Universidad de La Salle
Ciencia Unisalle

Ingeniería Ambiental y Sanitaria | Facultad de Ingeniería

1-1-2010

Determinación de la concentración letal media CL50-48 de selenio y bario mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia púlex

Claudia Johanna Morales del Rio
Universidad de La Salle, Bogotá

Laura Lizeth Contreras Rodríguez
Universidad de La Salle, Bogotá

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

Citación recomendada

Morales del Rio, C. J., & Contreras Rodríguez, L. L. (2010). Determinación de la concentración letal media CL50-48 de selenio y bario mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia púlex. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/1667

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

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DE SELENIO Y BARIO MEDIANTE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE *Daphnia púlex*

CLAUDIA JOHANNA MORALES DEL RIO
LAURA LIZETH CONTRERAS RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTA D. C.
2010

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DE SELENIO Y BARIO MEDIANTE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE *Daphnia púlex*

CLAUDIA JOHANNA MORALES DEL RIO
LAURA LIZETH CONTRERAS RODRÍGUEZ

Tesis de grado para optar al título de Ingenieras Ambientales Y Sanitarias

Director
PEDRO MIGUEL ESCOBAR MALAVER
Químico industrial
Licenciado en química y biología
Msc. Alta Gestión, Consultoría y Verificación Medio Ambiental
Msc. Residuos Urbanos e Industriales

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTA D. C.
2010

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DE SELENIO Y BARIO MEDIANTE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE *Daphnia púlex*

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Director

_____

Firma del jurado 1

_____

Firma del jurado 2

AGRADECIMIENTOS

Gracias a ti papito por todos tus esfuerzos para hacer de mi hoy una profesional, por cada uno de tus consejos que me hicieron crecer como mujer y persona, por tu lucha constante contra las adversidades y por los momentos alegres que viví junto a ti, por cada palabra que me enseñaba el significado del amor, hoy quiero darte mis más sinceros agradecimientos por dar todo por tu familia.

A ti mamita por tu fuerza interior, tu entrega absoluta y por el amor infinito que me tienes, por recorrer este camino siempre al lado mío mostrándome lo que es correcto para mi vida.

A Diego y Andrés por impulsarme cada día, por ser los mayores ejemplos en mi vida y por su compañía.

Gracias a mis amigas por los momentos lindos que vivimos durante este tiempo, por enseñarme el verdadero valor de la amistad y por su incondicionalidad.

A David por su compañía y por enseñarme a soñar.

A mi compañera Laura por toda su colaboración y entrega en este proyecto, por entender situaciones en mi vida, que la hicieron avanzar sola en este trabajo. Mil gracias lau!!

Claudia Johanna Morales del Rio

AGRADECIMIENTOS

La ocasión lo amerita, es el momento de agradecer a toda les personas que de una u otra manera ayudaron a que esto sea por fin una realidad, especialmente a mi Mami por su apoyo y confianza incondicional, porque sin ella sería imposible haber alcanzado este logro y poder seguir soñando con un futuro lleno de éxitos.

A Dios, por darme todos los medios para llevar a cabo este trabajo, por darme la sabiduría y sobre todo por darme la FORTALEZA para terminar este trabajo a pesar de las adversidades.

A mi papá, mi hermano, mi prima, porque siempre extendieron su mano para ayudarme como fuera y cuando fuera

A mi angelito del cielo ,mi "bunny" porque sé que desde allá donde está, siempre me manda su buena energía, me cuida, me ayudaba a mantener la calma y me da las fuerzas para seguir adelante.

A la ingeniera Morales "Johis", por haberme dado la oportunidad, por haber aceptado la misión y el reto de ser mi compañera de tesis (jejeje) gracias porque hacías que mis cargas fueran más livianas.

A mis amigos, a Luigi y a los de LBC, porque también fueron parte del motor que me permitía seguir adelante y recordarme que "para atrás, ni para coger impulso", Los quiero muchísimo

Laura Lizeth Contreras Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos igualmente al nuestro profesor, director y amigo, Pedro Miguel Escobar Malaver, por ser nuestro continuo apoyo y guiarnos en este camino.

Agradecemos a la Universidad de la Salle por proporcionarnos todo el conocimiento para llevara a cabo este trabajo, por ser como nuestro segundo hogar y proporcionarnos la formación como profesionales integrales para obtener ver un futuro llenos de posibilidades para lograr un exitoso futuro.

