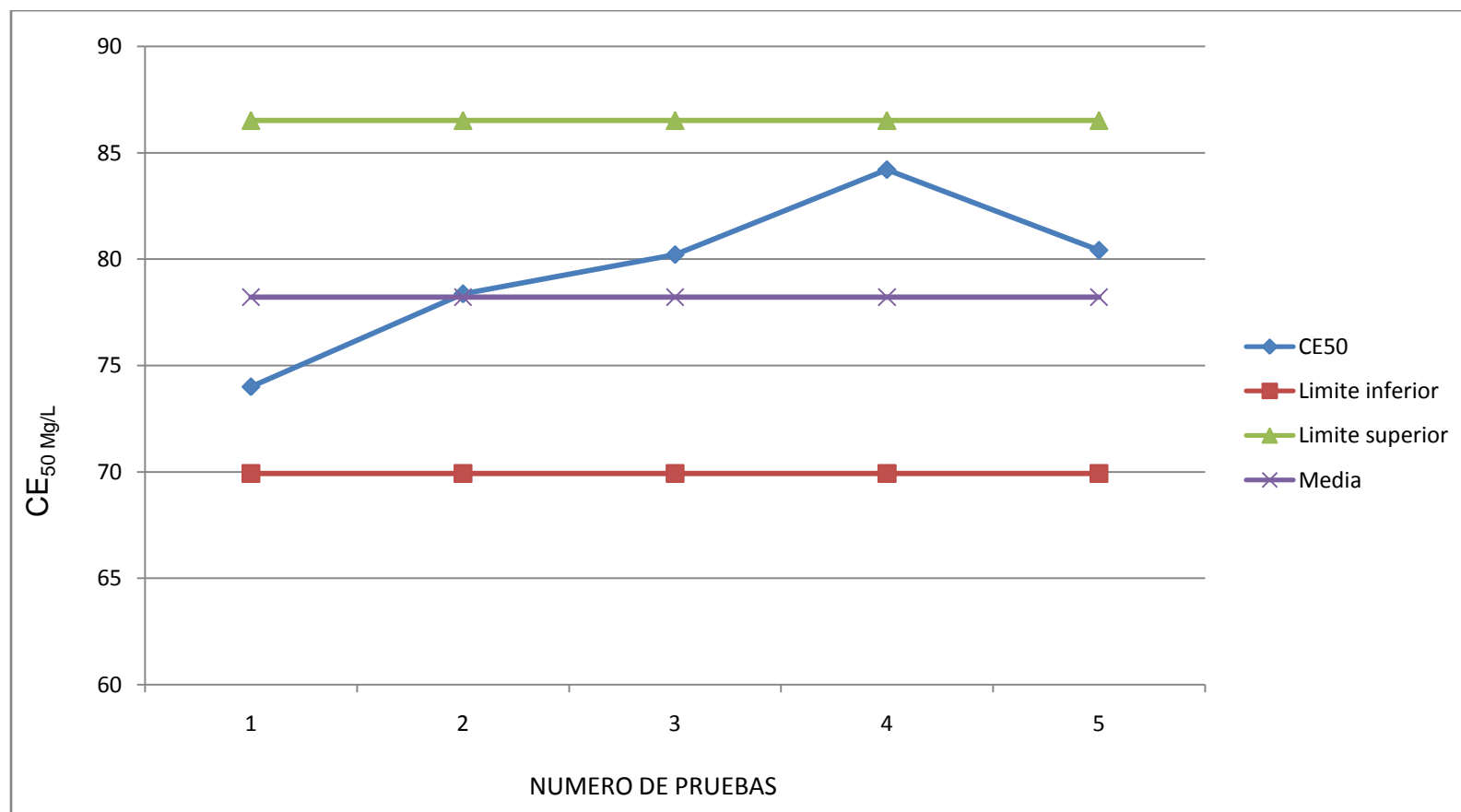
BIOENSAYO	CE_{50}	CE_{50} MINIMA	CE_{50} MAXIMA
1	74,007	68,204	79,016
2	78,363	68,239	86,396
3	80,219	69,503	88,429
4	84,204	74,259	90,374
5	80,426	69,407	88,370
Promedio	79,444	69,922	86,517

Fuente: Autor (2009)

En esta tabla 44 se indica las CE_{50} con un valor de 79,444 mg/L estableciendo que esta es la concentración en la que se genera el 50% de la inhibición de las semillas expuestas al agente toxico; también se determinó la zona de aceptación la cual de delimita con los siguientes rangos, límite inferior de 69,922 mg/L y un límite superior de 86,517 mg/L desarrollando la zona de aceptación donde se deben ubicar los resultados de las pruebas empleadas con este tipo de contaminante.

4.8.1 Carta de control para el pre-tratamiento del vertimiento de níquel proveniente de la industria galvánica

Grafica 25: Carta control para el pre-tratamiento de níquel



Fuente: Autor (2009)

En relación con la carta de control para el pre-tratamiento de níquel, se encontró que las pruebas realizadas, se hallan en la zona de aceptación según los límites inferiores y superiores, determinados por el promedio de los límites inferiores y superiores otorgados por la CE_{50} establecidos con el programa (PROBIT). Esta zona se ubica dentro de 70 y 87 mg/L indicando un incremento satisfactorio en la posible influencia del agente tóxico con exposición a los bioindicadores.

4.8.2 Anova para el pre-tratamiento del vertimiento de níquel. A continuación se puede observar, el desarrollo estadístico en la generación de Anova, para el pre- tratamiento de Níquel proveniente de la industria Galvánica; indicando el número de tratamientos como se muestra en la tabla 46, de igual forma los resultados estadísticos en esta serie de pruebas como se muestra en la tabla 47.

Tabla 45: Pruebas del pre-tratamiento de níquel

Concentración	Número de réplicas			total	promedio
	R1	R2	R3		
100	18	19	19	56.0	18.67
80	13	11	13	37.0	12.33
60	4	6	8	18.0	6.00
40	2	3	2	7.0	2.33
20	1	1	2	4.0	1.33
Blanco	0	1	1	2.0	0.67
				124	41.33

Fuente: Autor (2009)

Tabla 46: Tratamientos Anova para Pruebas del pre-tratamiento de níquel

tratamientos	6
observaciones	3
total	18

Fuente: Autor (2009)

Tabla 47: Resultados Anova para Pruebas del pre-tratamiento de níquel

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	582.83	5	116.57	4.99	3.11
Dentro de Grupos	420.5	18	23.36		
Total	1003.33	23			

Fuente: Autor (2009)

Como se puede observar en la tabla 46, el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis alterna (H_1), determinando así que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en las semillas prueba.

Para las demás pruebas los resultados se encuentran en la tabla número 48.

Tabla 48: Resultados Anova para todas las Pruebas del pre-tratamiento de níquel

No. de Prueba	Fecha	F Calculado	F Teórico	Resultado
1	15/04/2009	4,99	3,11	Se acepta H_1
2	15/04/2009	5,83	3,11	Se acepta H_1
3	15/04/2009	8,15	3,11	Se acepta H_1
4	15/04/2009	5,33	3,11	Se acepta H_1
5	15/04/2009	5,71	3,11	Se acepta H_1

Fuente: Autor (2009)

4.8.3 Relación dosis-respuesta para el pre-tratamiento de níquel. Esta relación dosis-respuesta para el pre-tratamiento de Níquel, presenta los diferentes efectos que causa el contaminante al ser expuesto a los bioindicadores, donde su nivel de germinación se puede realizar con la variación entre las concentraciones y la diferencia entre las mismas.

Para mayor claridad con respecto a lo anterior, se presenta a continuación la clasificación de los diferentes porcentajes de germinación donde se modifican las concentraciones en la tabla 49.

Tabla 49: Porcentaje de germinación vs concentración

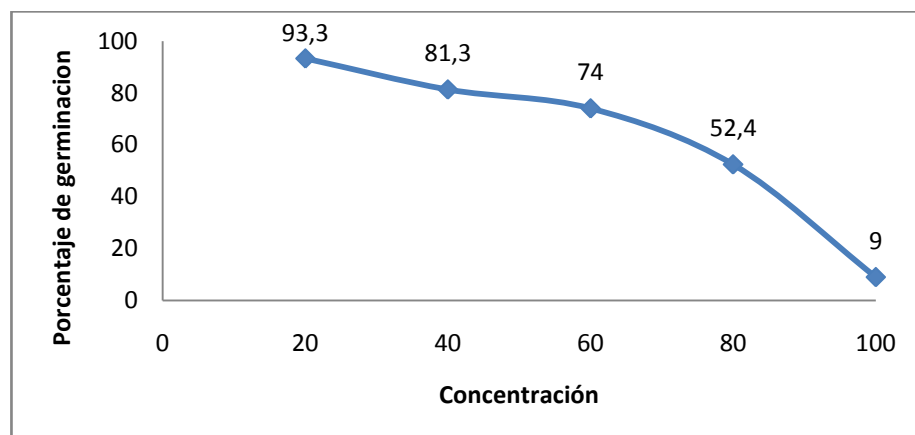
CONCENTRACIONES (ppm)	% GERMINACIÓN
100	9.00
80	52.67
60	74.00
40	81.33
20	93.33
BLANCO	96.00

Fuente: Autor (2009)

En la tabla 49 se establecen nuevos niveles de germinación luego de la implementación del pre-tratamiento en el vertimiento de níquel, estos niveles indican que las concentraciones de 80 (ppm) genera el 52.67% de la afectación en población expuesta desencadenando una germinación en presencia del agente tóxico.

En relación con la recolección de datos, se hace necesaria la graficación de los mismos, ya que se puede observar con mayor claridad las diferencias en el desarrollo de la relación dosis-respuesta en este grupo de pruebas como se presenta a continuación:

Grafica 26: Dosis-respuesta pruebas con pre-tratamiento de níquel



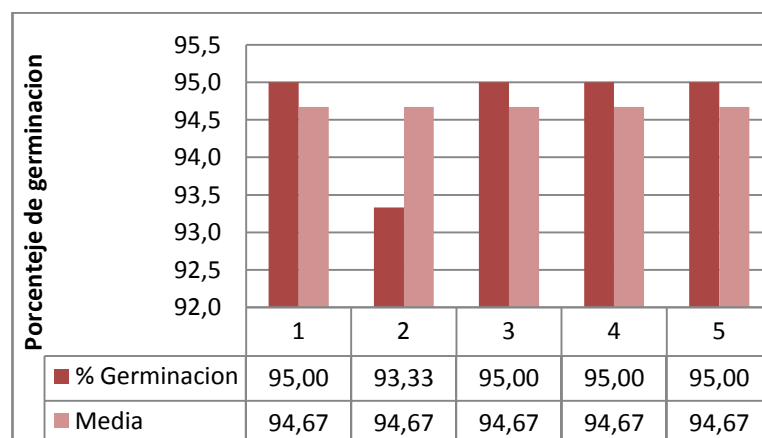
Fuente: Autor (2009)

Según la relación dosis-respuesta se evidencia similitud con las anteriores gráficas, donde se presenta reducción de la concentración del agente tóxico, al

mismo tiempo un aumento en el porcentaje de germinación indicando que son directamente proporcionales una de la otra. Por el contrario, existe diferencia en las anteriores gráficas de dosis-respuesta presentando un incremento radical y de fácil observación dentro de la prueba entre las concentraciones de 100 a 60 (ppm), donde se indica una germinación del 9% a una del 74%; todo esto por la reducción de la carga contaminante del vertimiento en el proceso de pre-tratamiento.

4.8.4 Tabla de germinación para el pre-tratamiento de níquel. En esta gráfica, se puede evidenciar el paralelo de las diferentes pruebas realizadas, obteniendo posibles diferencias entre las pruebas de esta fase del vertimiento pre-tratado como lo indicó la media.

Grafica 27: Comparación del porcentaje de germinación durante las pruebas con pre-tratamiento de níquel



Fuente: Autor (2009)

Como se observa en la gráfica 27, en la prueba número 2, se manifestó un comportamiento diferente de las otras pruebas, con un porcentaje de germinación del 93.33% respecto a las demás, manteniendo un mayor rango que el presentado por la media durante la serie de pruebas aplicadas indicando mayor sensibilidad que la del agente tóxico y las demás pruebas.

4.8.5 Medición de la longitud de la radícula y del hipocotilo en pruebas de pre-tratamiento con níquel. En las mediciones de crecimiento de la radícula y del hipocotilo, se pretende identificar la presencia del agente tóxico en el

proceso de germinación de la plántula, para lo cual se establece la siguiente tabla con el promedio de longitud de la radícula y hipocotilo.

Tabla 50: mediciones del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas con pre-tratamiento de níquel

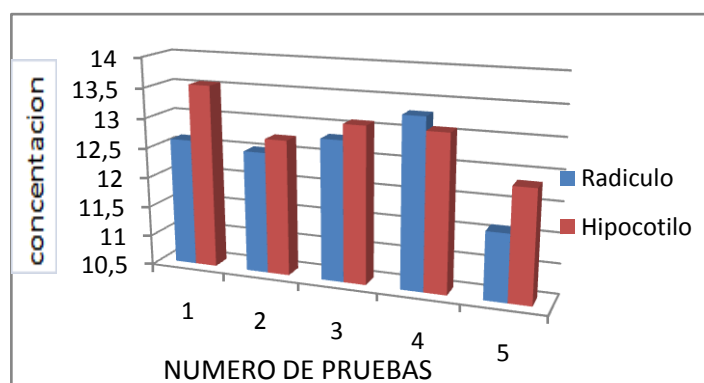
BIOENSAYOS	RIDÍCULA (mm)	HIPOCOTILO (mm)
1	12,62	13,55
2	12,52	12,75
3	12,83	13,09
4	13,3	13,08
5	11,61	12,35
PROMEDIO	12,75	13,36

Fuente: Autor (2009)

Por medio de la tabla número 50 se estableció el promedio de la radícula con un valor de 12,75mm y el promedio del hipocotilo con un valor de 13,36mm; estos resultados nos indican que la radícula generó una mayor afectación en presencia del agente toxico que el hipocotilo el cual desarrollo una mayor elongación al finalizar las pruebas fitotóxicas del tóxico.

En esta gráfica se puede encontrar la diferencia luego de establecer el pre-tratamiento, ya que el crecimiento del hipocotilo fue mayor que la radícula en todas las pruebas; como se mencionó anteriormente el pre-tratamiento redujo de manera considerable la concentración del contaminante el cual posiblemente puede establecer pequeños efectos durante las pruebas como se indicó previamente, cabe mencionar que se manejo una longitud mayor de 13 mm en la mayoría de las pruebas, identificando que el desarrollo de la plántula con este vertimiento es factible.

Grafica 28: Medición del crecimiento para la radícula y el hipocotilo en pruebas de pre-tratamiento con níquel



Fuente: Autor (2009)

4.9 Determinación del Índice de Efecto Tóxico Potencial para el cobre

Para definir el tipo de tóxico establecido por los vertimientos de la Industria Galvánica, se determina el índice toxicológico de los vertimientos los cuales se realizan por medio de cálculos los cuales se realizan a continuación.