Claudia Johanna Morales del Rio y Laura Lizeth Contreras Rodríguez

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCION 16

1. OBJETIVOS 18

1.1. OBJETIVO GENERAL 18

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS 18

2. GLOSARIO 19

3. MARCO TEORICO 23

3.1. DAPHNIA PÚLEX 23

3.1.1 Selección de especie. 24

3.1.2 Hábitat 25

3.1.3 Morfología 25

3.1.4 Reproducción 27

3.1.5 Respiración. 27

3.1.6 Sistema excretor. 28

3.1.7 Ciclo de Vida 28

3.1.8 Alimentación. 28

3.1.9 Algas. 28

4. METALES PESADOS 29

4.1 Selenio (Se). 29

4.1.2 Usos 30

4.1.3 Efectos del Selenio sobre la salud 31

4.1.4 Efectos ambientales del Selenio. 32

4.2 Bario (Ba). 33

4.2.1 Usos 34

4.2.2 Efectos del Bario sobre la salud. 35

4.2.3 Efectos ambientas del Bario. 36

5. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD 37

5.1. TOXICIDAD AGUDA: 41

5.2. TOXICIDAD CRÓNICA: 41

5.3 TOXICIDAD SUBAGUDA: 41

5.4 BIOACUMULACIÓN: 41

6.1 Condiciones bióticas. 42

6.2 Condiciones abióticas. 42

6.2.1 Temperatura. 43

6.2.2 Oxígeno Disuelto (OD). 43

6.2.3 Concentración de hidrógeno – pH. 44

6.2.4 Dureza. 44

7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TOXICIDAD 45

7.1 DISEÑOS DE EXPERIMENTOS. 45

7.1.1 Diseño experimental. 46

7.1.2 Establecimiento de una relación dosis-respuesta 47

7.1.3 Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad. 47

7.1.4 Análisis de varianzas ANOVA 51

8. MATERIALES Y METODOS 52

8.1 REACTIVOS 53

8.2 PROCEDIMIENTO 53

8.2.1 Variable independiente 53

8.2.2 Variable dependiente 53

8.2.3 Constantes 54

8.3 FASE 1: FASE DE MANTENIMIENTO DEL CULTIVO 54

8.3.1 AGUA RECONSTITUIDA (AGUA DE DILUSION) 55

8.3.2 PREPARACION MEDIO BRISTOL 57

8.3.3 CULTIVO DE LOS ORGANISMOS Daphnia púlex 64

8.4 FASE 2: PRUEBAS DE TOXICIDAD. 65

8.4.1 Preparación de soluciones. 65

8.4.2 Montaje de las pruebas de toxicológicas. 65

8.4.3 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$) 66

8.4.4 PRUEBAS PRELIMINARES (SCREENING TEST) 70

8.4.5 PRUEBAS DEFINITIVAS 75

8.4.6 Pruebas preliminares de toxicidad con Bario: 80

8.5 ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS 86

8.6 EFLUENTE EVALUADO 86

8.6.1 Pruebas definitivas con el vertimiento. 89

8.6.2 Calculo de la CL50 en el vertimiento. 90

8.6.3 Análisis de varianza ANOVA. 91

Fuente. Las autoras 92

8.7 OBTENCION DEL INDICE TOXICOLOGICO Y CLASIFICACION DEL VERTIMIENTO 92

8.7.1 Cálculo de la carga tóxica. 92

8.7.2 Calculo del índice toxicológico del efluente. 93

9. FASE 3. ANALISIS DE RESULTADOS 94

10. CONCLUSIONES 96

11. BIBLIOGRAFIA 98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características del Selenio 25
Tabla 2. Características del Bario 30
Tabla 3. Sensibilidad del cultivo de *Daphnia púlex* 65
Tabla 4. Especificaciones de las soluciones de pruebas preliminares con Selenio 69
Tabla 5. Resultados de mortalidad de organismos en pruebas preliminares con Selenio 70
Tabla 6. Especificaciones de las soluciones de pruebas definitivas con Selenio 72
Tabla 7. Concentración letal media de Selenio 74
Tabla 8.Mortalidad de especies en la prueba 6 75
Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA de la prueba 6. 76
Tabla 10. Resultados del análisis ANOVA de las 10 pruebas definitivas. 76
Tabla 11. Especificaciones de las soluciones de pruebas preliminares con Bario. 77
Tabla 12. Resultados de mortalidad de organismos en pruebas preliminares con Bario. 78
Tabla 13. Especificaciones de las soluciones de pruebas definitivas con Bario 79
Tabla 14. Concentración letal media de Bario 80
Tabla 15. Mortalidad de especies en la prueba 3. 81
Tabla 16. Resultados del análisis ANOVA de la prueba 3. 81
Tabla 17. Resultados del análisis ANOVA de las 10 pruebas definitivas. 82
Tabla 18. Concentración letal media del vertimiento. 86
Tabla 19. Resultados del análisis ANOVA de las 5 pruebas definitivas. 87
Tabla 20. Clasificación de efluentes a partir del índice toxicológico 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la *Daphnia púlex* 20
Figura 2. Vista en microscopio del alga *Selenastrum Capricornutum* 24
Figura 3 .Equipo medidor de dureza. 40
Figura 4. Determinación de CL50/CE50/CI50 para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones. 44
Figura 5. Cultivo 50
Figura 6. Acuario con agua reconstituida 51
Figura 7. Conteo celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer. ... 55
Figura 8. Suspensión de *Selenastrum capricornutum*, ... 56
Figura 9. Conteo de algas en la cámara de Neubauer 57
Figura 10. Batería de ensayo 61
Figura 11. Soluciones de dicromato de potasio 62
Figura 12. Prueba de sensibilidad con Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 65
Figura 13 .Preparación de las soluciones 67
Figura 14 .Batería de ensayo 71
Figura 15. Preparación de las soluciones de Selenio 72
Figura 16. Concentración letal media de Selenio 74
Figura 17. Concentración letal media de Bario 80
Figura 18. Preparación del vertimiento sintético 84
Figura 19 . Material para medición de parámetros 85
Figura 20. Vertimiento domestico 86
Figura 21. Pruebas de toxicidad con el vertimiento sintético 87