4.9.1 Índice Toxicológico del Vertimiento de Cobre

$$Q = \frac{V}{t}$$

$$Q = \frac{2000 L}{2 meses} = 1000 \frac{L}{mes} \times \frac{1m^3}{1000 L} = 1m^3 / mes$$

$$Carga Tóxica (UT) = \frac{100}{CE_{50}} \times Q$$

$$Carga Tóxica (UT) = \frac{100}{9,454} \times 1$$

$$Carga Tóxica (UT) = 10.577$$

$$IT = Log(1 + UT)$$

$$IT = Log(1 + 10.577)$$

$$IT = 1.063$$

4.9.2 Índice Toxicológico del Vertimiento Pre-Tratado

$$Q = \frac{V}{t}$$

$$Q = \frac{2000L}{2meses} = 1000 \frac{L}{mes} \times \frac{1m^3}{1000L} = 1m^3 / mes$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = \frac{100}{CE_{50}} \times Q$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = \frac{100}{39.905} \times 1$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = 2.50$$

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

$$IT = \text{Log}(1 + 2.50)$$

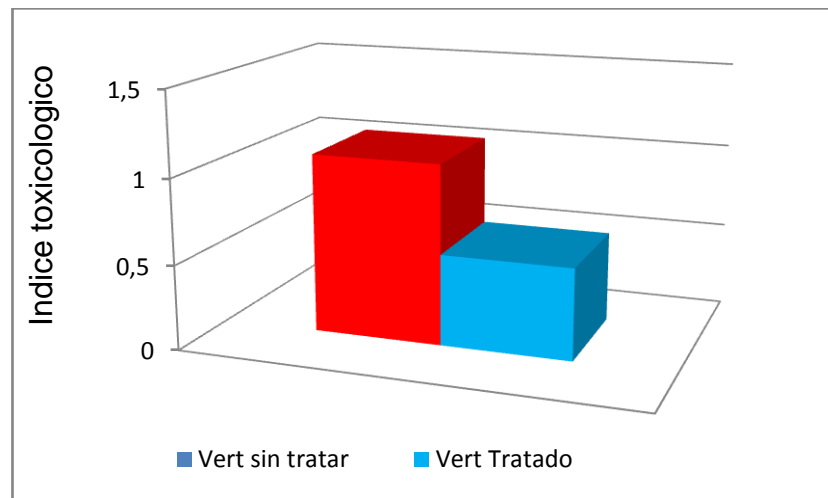
$$IT = 0.54$$

Donde:

- ♦ Q: Caudal promedio del efluente, (m³/mes) el cual varía según la producción de la Industria evaluada.
- ♦ CL 50: Concentración letal media promedio
- ♦ CT: Carga Toxica, expresada en unidades toxicas
- ♦ IT: Índice Toxicológico

Por medio del índice de toxicidad del vertimiento de cobre se establece que se generan mayores impactos que el vertimiento de cobre pre-tratado con un índice de toxicidad de 0.54, mencionando que después del pre-tratamiento al vertimiento de cobre el índice toxicológico disminuye, pasando de 1.063 a 0,54. Se puede indicar que los cambios de los índices establecidos después del pre-tratamiento fueron altos pero si se aumenta el índice de la CE₅₀ para este tipo de vertimiento se generará una mayor reducción del índice que el establecido en esta investigación.

Grafico 29: Relación de los índices tóxicos del vertimiento sin pre-tratamiento v el vertimiento pre-tratado



Fuente: Autor (2009)

Del resultado obtenido y mediante la tabla 31 se puede observar que el índice toxicológico es de tipo despreciable, pues se encuentra por debajo de los rangos establecidos por investigaciones del mismo orden.

Tabla 51: Rangos de Índices Toxicológicos

Rangos	Carga Toxica
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.

4.9.3 Índice Toxicológico del Vertimiento de Níquel

$$Q = \frac{V}{t}$$

$$Q = \frac{2000 \text{ L}}{2 \text{ meses}} = 1000 \frac{\text{L}}{\text{mes}} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} = 1 \text{ m}^3 / \text{mes}$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = \frac{100}{CE_{50}} \times Q$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = \frac{100}{12.855} \times 1$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = 7.779$$

$$IT = \log(1 + UT)$$

$$IT = \log(1 + 7.779)$$

$$IT = 0.94$$

4.9.4 Índice Toxicológico del Vertimiento Pre-Tratado

$$Q = \frac{V}{t}$$

$$Q = \frac{2000L}{2\text{meses}} = 1000 \frac{L}{\text{mes}} \times \frac{1m^3}{1000L} = 1m^3 / \text{mes}$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = \frac{100}{CE_{50}} \times Q$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = \frac{100}{79.444} \times 1$$

$$Carga\ Tóxica\ (UT) = 1.26$$

$$IT = \log(1 + UT)$$

$$IT = \log(1 + 1.26)$$

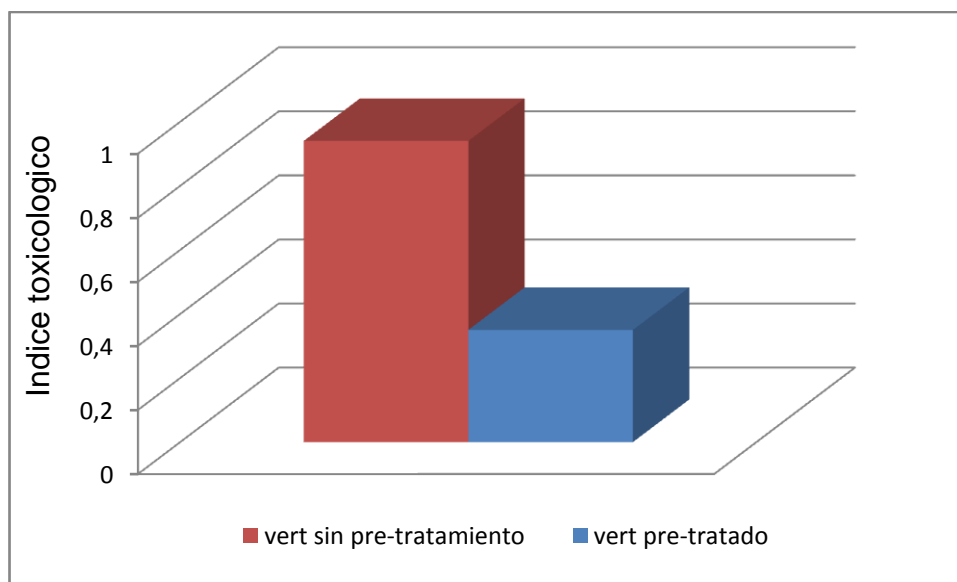
$$IT = 0.35$$

Donde:

- ♦ Q: Caudal promedio del efluente, (m³/mes) el cual varía según la producción de la Industria evaluada.
- ♦ CL 50: Concentración letal media promedio
- ♦ CT: Carga Toxica, expresada en unidades toxicas
- ♦ IT: Índice Toxicológico

Con el índice toxicológico se determina la diferencia del vertimiento al realizársele un proceso de pre-tratamiento. Se determinó el índice toxicológico

del vertimiento sin pre-tratamiento el cual obtuvo un valor de 0,94, de igual forma se realizo el pre-tratamiento para el mismo vertimiento el cual obtuvo un valor de 0,35 con el cual se evidencia una reducción bastante alta del índice toxicológico para el vertimiento de níquel.



Fuente: Autor (2009)

Del resultado obtenido y mediante la tabla 31, se puede observar que el índice toxicológico es despreciable, pues se encuentra por debajo de los rangos.

5 CONCLUSIONES

- ♦ La sensibilidad determinada para la *Lactuca sativa* con la exposición del agente tóxico Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), se estableció con un valor de 35,463 mg/L, ubicándose dentro de los siguientes límites; límite inferior de 28.019 mg/L límite superior de 42.258 mg/L, la sensibilidad identificada durante este ciclo de pruebas se encuentra dentro de los rangos establecidos por otros investigadores con este tipo de bioindicadores; las diferencias con los valores obtenidos y los teóricos se pueden asumir por el manejo de los químicos en las pruebas realizadas.
- ♦ Se estableció por medio de las pruebas de Cobre a partir de la sustancia pura que la concentración de inhibición media (CE_{50}) para este tipo de agente tóxico es 4.119 mg/L. Dicha concentración se encuentra en los límites de las normas con las que se rige el uso y aprovechamiento del recurso agua como son la resolución 1074 de 1997, el decreto 1594 de 1984, indicando la normatividad para la protección y supervivencia de la flora y fauna.
- ♦ La concentración determinada para el vertimiento de cobre antes del pre-tratamiento fue de 80.2 mg/L, después de la realización del pre-tratamiento se generó una reducción del 71.4 mg/L indicando una baja disminución de la concentración del vertimiento, garantizando que se aumentará la inhibición media CE_{50} durante el proceso de exposición con los semillas.
- ♦ La determinación de la CE_{50} del vertimiento de cobre obtuvo un valor de 9.454 mg/L; evidenciando la CE_{50} del pre-tratamiento con un valor de 39.905 mg/L, al comparar los resultados obtenidos se puede observar que el pre-tratamiento disminuyó la concentración del vertimiento de cobre y aumentó los niveles de inhibición media de los semillas frente al agente tóxico y generó un desarrollo de la plántula durante la exposición del contaminante.
- ♦ Se puede interpretar también que a medida que se garantice la reducción de la concentración del contaminante en el vertimiento se aumentará el nivel de la CE_{50} para los semillas expuestos en los ensayos de toxicidad.

- ♦ Se concluye que en todos los ensayos de toxicidad desarrollados durante la investigación se desarrolló una relación directamente proporcional frente a los niveles de concentración de los contaminantes y el porcentaje de germinación el cual se afectaba con los cambios de concentraciones a niveles más altos se bajaban los niveles de germinación de los semillas.
- ♦ Durante el análisis de la elongación de la radícula y del hipocotilo se podía verificar la intensidad del toxico al generar una inhibición media en la estructura de los semillas; por medio de ésta afectación a la estructura se puede establecer que parte del semilla fue más vulnerable con referencia al tóxico si se genera mayor inhibición a la radícula o al hipocotilo.
- ♦ Durante la realización de el análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las pruebas fitotóxicas, se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1), estableciendo que a diferentes concentraciones se producen efectos distintos en los semillas de prueba, proporcionando de esta manera un grado de confiabilidad de los resultados obtenidos durante el desarrollo de las pruebas.
- ♦ El índice toxicológico del vertimiento se estableció como despreciable, y el resultado de la concentración después del pre-tratamiento no disminuyó notablemente, ya que la concentración de inhibición media (CE_{50}) antes y después del pre-tratamiento no tuvo un índice alto de modificación.
- ♦ También se estableció por medio de las pruebas de Níquel a partir de la sustancia pura que la concentración de inhibición media (CE_{50}) para este tipo de agente tóxico es 7.511 mg/L. Dicha concentración se encuentra sobre los límites de las normas con las que se rige el uso y aprovechamiento del recurso agua como son la resolución 1074 de 1997, el decreto 1594 de 1984, indicando la normatividad para la protección y supervivencia de la flora y fauna.
- ♦ La concentración de la CE_{50} determinada para el vertimiento de Níquel antes del pre-tratamiento fue de 18.8 mg/L, superando los límites

máximos ejercidos por la normatividad como se contempla en la resolución 1074 de 1997 que indica un valor de 0,50 mg/L para este tipo de contaminante; con el desarrollo del pre-tratamiento la concentración de la CE_{50} disminuyó hasta obtener un valor de 0,07 mg/L, lo que garantiza un 99.6% de eficiencia del proceso, certificando el cumplimiento del vertimiento con las normas establecidas.

- ♦ La determinación de la CE_{50} del vertimiento fue de 12.855 mg/L; de igual manera se obtuvo la CE_{50} del pre-tratamiento registrando un valor de 79.444 mg/L. Al comparar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se observa que el pre-tratamiento disminuye la concentración de inhibición media del agente tóxico y permite a su vez el desarrollo de la plántula durante la exposición del mismo, ya que para generar la CE_{50} se deben obtener porcentajes mayores al 60%; para obtener una inhibición de más de la mitad de la población de las semillas expuestas.
- ♦ Con la finalización de la investigación se concluye que la relación concentración vs porcentaje de inhibición es directamente proporcional, indicando que en presencia de concentraciones altas los niveles de inhibición son mayores en las semillas expuestas; a diferencia de la relación concentración vs elongación de plántula (Radícula y Hipocotilo), presentando diferentes variaciones ya que estas son inversamente proporcionales, dependiendo de las cualidades del contaminante se puede enseñar las partes de mayor afectación dentro de las semillas, evidenciando el efecto que tiene las concentraciones altas con la reducción en el crecimiento de las semillas expuestas.
- ♦ Durante la realización de el análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las pruebas fitotóxicas, se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1), estableciendo que a diferentes concentraciones se producen efectos distintos en los semillas de prueba, proporcionando de esta manera un grado de confiabilidad de los resultados obtenidos durante el desarrollo de las pruebas.
- ♦ El índice toxicológico del vertimiento se determinó como despreciable, y se generó una disminución notoria después de emplearse el pre-tratamiento con el cual se logró que el vertimiento analizado cumpliera la norma establecida para la disposición de los vertimientos con estas características.

6 RECOMENDACIONES

- ♦ Se recomienda la utilización de los ensayos fitotóxicos por ser una herramienta adecuada para el diagnóstico oportuno de posibles generaciones de impactos ambientales en el medio ambiente (flora y fauna), los cuales deben ser implementados en los diferentes sectores industriales y para nuevos tipos de contaminantes.
- ♦ Con el fin de obtener resultados satisfactorios frente a los ensayos de Fitotoxicidad en vertimientos industriales se debe garantizar la constancia de la carga contaminante dentro del manejo de los vertimientos ya que dentro de estas industrias se modifica la concentración la cual depende de la demanda del producto, lo que indicaría que la totalidad de las pruebas deben tener las mismas concentraciones del contaminante para obtener resultados específicos en este tipo de vertimiento.
- ♦ El pre-tratamiento obtenido por la precipitación química de cobre y níquel a partir del hidróxido de sodio fue más efectivo para el níquel en el que la formación de lodos se presentó en un nivel elevado siendo tóxico y a su vez produciendo impacto en otros recursos naturales, generando otro tipo de problemas ambientales en la disposición final de estos; por lo tanto es necesario que realizar otro tipo de tratamiento para poder construir una disposición adecuada.
- ♦ Debido a que la reducción en el índice de efecto tóxico potencial no generó una disminución adecuada en el vertimiento de cobre se podría establecer otro tipo de tratamiento para este vertimiento que logre disminuir las concentraciones del contaminante a las establecidas por las normas vigentes.

BIBLIOGRAFIA

PINTO VARGAS, Laura Cristina; Determinación de la concentración de inhibición media (CE_{50}) de Cromo para la semilla *LACTUCA SATIVA* mediante ensayos de toxicidad en la ciudad de Bogotá 2009, Universidad De La Salle Facultad De Ingeniería Ambiental y Sanitaria.

BAYONA PINEDA, Andrea Liliana y LOPEZ CELIS, Jairo Hernán. Ensayo de Toxicidad Aguda al Efluente de la PTAR de la Calera Mediante la Utilización de Semillas de *Lactuca Sativa L.* Y Propuesta para su Utilización como Agua de Riegos para Cultivos. Trabajo de grado ingeniero ambiental y sanitario. Bogotá D.C.: Universidad de La Salle, Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. 2006.

BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DIAZ BAEZ, Maria Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda; Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Capitulo 6. Pg 132, Diciembre 2006.

DÍAZ BAEZ, María Consuelo; BUSTOS LÓPEZ, Martha Cristina y ESPINOSA RAMÍREZ, Adriana Janneth. Pruebas de Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos, conceptos generales. Colombia: Unibiblos, 2004.

MORENO GRAU, Maria Dolores. Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana, principios de toxicología. España: McGraw Hill, 2003.

CAPÓ MARTÍ, Miguel Andrés. Principios de Ecotoxicología: Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente, ecotoxicología y toxicología ambiental. España: McGraw Hill, 2002

Decreto 1594 de 1984, Capítulo IV, artículo 45


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

Centro Panamericano De Ecología Humana y Salud División de Salud Ambiental; (2003) Introducción a la Toxicología Ambiental. ED. Dra. Lilia, Albert

CASTILLO MORALES, Gabriela. Eds. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas, conceptos generales. México, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 1 de 22
		Versión 0
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Definiciones Principio del modelo matemático Procedimiento Bibliografía Anexo A Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad Anexo B Representación gráfica del cálculo de la CL50 Anexo C Determinación del Chi-cuadrado (X^2). Anexo D Factor (p) para el Probit calculado (Y). <p>1. OBJETIVO</p> <p>Evaluar los resultados de los ensayos por medio de un modelo estadístico</p> <p>2. DEFINICIONES</p> <p><u>Concentración:</u> La concentración es la magnitud física que expresa la cantidad de un elemento o un compuesto por unidad de volumen.</p> <p><u>Dosis:</u> Contenido de principio activo, expresado en cantidad por unidad de toma, por unidad de volumen o de peso en función de la presentación, que se administrará de una vez.</p> <p><u>Efecto:</u> Consecuencia positiva o negativa, de la ocurrencia de un evento.</p> <p><u>Modelo:</u> Conceptualización de un evento, un proyecto, una hipótesis, el estado de una cuestión, que se representa como un esquema con símbolos descriptivos de características y relaciones más importantes con un fin: ser sometido a modelización como un diseño flexible, que emerge y se desarrolla durante el inicio de la investigación como una evaluación de su relevancia.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 2 de 22
		Versión 0

Toxicidad aguda: La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

Probit: Modelo estadístico que analiza las pruebas de toxicidad. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.