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.Clases de bioensayos .....
Cuadro 2. Especificaciones para preparación de agua reconstituida 51
Cuadro 3. Especificaciones para preparación del medio Bristol 52

RESUMEN

Neonatos de *Daphnia púlex* de una cepa obtenida partir de hembras, fueron sometidos a tratamientos con concentraciones agudas (0.3 , 0.5, 0.7, 1.0, y 1.5 ppm de Selenio y 10, 20, 30, 40 y 50 ppm de Bario) durante 48 horas, con el objeto de establecer la concentración letal media (CL_{48}^{50}) de cada uno de estos metales pesados.

El pH, la temperatura del agua, el oxígeno disuelto, la dureza variaron en rangos estrechos y se mantuvieron en niveles aceptables para los ensayos de toxicidad. Para las 48 horas de exposición se calculó una CL_{48}^{50} de 0,7821 mg/l para Selenio y de 29,5568 mg/l para Bario y un intervalo de confianza de 95%.

Para determinar la precisión y exactitud intralaboratorio (Laboratorio de bioensayos, Universidad de la Salle) alcanzadas en la ejecución del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia púlex* mediante la determinación de la inhibición de la movilidad (mortalidad) se utilizó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia.
La calibración fue realizada con concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 ppm de dicromato de potasio, dando como resultado el siguiente rango de sensibilidad 0.15244mg/l como límite inferior, 0.23757mg/l como límite superior y una CL_{48}^{50} de 0.1911mg/l

Palabras clave: Bioensayos, *Daphnia púlex*

ABSTRACT

The objective of this research is to determine the lethal median concentration of Selenium and Barium by aquatic toxicity tests using the microcrustacean *Daphnia púlex*, better known and flea water.

The neonates of *Daphnia púlex* are a strain produced from females. These neonates were subjected to an acute concentration (.3, 0.5, 0.7, 1.0, y 1.5 ppm the Selenium y 10, 20, 30, 40 y 50 ppm the Barium) for 48 hours, in order to establish the lethal median (CL_{48}^{50}) concentration of each of these heavy metals.

The pH, water temperature, dissolved oxygen, and water hardness all varied within narrow ranges and were maintained at acceptable levels during the toxicity tests for 48 hours exposed.
They were calculated at (CL_{48}^{50}) at 0,7821mg/l for Selenium and at 29,5568 mg/l for Barium at a confidence interval of 95%

To determine the precision and accuracy of the acute toxicity tests implemented in the laboratory with Daphnia Pulex, the reference toxicant dichromate potassium was used to determine the inhibition of mobility (mortality)
The calibration was performed with concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.5 ppm the potassium dichromate, resulting in the following range of sensibility 0.15244mg/l with an upper limit of 0.23757mg/l and a lower limit CL_{48}^{50} of 0.1911mg/l.

INTRODUCCION

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres (Larrain 1995). Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio[1].

Uno de los organismos más corrientemente usados en bioensayos acuáticos es la pulga de agua, un crustáceo cladócero particularmente sensible a numerosos compuestos químicos (Mayer & Ellersieck 1986), el interés de estudiar esta especie surge además del hecho de que constituye un nivel trófico fundamental en las comunidades acuáticas y de su extraordinaria capacidad de colonizar ambientes altamente fluctuantes que son limitantes para otras especies.
Las pulgas de agua son ampliamente utilizadas en el área de la ecotoxicología, desde hace ya algún tiempo atrás, como indicadores de toxicidad, tanto de residuos como de substancias potencialmente tóxicas. Destacan los estudios sobre los efectos citotóxicos que tienen los herbicidas en *D. jmlex* (US EPA 1972, Schober y Lampert 1976, 1977, Schultz y Kennedy 1976), así como aquéllos

[1] SILVA Jeannette, TORREJÓN Guillermo, BAY-SCHMITH Enrique & LARRAIN Alberto. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con Daphnia pulex (crustáceo: cladócera) usando un toxico de referencia. Gayana 67(1): 87-96, 2003. Disponible en Internet: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-65382003000100011&script=sci_arttext [citado 19 de enero de 2010].

producidos por aguas residuales industriales y urbanas de muy diversos tipos (Walsh *et* al. 1980,1982)[2].

El presente trabajo presenta los resultados de la concentración letal CL_{48}^{50} de un vertimiento sintético que simula las condiciones de una industria tipo donde se utilizan Selenio y Bario en su proceso productivo, de tal manera se logra encontrar el índice toxicológico con el cual se clasifica el efluente según su carga toxica en: despreciable, reducida, moderada, considerable o elevada.