3. PRINCIPIO DEL MODELO MATEMATICO

En un experimento típico de pruebas de toxicidad se tiene la siguiente situación:

- 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 1; de esta manera la distribución de p vs. X será de tipo normal

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 3 de 22
		Versión 0

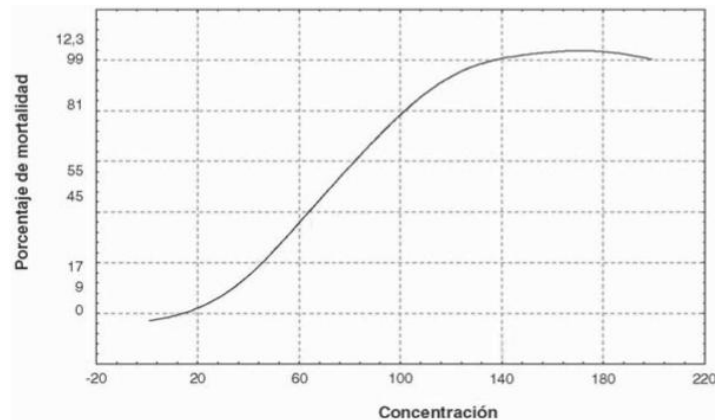


Figura 1. Relación dosis-respuesta

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

$$y = a + bx$$

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

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

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

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

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

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 4 de 22
		Versión 0

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

4. PROCEDIMIENTO


Para el cálculo de la CL50 por este método es necesario contar, por lo menos, con dos porcentajes intermedios del efecto esperado (valores entre 0 y 100%).

Con los resultado obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda con *Daphnia Pulex* se debe construir una tabla que contenga los siguientes datos:

- Concentración de la sustancia ensayada en %
- Logaritmo en base 10 de las concentraciones (x)
- Numero de organismos en cada concentración
- Número de organismos muertos en cada concentración (r).
- Porcentaje de mortalidad en cada concentración (P).
- Probit empírico (PE).
- Probit esperado o calculado (Y).

Los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla del anexo A con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones.

Tabla 1: Cálculo de la CL50 por el método Probit						
Concentración del agente tóxico (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empírico (PE)	Probit calculado (Y)

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 5 de 22
		Versión 0

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrulado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 1 Anexo B), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina *m* y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50.

Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de *S* correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (*x*) por unidad de incremento del Probit.

Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de *S* correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (*x*) por unidad de incremento del Probit

En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores, remplazando en la siguiente formula:

$$S = (X - x) / (PE - Pe)$$


Donde:

X: Mayor concentración

x: Menor concentración

PE: Probit empírico correspondiente a la mayor concentración

Pe: Probit empírico correspondiente a la menor concentración

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 6 de 22
		Versión 0
<p>A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrulado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 1 Anexo B), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina <i>m</i> y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit</p> <p>En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores, remplazando en la siguiente formula:</p> $S = (X - x) / (PE - Pe)$ <p>Donde:</p> <p>X: Mayor concentración</p> <p>x: Menor concentración</p> <p>PE: Probit empírico correspondiente a la mayor concentración</p> <p>Pe: Probit empírico correspondiente a la menor concentración</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 7 de 22
		Versión 0

Así, los valores del Probit esperado o calculado (Y) para cada concentración podrán ser calculados utilizando la siguiente expresión:

$$Y = 5 + \frac{m - m_0}{S}$$

Una vez calculados se colocan en la columna correspondiente de la tabla 1.

La prueba de hipótesis utilizada para establecer la asociación entre la concentración de la sustancia tóxica y la respuesta en unidades probit es la prueba de CHI-cuadrado (χ^2). Los datos para el cálculo de este valor se colocan en una tabla 2 (anexo C) de la siguiente forma:

- Concentración de la sustancia estudiada en %
- Logaritmo decimal de la concentración (x).
- Probit calculado o esperado (Y).
- Numero de organismos (N)
- Mortalidad observada (r)
- Porcentaje de efecto esperado (P).

La mortalidad esperada (NP) se calcula multiplicando (N) por (P).

El cálculo de la desviación de la mortalidad se obtiene hallando la diferencia entre la mortalidad observada y la esperada. La contribución al Chi cuadrado de cada uno de los valores se calcula:

$$(r - NP)^2 / NP(1 - P)$$

Y para el cálculo de los grados de libertad (n):

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 8 de 22
		Versión 0

Con los datos obtenidos de realiza la siguiente tabla 3 para el calculo del intervalo de confianza:

Tabla 3. Valores de X2 para una P=0.05.	
Grados de libertad(n)	X2

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$EE_{\log_{10} CL_{50}} = \frac{1}{\sqrt{SNp + (m-x)^2 / SNp(x-x^2)}}$$

4.17. Inicialmente, se construye una tabla en la cual se incorporen los siguientes datos:

- Logaritmo decimal de las concentraciones (x).
- Numero de organismos por concentración (N).
- Probit esperado o calculado (Y).
- Factor p, el cual se obtiene de la tabla 4 del Anexo C con el valor Y.
- Productos Np, Npx y Npx2, obtenidos de los datos de la misma tabla
- Sumatoria de los productos correspondientes a los valores SNp, SNpx y SNpx2
- Factor p debe ser obtenido en la tabla entrando el valor de Probit calculado
- Producto Np resultante de la multiplicación de los valores de número de organismos por el factor p y su respectiva sumatoria.
- Producto Npx resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de las concentraciones con su respectiva sumatoria.
- Producto Npx2 resultante de la multiplicación del producto anterior por el

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 9 de 22
		Versión 0

Con todos los datos se obtiene la siguiente tabla 5:

Tabla 5. Cálculo del error estándar del log ₁₀ CL ₅₀ .						
Log 10 de la concentración (x)	Núm. De organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx ²)

Al tener la CL₅₀ y no olvidando que el intervalo de confianza es 95% tendremos la concentración letal con sus límites inferior y superior respectivamente.

Para el desarrollo de esta investigación se adquirió el Software de Probit, el cual determinar la CL₅₀-48 y los límites de confianza mas rápido, y su procedimiento es el siguiente:

Se instala el programa en un computador que cuente con un software de Windows 98 en adelante, creándose una carpeta de Probit en el escritorio.


Dentro de esta carpeta quedaran registrados varios archivos; se dirige al archivo con nombre PROBFIS2 y se da doble clic donde se abre una ventana de la siguiente manera:

```

ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC
NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20
A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR
Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451
Marzo 1989

Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ?
Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare >
===== >

```

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 10 de 22
		Versión 0
<p>Da dos opciones para manejar el programa, la (1) es para introducir los datos con el teclado, la (2) para introducirlos en fila. Es este paso se escribe (1), y sale:</p> <div data-bbox="521 768 1204 1265" data-label="Code-Block"> <pre> ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20 A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451 Marzo 1989 Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ? Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare > ===== > 1 Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3 </pre> </div> <p>Ahora se le da un nombre al archivo que se crea con los resultados que determina el programa, así:</p>		

ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCOLARE LA LC
NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20

A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR

Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451

Marzo 1989

Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ?
Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare >

===== > 1

Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ?