[2]Amparo VAZQUEZ, Eduardos SOLIS, Norma MACEDO e Irma ROSAS. Influencia de la calidad del agua sobre la ocurrencia de Daphnia *púlex* en la presa Jose Antonio Alzate y algunos aspectos de su pesquería. Contam. Ambient. 2, 39-56, 1986.
Disponible en internet:http://www.atmosfera.unam.mx/editorial/contaminacion/acervo/vol_2_1/4.pdf [citado 19 de enero de 2010].

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} de Selenio y Bario, mediante Bioensayos de Toxicidad sobre el organismo acuático *Daphnia púlex*

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la sensibilidad de la *Daphnia púlex* mediante su exposición a dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).

- Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} de Selenio y Bario sobre *Daphnia púlex* en soluciones puras de estos elementos.

- Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} de Selenio y Bario sobre *Daphnia púlex* en el vertimiento de la industria tipo.

- Obtener el índice de efecto toxicológico potencial de la industria tipo en la que se encuentre presente el Selenio y el Bario en sus vertimiento

2. GLOSARIO

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

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

- **AGUA DESTILADA:** es el agua que ha sido tratado para remover los iones de la solución para obtener una conductividad menor o igual a 2 µmhos/cm.

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

- **BIOENSAYOS ACUÁTICOS:** es un método para determinar y evaluar las concentraciones y los efectos tóxicos potenciales que causa un compuesto específico sobre un organismo vivo, mediante la exposición controlada a sustancias puras o combinadas, vertimientos (industriales, municipales y agrícolas) y cuerpos de agua.

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

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

- **CARTA CONTROL:** es un 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 la fecha del ensayo, y en el eje Y, la concentración tóxica efectiva. Se toman como límite de alerta dos desviaciones estándar de la media histórica de la concentración letal media.

- **CONCENTRACIÓN LETAL (CL)**: es la concentración de una sustancia (pura o combinada), o efluente que produce la muerte del organismo.

- **CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50):** es la concentración de la sustancia de interés, cuyo efecto tóxico potencial desea ser evaluado, que produce una tasa de mortalidad del 50% de los organismos vivos bajo las condiciones de operación de un bioensayo. Este valor es determinado estadísticamente a partir de los porcentajes de mortalidad obtenidos de la lectura final del bioensayo.

- ***Daphnia púlex* (cladóceros):** crustáceos pequeños, representantes de un eslabón intermedio importante en la cadena alimenticia de productores primarios y peces, sensibles a las sustancias tóxicas presentes en los cuerpos de agua.

- **DILUCIÓN:** disolver cualquier sustancia (compuestos químico o no) en un líquido el cual debe cumplir ciertas características.

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

- **DUREZA:** medida de la concentración de iones de calcio y magnesio en el agua, expresada como mg/l de carbonato de calcio.

- **EFIPIOS:** cápsula protectora, la cual se encuentra en la cámara incubadora de las *Daphnia púlex*, engrosando sus paredes, en ella se desarrollan los machos de esta especie, cuando cambian las condiciones favorables del ambiente o el cultivo. Su característica principal es su color oscuro y se observan dos huevos grandes.

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

- **METALES PESADOS:** Son componentes naturales de la corteza de tierra. No pueden ser degradados o ser destruidos. En un grado pequeño se incorporan a nuestros cuerpos vía alimento, agua potable y el aire. Son peligrosos porque tienden a bioacumularsen.

- **PARTENOGÉNESIS:** forma y/o modo de reproducción asexual por hembras no fecundadas, la cual se presenta en ciertos animales y plantas.

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

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

- **TIEMPO DE EXPOSICIÓN:** es el período al que se someten los organismos a las soluciones de prueba en un bioensayo de toxicidad.

- **TOXICIDAD:** la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano.

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

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

- **TOXICOLOGÍA ACUÁTICA:** es el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos adversos producidos por productos químicos y materiales antropogénicos sobre los organismos acuáticos.
- **TOXICOLOGÍA:** la toxicología es la ciencia que estudia los efectos nocivos producidos por las sustancias químicas sobre los organismos vivos. Así, el individuo humano, los animales y las plantas pueden estar expuestos a una gran variedad de sustancias químicas. Éstas pueden ser desde metales y sustancias inorgánicas hasta moléculas orgánicas muy complejas.

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

- **XENOBIÓTICOS:** "Sustancias extrañas", es decir, extrañas al organismo. Lo contrario son los compuestos endógenos. Entre los xenobióticos figuran los fármacos, las sustancias químicas industriales, los venenos presentes en la naturaleza y los contaminantes del medio ambiente.

3. MARCO TEORICO

3.1. DAPHNIA PÚLEX

En general las *Daphnias* son micro crustáceos de agua dulce que habitan en aguas estancadas o de movimiento muy ligero. También ha sido localizada en las proximidades de lagos y lagunas de agua salobre. Por su forma de natación se las

conoce como "Pulgas de Agua". Las pulgas de agua como *Daphnia púlex*, son parte integral de los consumidores primarios de los sistemas acuáticos, participa en el movimiento de sustancias y energía, obteniendo ésta por transformación de materia orgánica, especialmente de organismos vivos. Este organismo planctónico se apodera de otros más pequeños y sirve de alimento de muchos animales más grandes como los peces por tanto es fuente de alimento de consumidores secundarios, es decir, sirve de puente en la cadena trófica entre un productor y un consumidor.

3.1.1 Selección de especie. Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género Daphnia son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad, entre las características que han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad en muchos países encontramos:

- ✓ La amplia distribución geográfica
- ✓ El importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica,
- ✓ La facilidad de cultivo en el laboratorio,
- ✓ La reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y
- ✓ El corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías,
- ✓ Amplia sensibilidad a sustancias toxicas, en algún caso mayor a la de los peces.
- ✓ Los requerimientos para su cultivo no son muchos ni costosos
- ✓ Dado su tamaño pequeño, requiere de poca agua comparada con el cultivo de peces.

3.1.2 Hábitat. La *Daphnia púlex* es un organismo que se encuentra en territorio colombiano en cuerpos de agua y escorrentías clasificadas como aguas blandas (dureza 0-75 mg/l CaCO3).

Estos crustáceos filtradores son principalmente de agua dulce, reservorios artificiales, charcos temporales. Son abundantes en ambientes con alta concentración de materia orgánica en donde proliferan bacterias, levaduras y microalgas[3], igualmente las concentraciones más altas de las poblaciones viven como plancton en el agua abierta de los lagos, por ejemplo el Lago de Tota, Boyacá; y el Embalse de la Fe (El Retiro, Boyacá) aguas superficiales y charcas.

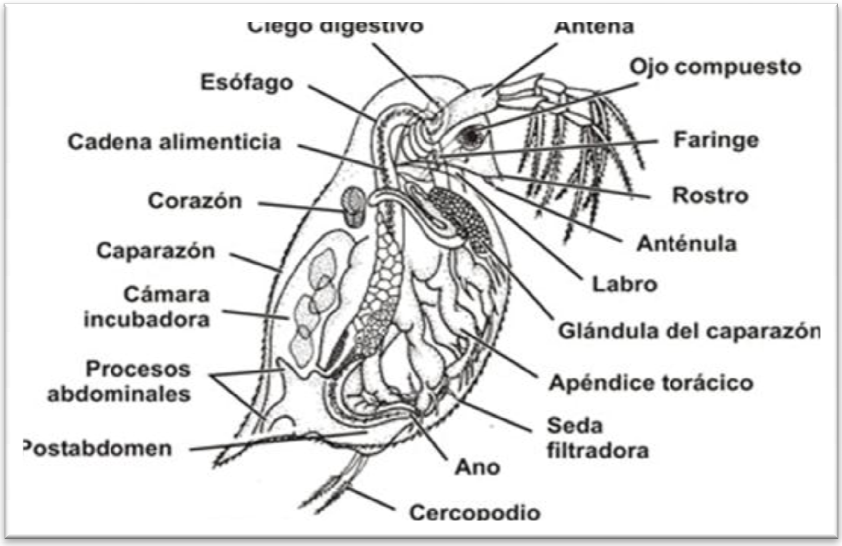
3.1.3 Morfología[4]. Estos organismos se caracterizan por poseer un cuerpo comprimido lateralmente y ovalado, no se distinguen segmentos como en otros crustáceos. Presentan dimorfismo sexual marcado, la hembra es más grande que el macho. Presenta un caparazón de quitina transparente, las antenas o apéndices con numerosas setas, ojos compuestos y simples (ojo nauplio), una cavidad embriónica con huevo y embriones situados en la parte dorsal, entre el caparazón y el dorso del cuerpo.

Figura 1. Morfología de la *Daphnia púlex*

[3] TORRENTERA BLANCO Laura, J. TACON Albert G. La produccion de alimento vivo y su importancia en acuacultura una diagnosis, Brasília, Brasil, Abril, 1989.

Disponible en http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S06.htm#chVI

[4] DIAZ Maria Consuelo, BUSTOS Martha Cristina y ESPINOSA Adriana Janneth. Pruebas de toxicidad acúatica: Fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia. Pag 37



Fuente: http://www.caudata.org/daphnia/images/daphnia_dia.jpg

La cabeza se proyecta ventralmente y a ella se articulan un par de antena birrámeas que se utilizan para la natación. En general las mudas ocurren de manera simultánea con la liberación de las crías o los efipios. La *Daphnia* es un organismo filtrador y utiliza los apéndices torácicos (5 pares) para esta función, las cerdas de estos apéndices actúan como tamices para la filtración de algas, bacterias y partículas finas (>30um).