===== > 3

Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati

===== > B

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 11 de 22
		Versión 0

Ahora el programa pide que se inserten el numero de concentraciones, sin el control, numero de muertes en el control, numero de organismos en el control, así:

Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ?
===== > 3
Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati
===== > B
NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5
NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0
NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20


Ahora se procede a insertar los datos de las concentraciones comenzando por la concentración menor, el numero de muertes en cada una y el numero de

tratamientos, así:

```

Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ?
===== > 3
Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati
===== > B
NUMERO DI CONCENTRACIONI (escluso el controllo)=5
NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0
NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20
== > INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. INFERIORE
CONCENTRACIONE= 0.1
NUMERO MORTI= 0
NUMERO TRATTATI=20
  
```

Así, sucesivamente hasta completar los datos de las 5 concentraciones. Al terminar este paso se da enter y se cierra esta ventana, en la carpeta de probit aparece un archivo con el nombre que se le designo a esa batería donde dará los resultados de la CL50 son los límites de confianza

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06							
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 12 de 22							
		Versión 0							
<p>Este procedimiento se debe realizar para cada batería de ensayo, quedaran registrados los resultados en su respectivo archivo.</p> <p>5. EJEMPLO</p> <p>Se realizo una prueba de toxicidad, de la cual se obtuvieron los siguientes porcentajes de mortalidad:</p> <p>Ejemplo de cálculo de la CL50 por el método Probit.</p> <table><tr><td>Concentración del agente</td><td>Log10 de la concentración</td><td>Núm. de organismos</td><td>Núm. de muertos</td><td>Porcentaje de</td><td>Probit empirico</td><td>Probit calculado</td></tr></table>			Concentración del agente	Log10 de la concentración	Núm. de organismos	Núm. de muertos	Porcentaje de	Probit empirico	Probit calculado
Concentración del agente	Log10 de la concentración	Núm. de organismos	Núm. de muertos	Porcentaje de	Probit empirico	Probit calculado			

tóxico (%)	(X)	(N)	(r)	mortalidad (P)	(PE)	(Y)
100	2,0	20	15	75	5,67	5,53
50	1,7	20	9	45	4,87	4,96
25	1,4	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,1	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,8	20	1	5	3,36	3,27

No se debe olvidar que los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla de anexo A con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrulado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 1 Anexo B), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CL50. Teniendo en este caso un $m = 1.72$, por lo tanto la CL50 = 52.5 mg/l.

En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores:

$$x_m = 0.8 \quad PE = 3.30$$

$$x_M = 2.0 \quad PE = 5.55$$

Si:
$$S = (X - x) / (PE - PE)$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 13 de 22
		Versión 0
<p>Siendo:</p> <p>x_M = Mayor concentración.</p> <p>x_m = Menor concentración.</p> <p>PE = Probit empírico correspondiente a la mayor concentración.</p>		

$PE =$ Probit empírico correspondiente a la menor concentración.

Tendremos:

$$S = (2.0 - 0.8) / (5.55 - 3.30)$$

$$S = 0.533$$

Obteniendo así la tabla del Chi-cuadrado (X^2) como se observa en el Anexo E.

Se reemplaza en la ecuación los valores:

$$n = K - 2$$

$$n = 5 - 2 = 3$$

En la tabla 4 se determina el valor de X^2 para tres grados de libertad, el valor obtenido es 7,82; al compararlo con el valor obtenido en la tabla, se observa que:

$$7.82 > 0.482$$

Por lo tanto, la recta está bien ajustada; en caso contrario, trazar nuevamente la recta y volver a calcular el Chi cuadrado.

Tabla 5.7. Valores de X^2 para una $P=0.05$.	
Grados de libertad(n)	x^2
1	3,34
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,4
6	12,6
7	14,4
8	15,5
9	16,9
10	18,8

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 14 de 22
		Versión 0

Cálculo del intervalo de confianza

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$EE \log_{10} CL_{50} = \frac{1.96}{S} \sqrt{\frac{1}{\sum Np} + \frac{(m - x)^2}{\sum Np(x - x^2)}}$$

Así se construye la grafica:

Cálculo del error estándar del log10 CL50.

Log 10 de la concentración (x)	Núm. de organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx ²)
2,0	20	5,53	0,569	11,38	22,76	45,52
1,7	20	4,96	0,635	12,70	21,59	36,70
1,4	20	4,40	0,558	11,16	15,62	21,87
1,1	20	3,84	0,388	7,76	9,54	9,39
0,8	20	3,27	0,194	3,88	3,10	2,48
			(Σ)'	46,88	71,61	115,96

En este caso sería:

$$S = 0.533$$

$$x = \sum Npx / \sum Np = 1.527$$

$$m = 1.72$$

$$\sum Np = 46.88 \quad \sum Npx = 71.61 \quad \sum Npx^2 = 115.96$$


$$\sum Np(x - x^2) = \sum Npx^2 - \{(\sum Npx)^2 / \sum Np\} = 6.574$$

Sustituyendo estos valores en la expresión:

$$EE \log_{10} CL_{50} = 0.0875$$

Así, el EE de CL50 será:

$$EECL_{50} = \log 10 \times EE \log_{10} CL_{50} \times 10^m$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 15 de 22
		Versión 0
<p>Donde:</p> $\log 10 = 2.3026$ $EE\log_{10} CL_{50} = 0.0875$ $10^m = 51.97$ <p>Sustituyendo los valores en la expresión:</p> $EECL_{50} = 32.96$ <p>Como la:</p> $CL_{50} = 51.97$ $Intervalo de confianza = m \pm EECL_{50}$ $al 95\% = 51.97 + 32.46 = 84.43$ $51.97 - 32.46 = 37.14$ <p>Por tanto, la CL50 con los respectivos límites será:</p> <ul style="list-style-type: none">• Limite inferior: 41.9 ppm• CL 50: 52.5 ppm• Limite Superior: 63.1 ppm <p>Utilizando el Software con los datos de el ejemplo anterior seria:</p>		

	<p>ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCOLARE LA LC NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20 A. Puđu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451 Marzo 1989</p> <p>Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ? Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare > ===== > 1</p> <p>Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3</p> <p>Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati ===== > B</p>	
--	---	--

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 16 de 22
		Versión 0

NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5
 NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0
 NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20

 == >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
 CONCENTRACIONE= 6.25
 NUMERO MORTI= 1
 NUMERO TRATTATI=20

 == >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
 CONCENTRACIONE= 12.50
 NUMERO MORTI= 2
 NUMERO TRATTATI=20

 == >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
 CONCENTRACIONE= 25
 NUMERO MORTI= 5
 NUMERO TRATTATI=20

 == >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
 CONCENTRACIONE= 50
 NUMERO MORTI= 9
 NUMERO TRATTATI=20

 == >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
 CONCENTRACIONE= 100
 NUMERO MORTI= 15
 NUMERO TRATTATI=20

Al terminar de digitar los datos en el programa, se cierra esta ventana y al abrir el archivo de nombre B los datos salen registrados de la siguiente manera:

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI osservati	attesi
6.25	0.7959	20.	1.	0.68
12.50	1.0969	20.	2.	2.20
25.00	1.3979	20.	5.	5.28
50.00	1.6990	20.	9.	9.73
100.00	2.0000	20.	15.	14.27
Controllo		20.	0.	0.00

=====

**FACULTAD DE
INGENIERIA
AMBIENTAL Y
SANITARIA**



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
 Bogotá - Colombia

LB06

**LABORATORIO
DE BIOENSAYOS**

**ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL
METODO DE PROBIT**

**Página 17
de 22**

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:
(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) = 1.5801
Pendenza (b) = 1.9932 es = 0.3991
Media delle X = 1.5377
Media delle Y = 4.6451
CHI quadro = 0.4327

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	3.5373	0.7646	7.1428
LC50	51.9726	37.1407	84.4326

Como se observa tanto el método manual como con el Software, los resultados de la CL 50 y los limites de confianza son iguales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.metodologia probit.htm>
- http://www.unizar.es/guiar/1/Accident/An_conse/Probit.htm

Elaboro:	Alba Janneth Bernal Paredes	41012014
	Andrea Paola Rojas Avella	41001100
Primera Revisión:	Pedro Miguel Escobar Malaver	
Segunda Revisión:	Rubén Darío Londoño	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 18 de 22
		Versión 0

7. ANEXOS

ANEXO A

Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

A Valores entre 99, 0 y 99, 9.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 19 de 22
		Versión 0