A nivel de la cabeza se localiza un ojo compuesto grande y un ocelo pequeño, estos ojos son sensibles a cambios en la calidad y cantidad de luz así como a la polarización. Los ovarios se localizan a cada lado del intestino; bajo condiciones ambientales favorables, las hembras alcanzan la madurez reproductiva a los diez o doce días de nacidas. En general los machos se diferencian por tener un menor tamaño, las antenas son mas largas, el postabdomen esta modificado y presenta un par de patas con garfios que son utilizados para la unión con la hembra durante la copulación. El crecimiento individual de los *Daphnidos* ocurre rápida e inmediatamente después de la muda. La tasa de crecimiento es más alta al comienzo y disminuye hacia el final del ciclo de vida; en este se puede diferenciar cuatro etapas: 1) huevo, 2) neonato, 3) juvenil y 4) adulto.

El huevo se desarrolla completamente en la cámara de incubación; los neonatos corresponden a individuos inmaduros recién liberados, la etapa de juveniles hasta el momento de desarrollo de los primeros huevos en el ovario y el adulto, a partir del momento en donde se libera la primera camada.

3.1.4 Reproducción[5]. La reproducción asexual, que se realiza mediante partenogénesis (desarrollo de huevos sin fecundación previa que generan nuevas hembras), se presenta principalmente cuando las condiciones de desarrollo son las adecuadas, por ejemplo: condiciones favorables de alimentación, baja densidad poblacional, y los principales factores ambientales y de calidad química del agua sean los adecuados. Cuando alguno o algunos de estos factores se tornan adversos, entonces parte de la progenie estará constituida por machos que al crecer pueden dar lugar a la reproducción sexual al fecundar a las hembras, dando como consecuencia la formación de una estructura de resistencia conocida como efipio. Los efipios son cuerpos oscuros con paredes gruesas que poseen dos huevos de tamaño mayor al de los huevos partenogenéticos; presentan una gran cantidad de material de reserva que les permite soportar condiciones de sequias, anoxia, bajas temperaturas, etc. Cuando las condiciones mejoran los huevos se desarrollan y forman nuevas hembras diploides cuya composición genética será diferente a la de los progenitores.

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

[5] MARTINEZ Felipe Fernando. Ensayo de toxicidad aguada con cladóceros de la familia Daphnidae. Disponible en: http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap7.pdf Pag 101

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

3.1.7 Ciclo de Vida. Generalmente, el ciclo se incrementa cuando la temperatura decrece debido a la disminución en la actividad metabólica. El ciclo de vida de *Daphnia púlex* a 20oC es de 50 días.

Daphnia púlex posee 3 a 4 instares juveniles, donde cada instar es terminado por una muda, de esta forma, el crecimiento ocurre inmediatamente después de cada muda, hasta que el nuevo caparazón deja de ser elástico.

Daphnia púlex tiene de 18 a 25 instares adultos. Generalmente, la duración de los instares aumenta con la edad, pero también de las condiciones ambientales.

3.1.8 Alimentación. Son normalmente fitófagos, alimentándose por filtración. Filtran continuamente el agua en la cual viven, deteniendo las partículas suspendidas en ésta a través de sedas situadas en los apéndices toráxicos; el tamaño promedio de las partículas ingeridas se sitúa entre 0,5 y 50 µm. Mediante diversos mecanismos de gran complejidad, las corrientes de alimento pasan al interior de una cámara sencilla precedente de la dirección anteroventral; esta cámara está cerrada dorsalmente por la pared del cuerpo, lateralmente por las valvas y los cinco pares del tronco y centralmente por el tercer y cuarto par de los mismos cuando se encuentran juntos. El primer y segundo par de apéndices crean una corriente de agua y así, un movimiento de partículas suspendidas; el quinto par se encarga de la succión del agua, mientras el tercer y cuarto para realizar la filtración de las partículas.

3.1.9 Algas. Dentro de las algas verdes, la especie más utilizada es *Selenastrum capricornutum*, cuyo nombre fue cambiado recientemente a *Pseudokirchneriella*

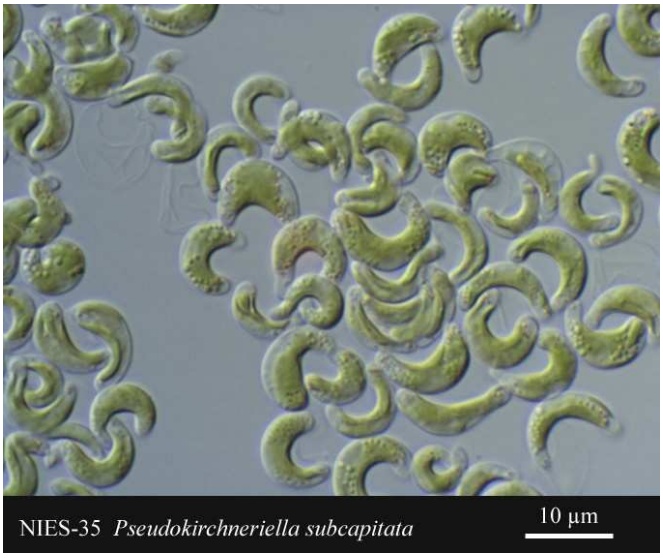
subcapitata (OECD, 2002); esta alga es unicelular y se ha usado de manera extensa en bioensayos; es apropiada como alimento para invertebrados tales como *Daphnia*, por lo cual tiene doble propósito en el laboratorio. Son utilizadas como alimento para la *Daphnia púlex*, tres especies significativas:

Selenastrum Capricornutum

Scenedesmus Quadricauda

Scenedesmus acutus

Figura 1. Vista en microscopio del alga *Selenastrum Capricornutum*



Fuente. http://mcc.nies.go.jp/images/100images/nies-0035.jpg

4. METALES PESADOS

4.1 Selenio (Se)[6]. Es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre, encontrándose en forma de seleniuros de elementos pesados y, en menor cantidad, como elemento libre en asociación con azufre elemental. Los minerales de sulfuro de cobre seleníferos son los que representan la fuente primaria. Es un metaloide parecido al azufre que a temperatura ambiente se presenta como una

[6] http://www.lenntech.es/periodica/elementos/se.htm#ixzz0lUCQ9jey

sustancia sólida, insoluble en agua y en solventes orgánicos. Existe en tres formas: como polvo amorfo rojo, como un cristal semiconductor gris y como cristal rojo.

El Selenio arde en el aire con una flama azul para dar dióxido de Selenio, SeO_2. El elemento también reacciona directamente con diversos metales y no metales, entre ellos el hidrógeno y los halógenos. El ácido nítrico, el ácido sulfúrico concentrado y los hidróxidos alcalinos fuertes lo disuelven.

El único compuesto importante del Selenio con hidrógeno es el seleniuro de hidrógeno, H_2Se, disuelto en agua, el seleniuro de hidrógeno puede precipitar muchos iones de metales pesados como seleniuros muy poco solubles.

Tabla 1. Características del Selenio

Nombre	Selenio
Numero atómico	34
Valencia	+2,-2,4,6
Estado de oxidaxion	-2
Masa atómica (g/mol)	78.96
Punto de ebullición (℃)	685
Punto de fusión (℃)	217

Fuente: http://www.lenntech.es/periodica/elementos/se.htm#ixzz0lUCQ9jey

4.1.2 Usos. A continuación se mencionan los usos más comunes a nivel industrial del Selenio

- Industria electrónica: fabricación de semiconductores y células fotoeléctricas.
- Fabricación de vidrio: como decolorante y pigmento.
- Pigmento en plásticos, pinturas, barnices, vidrio y cerámica y tintas|
- Metalúrgica: tratamiento de superficies, que mejora la capacidad de ciertos aceros para ser maquinados.
- En la fabricación de caucho: como acelerador de la vulcanización.
- Química: catalizador, aditivo de aceites lubricantes, fabricación de pigmentos y fitosanitarios, etc.

- Usado en el proceso de fotocopiado xerográfico
- Es subproducto de la industria del cobre

4.1.3 Efectos del Selenio sobre la salud[7]. La exposición al Selenio tiene lugar principalmente a través de la comida, porque el Selenio está presente naturalmente en los cereales y la carne. La toma de Selenio a través de la comida puede ser más elevada de lo normal en muchos casos, porque en el pasado se aplicaron muchos fertilizantes ricos en Selenio en los cultivos

Las personas que viven cerca de lugares donde hay residuos peligrosos experimentarán una mayor exposición a través del suelo y del aire. El Selenio procedente de cultivos y de lugares donde hay residuos peligrosos acabará en las aguas subterráneas o superficiales por irrigación. Este fenómeno hace que el Selenio acabe en el agua potable local, de forma que la exposición al Selenio a través del agua aumentará temporalmente.

Las personas que trabajan en las industrias del metal, industrias recuperadoras de Selenio e industrias de pintura también tienden a experimentar una mayor exposición al Selenio, principalmente a través de la respiración. El Selenio es liberado al aire a través de la combustión de carbón y aceite.

Cuando la toma de Selenio es demasiado grande es probable que se presenten efectos sobre la salud. La gravedad de estos efectos depende de las concentraciones de Selenio en la comida y de la frecuencia con que se tome esa comida.

Los efectos sobre la salud de las diversas formas del Selenio pueden variar de pelo quebradizo y uñas deformadas, a sarpullidos, calor, hinchamiento de la piel y

[7] Ibid Pág 23.

dolores agudos. Cuando el Selenio acaba en los ojos las personas experimentan quemaduras, irritación y lagrimeo.
El envenenamiento por Selenio puede volverse tan agudo en algunos casos que puede incluso causar la muerte.

Algunos síntomas de intoxicación pueden ser:
-Mal aliento,bronquitis,neumonía,asma bronquial,náuseas,escalofríos,fiebre,dolor de cabeza, dolor de garganta,falta de aliento, conjuntivitis, dolores abdominales, diarrea y agrandamiento del hígado.El Selenio es irritante y sensibilizador de los ojos y del sistema respiratorio superior, manchas rojas en las uñas, dientes y pelo.
-El dióxido de Selenio reacciona con la humedad para formar ácido selénico, que es corrosivo para la piel y ojos.
Carcinogenicidad: La Agencia Internacional de la Investigación del Cáncer (IARC) ha incluido al Selenio dentro del grupo 3 (el agente no es clasificable en relación a su carcinogenicidad en humanos.).