ANEXO B

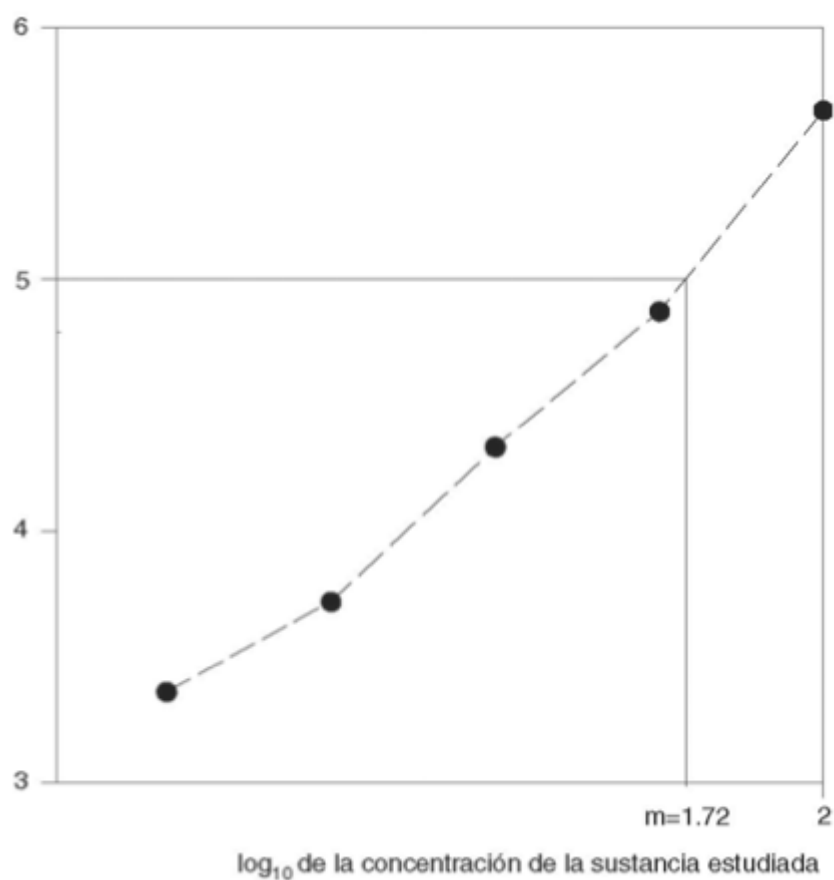




Figura 1. Representación gráfica del cálculo de la CL50


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá • Colombia						LB06	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT						Página 20 de 22	
							Versión 0	
ANEXO C								
Tabla 2. Determinación del Chi-cuadrado(X2).								
Concentración de la sustancia tóxica (%)	Log10 de la Concentración(X)	Probit calculado (Y)	Porcentaje de efecto esperado (P')	Núm.de organismos (N)	Núm.de muertos (r)	Mortalidad esperada (NP')	Desviación (r- NP')	Contribuc.al X2 (r-NP')2 NP'(1-P')

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 21 de 22
		Versión 0

ANEXO D

Tabla 4. Factor (p) para el Probit calculado (Y).

Y	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,069	0,062	0,076	0,092	0,110
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,264	0,302	0,336	0,370	0,406
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,583	0,601	0,616	0,627	0,634
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,589	0,558	0,532	0,503	0,471
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,154
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,059	0,050	0,031	0,025	0,019
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB06
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 22 de 22
		Versión 0

ANEXO E


Determinación del Chi-cuadrado(X2).

Concentración de la sustancia tóxica (%)	Log10 de la Concentración(X)	Probit calculado (Y)	Porcentaje de efecto esperado (P')	Núm.de organismos (N)	Núm.de muertos (r)	Mortalidad esperada (NP')	Desviación (r-NP')	Contribuc.al X2 (r-NP')2 NP'(1-P')
100	2.0	5.53	0.705	20	15	14.1	0.9	0.19
50	1.7	4.96	0.485	20	9	9.7	-0.7	0.09
25	1.4	4.40	0.275	20	5	5.5	-0.5	0.06
12.5	1.1	3.84	0.125	20	2	2.5	-0.5	0.11
6.25	0.8	3.27	0.045	20	1	0.9	0.1	0.01
								0.48

ANEXO B

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 1 de 7
		Versión 0
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Definiciones Principio del modelo Procedimiento Ejemplo Bibliografía Anexo A <p>1. OBJETIVO</p> <p>Comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos.</p> <p>2. DEFINICIONES</p> <p><u>Variable</u>: conceptos que forman enunciados de un tipo particular denominado hipótesis. Las variables se refieren a propiedades de la realidad que varían, es decir, su idea contraria son las propiedades constantes de cierto fenómeno.</p> <p><u>Variable Dependiente</u>: características de la realidad que se ven determinadas o que dependen del valor que asuman otros fenómenos o variables independientes.</p> <p><u>Variables independientes</u>: Los cambios en los valores de este tipo de variables determinan cambios en los valores de otra (variable dependiente).</p> <p><u>Grados de libertad</u>: número efectivo de observaciones que contribuyen a la suma de cuadrados en un ANOVA, es decir, el número total de observaciones menos el número de datos que sean combinación lineal de otros.</p> <p><u>Hipótesis</u>: Las hipótesis son proposiciones provisionales y exploratorias sobre la</p>		

veracidad o falsedad de un concepto, una teoría o un modelo con un alcance de trabajo de investigación por simulación y con métodos de campo o de laboratorio

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 2 de 7
		Versión 0
3. PRINCIPIO DEL MODELO		
<p>El análisis de varianza parte de algunos supuestos que han de cumplirse:</p> <ul style="list-style-type: none">• La variable dependiente debe medirse al menos a nivel de intervalo.• Independencia de las observaciones.• La distribución de la variable dependiente debe ser normal.• Homogeneidad de las varianzas <p>Los modelos de <i>efectos aleatorios</i> asumen que en un factor se ha considerado tan sólo una muestra de los posibles valores que éste puede tomar, estos modelos se usan para describir situaciones en que ocurren diferencias incomparables en el material o grupo experimental. El ejemplo más simple es el de estimar la media desconocida de una población compuesta de individuos diferentes y en el que esas diferencias se mezclan con los errores del instrumento de medición.</p> <p>La técnica fundamental consiste en la separación de la suma de cuadrados (SS, 'sum of squares') en componentes relativos a los factores contemplados en el modelo. Como ejemplo, mostramos el modelo para un ANOVA simplificado con un tipo de factores en diferentes niveles. (Si los niveles son cuantitativos y los efectos son lineales, puede resultar apropiado un análisis de regresión lineal).</p>		
$SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Error}} + SS_{\text{Factores}}$		

El número de grados de libertad (gl) puede separarse de forma similar y se corresponde con la forma en que la distribución chi-cuadrado describe la suma de cuadrados asociada.

$$gl_{\text{Total}} = gl_{\text{Error}} + gl_{\text{Factores}}$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 3 de 7
		Versión 0

4. PROCEDIMIENTO

Al realizar una prueba de toxicidad, se pasan los datos correspondientes a la siguiente tabla 1

Tabla 1. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones				Yi	Yi Promedio
	1	2	3	4		

4.3. Se plantea la hipótesis nula y la hipótesis alterna

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_n$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2, \text{ para algún par}$$

4.4. El tratamiento de análisis de varianza sería mediante la siguiente tabla 2::


Tabla 2. Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
----	----	----	----	----	----

Tratamiento	SS_{TTO}	$a - 1$	$\frac{SS_{TTO}}{a - 1}$	$\frac{SS_{TTO} / a - 1}{SS_E / N - a}$	$F_{\alpha} (V_1 V_2)$
Error	SS_E	$N - a$	$\frac{SS_E}{N - a}$		
Total	SS_T	$N - 1$			

Donde:

- N: Número total de observaciones; N: a * n
- n: número de observaciones en cada grupo
- a: numero de tratamientos

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 4 de 7
<ul style="list-style-type: none"> • FV : Fuente de varianza • SS: Suma de cuadrados • GL: Grados de libertad • Ms: Cuadrados medios • Fc: F calculado • Ft: F tabulado • V_1: a – 1 • V_2: N – a <p>4.5. Para obtener el SS_{TTO}, se debe reemplazar la siguiente formula:</p> $SS_{TTO} = \sum_{i=1}^{a=5} \frac{Y_i^2}{n} - \frac{Y^2}{N}$		Versión 0

4.6. Para obtener el SS_T , se debe reemplazar la siguiente formula:

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a=5} \times \sum_{j=1}^{n=5} = Y_{ij}^2 \times \frac{Y^2}{N}$$


4.7. Para obtener el SS_E :

$$SS_E = SS_T - SS_{TTO}$$

4.7. Al obtener el F_c lo comparamos el F_t , el cual se encuentra en el libro [Diseño y análisis de experimentos Douglas C. Montgomery](#) (anexo A), para refutar o aceptar alguna hipótesis, esto se hace así:

$F_c > F_t$ Se rechaza la H_0

$F_c < F_t$ Se acepta la H_0

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 5 de 7
		Versión 0

5. EJEMPLO:

De una prueba de toxicidad que se realizo en el laboratorio, se obtuvieron los siguientes resultado:

Tabla 1. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones				Total	Porcentaje de mortalidad
	1	2	3	4		

10	5	5	5	5	20	100
5	5	5	5	5	20	100
1	4	3	4	3	14	70
0,5	1	2	1	0	4	20
0,1	0	1	0	1	2	10
Control	0	0	0	0	0	0

De la cual partimos de dos hipótesis así:

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

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

Teniendo en cuenta que tenemos:

Tratamientos:	6
Observaciones:	4
Total:	24

Podemos construir la tabla 2 del análisis de varianza de la siguiente forma:


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 6 de 7
		Versión 0

Tabla 2. Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
Tratamiento	101,83	5	20,37	244,40	2.77
Error	1,5	18	0,08		
Total	103,33	23			

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

6. BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.estadistico.com/arts.html?20011022>
- http://www.udc.es/dep/mate/estadistica2/sec3_7.html
- http://es.wikipedia.org/wiki/An%C3%A1lisis_de_varianza

Elaboro:	Alba Janneth Bernal Paredes	41012014
	Andrea Paola Rojas Avella	41001100
Primera Revisión:	Pedro Miguel Escobar Malaver	
Segunda Revisión:	Rubén Darío Londoño	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá • Colombia	LB07
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 7 de 7
		Versión 0
7. ANEXOS		
ANEXO A		

IV. Puntos porcentuales de la distribución F (continuación)

		$F_{0.10, \nu_1, \nu_2}$																			
ν_2	ν_1	Grados de libertad del numerador (ν_1)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞	
Grados de libertad del denominador (ν_2)	1	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86	60.19	60.71	61.22	61.74	62.00	62.26	62.53	62.79	63.06	63.33	
	2	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38	9.39	9.41	9.42	9.44	9.45	9.46	9.47	9.47	9.48	9.49	
	3	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24	5.23	5.22	5.20	5.18	5.18	5.17	5.16	5.15	5.14	5.13	
	4	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94	3.92	3.90	3.87	3.84	3.83	3.82	3.80	3.79	3.78	3.76	
	5	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.24	3.21	3.19	3.17	3.16	3.14	3.12	3.10	
	6	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96	2.94	2.90	2.87	2.84	2.82	2.80	2.78	2.76	2.74	2.72	
	7	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72	2.70	2.67	2.63	2.59	2.58	2.56	2.54	2.51	2.49	2.47	
	8	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.38	2.36	2.34	2.32	2.29	
	9	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44	2.42	2.38	2.34	2.30	2.28	2.25	2.23	2.21	2.18	2.16	
	10	3.29	2.92	2.73	2.61	2.52	2.46	2.41	2.38	2.35	2.32	2.28	2.24	2.20	2.18	2.16	2.13	2.11	2.08	2.06	
	11	3.23	2.86	2.66	2.54	2.45	2.39	2.34	2.30	2.27	2.25	2.21	2.17	2.12	2.10	2.08	2.05	2.03	2.00	1.97	
	12	3.18	2.81	2.61	2.48	2.39	2.33	2.28	2.24	2.21	2.19	2.15	2.10	2.06	2.04	2.01	1.99	1.96	1.93	1.90	
	13	3.14	2.76	2.56	2.43	2.35	2.28	2.23	2.20	2.16	2.14	2.10	2.05	2.01	1.98	1.96	1.93	1.90	1.88	1.85	
	14	3.10	2.73	2.52	2.39	2.31	2.24	2.19	2.15	2.12	2.10	2.05	2.01	1.96	1.94	1.91	1.89	1.86	1.83	1.80	
	15	3.07	2.70	2.49	2.36	2.27	2.21	2.16	2.12	2.09	2.06	2.02	1.97	1.92	1.90	1.87	1.85	1.82	1.79	1.76	
	16	3.05	2.67	2.46	2.33	2.24	2.18	2.13	2.09	2.06	2.03	1.99	1.94	1.89	1.87	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	
	17	3.03	2.64	2.44	2.31	2.22	2.15	2.10	2.06	2.03	2.00	1.96	1.91	1.86	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69	
	18	3.01	2.62	2.42	2.29	2.20	2.13	2.08	2.04	2.00	1.98	1.93	1.89	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69	1.66	
	19	2.99	2.61	2.40	2.27	2.18	2.11	2.06	2.02	1.98	1.96	1.91	1.86	1.81	1.79	1.76	1.73	1.70	1.67	1.63	
	20	2.97	2.59	2.38	2.25	2.16	2.09	2.04	2.00	1.96	1.94	1.89	1.84	1.79	1.77	1.74	1.71	1.68	1.64	1.61	
	21	2.96	2.57	2.36	2.23	2.14	2.08	2.02	1.98	1.95	1.92	1.87	1.83	1.78	1.75	1.72	1.69	1.66	1.62	1.59	
	22	2.95	2.56	2.35	2.22	2.13	2.06	2.01	1.97	1.93	1.90	1.86	1.81	1.76	1.73	1.70	1.67	1.64	1.60	1.57	
	23	2.94	2.55	2.34	2.21	2.11	2.05	1.99	1.96	1.92	1.89	1.84	1.80	1.74	1.72	1.69	1.66	1.62	1.59	1.55	
	24	2.93	2.54	2.33	2.19	2.10	2.04	1.98	1.94	1.91	1.88	1.83	1.78	1.73	1.70	1.67	1.64	1.61	1.57	1.53	
	25	2.92	2.53	2.32	2.18	2.09	2.02	1.97	1.93	1.89	1.87	1.82	1.77	1.72	1.69	1.66	1.63	1.59	1.56	1.52	
	26	2.91	2.52	2.31	2.17	2.08	2.01	1.96	1.92	1.88	1.86	1.81	1.76	1.71	1.68	1.65	1.61	1.58	1.54	1.50	
	27	2.90	2.51	2.30	2.17	2.07	2.00	1.95	1.91	1.87	1.85	1.80	1.75	1.70	1.67	1.64	1.60	1.57	1.53	1.49	
	28	2.89	2.50	2.29	2.16	2.06	2.00	1.94	1.90	1.87	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.63	1.59	1.56	1.52	1.48	
	29	2.89	2.50	2.28	2.15	2.06	1.99	1.93	1.89	1.86	1.83	1.78	1.73	1.68	1.65	1.62	1.58	1.55	1.51	1.47	
	30	2.88	2.49	2.28	2.14	2.03	1.98	1.93	1.88	1.85	1.82	1.77	1.72	1.67	1.64	1.61	1.57	1.54	1.50	1.46	
	40	2.84	2.44	2.23	2.09	2.00	1.93	1.87	1.83	1.79	1.76	1.71	1.66	1.61	1.57	1.54	1.51	1.47	1.42	1.38	
	60	2.79	2.39	2.18	2.04	1.95	1.87	1.82	1.77	1.74	1.71	1.66	1.60	1.54	1.51	1.48	1.44	1.40	1.35	1.29	
	120	2.75	2.35	2.13	1.99	1.90	1.82	1.77	1.72	1.68	1.65	1.60	1.55	1.48	1.45	1.41	1.37	1.32	1.26	1.19	
	∞	2.71	2.30	2.08	1.94	1.85	1.77	1.72	1.67	1.63	1.60	1.55	1.49	1.42	1.38	1.34	1.30	1.24	1.17	1.00	

Fuente: Diseño y análisis de experimentos Douglas C. Montgomery

ANEXO C

ANEXO D