4.1.4 Efectos ambientales del Selenio[8]. El Selenio se presenta naturalmente en el medio ambiente. Es liberado tanto a través de procesos naturales como de actividades humanas. En su forma natural el Selenio como elemento no puede ser creado ni destruido, pero tiene la capacidad de cambiar de forma.

Bajos niveles de Selenio pueden terminar en suelos o agua a través de la erosión de las rocas. Será entonces tomado por las plantas o acabará en el aire cuando es absorbido en finas partículas de polvo. Es más probable que el Selenio entre en el aire a través de la combustión de carbón y aceite, en forma de dióxido de Selenio. Esta sustancia será transformada en ácido de Selenio en el agua o el sudor.
Cuando el Selenio en los suelos no reacciona con el oxígeno permanece bastante inmóvil. El Selenio que es inmóvil y no se disuelve en el agua representa menor riesgo para los organismos. Los niveles de oxígeno en el aire y la acidez del suelo

[8] Ibid pág.23

aumentarán las formas móviles del Selenio. Las actividades humanas tales como los procesos industriales y agrícolas incrementan los niveles de oxígeno y la acidez de los suelos.

Cuando el Selenio es más móvil, las probabilidades de exposición a sus componentes aumentarán considerablemente. La temperatura del suelo, la humedad, las concentraciones de Selenio soluble en agua, la estación del año, el contenido en materia orgánica y la actividad microbiana determinarán la rapidez con la que el Selenio se mueve a través del suelo. En otras palabras, estos factores determinan su movilidad.

La agricultura puede no solo incrementar el contenido de Selenio en el suelo; también puede aumentar las concentraciones de Selenio en las aguas superficiales, ya que las aguas de drenaje de irrigación portan Selenio.

El comportamiento del Selenio en el medio ambiente depende fuertemente de sus interacciones con otros componentes y de las condiciones medio ambientales en el lugar en concreto y a una hora concreta.

Existe evidencia de que el Selenio puede acumularse en los tejidos corporales de los organismos y puede ser transportada en la cadena alimenticia hacia niveles superiores. Normalmente esta biomagnificación de Selenio comienza cuando los animales ingieren muchas plantas que han estado absorbiendo enormes cantidades de Selenio, antes de la ingestión. Debido a la irrigación, las concentraciones de Selenio en la escorrentía tienden a ser muy altas en organismos acuáticos en muchas zonas.

Cuando los animales absorben o acumulan concentraciones de Selenio extremadamente grandes, puede causar fallo reproductivo y defectos de nacimiento.

4.2 Bario (Ba)[9]. El Bario ocupa el decimoctavo lugar en abundancia en la corteza terrestre, en donde se encuentra en un 0.04%, valor intermedio entre el calcio y el

[9] http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm#ixzz0lUUUjMkH

estroncio, los otros metales alcalinotérreos. Los compuestos de Bario se obtienen de la minería y por conversión de dos minerales de Bario. La barita, o sulfato de Bario, es el principal mineral y contiene 65.79% de óxido de Bario.

El metal se utiliza en aleaciones Bario-niquel para alambres de bujía (el Bario incrementa la capacidad de emisión de la aleación)

El metal reacciona con el agua más fácilmente que el estroncio y el calcio, pero menos que el sodio; se oxida con rapidez al aire y forma una película protectora que evita que siga la reacción, pero en aire húmedo puede inflamarse. El metal es lo bastante activo químicamente para reaccionar con la mayor parte de los no metales.

El lipoton, un polvo blanco que consta de 20% de sulfato de Bario, 30% de sulfuro de zinc y menos del 3% de óxido de zinc, se emplea en forma amplia como pigmento en pinturas blancas. El blanco fijo se emplea en la manufactura de colorantes brillantes. Es el mejor grado de sulfato de Bario para pigmento en pinturas.

Tabla 2. Características del Bario

Nombre	Bario
Numero atómico	56
Valencia	2
Estado de oxidación	+2
Masa atómica (g/mol)	137.34
Punto de ebullición (℃)	1640
Punto de fusión (℃)	714

Fuente. http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm#ixzz0lUUUjMkH

4.2.1 Usos: A continuación se mencionan los usos más comunes a nivel industrial del Bario.

- A causa de la gran absorción de rayos X por el Bario, el sulfato sirve para cubrir el tubo digestivo en radiografía, para aumentar el contraste.

- El carbonato de Bario es útil en la industria de la cerámica para prevenir la eflorescencia en arcillas para loza.
- Se usa también como vidriado en alfarería, en vidrio óptico
- Como veneno para ratas.
- El cloruro de Bario se emplea en la purificación de sal,
- En la manufactura de cloruro e hidróxido de sodio, como fundente en aleaciones de magnesio,
- Como ablandador de agua de calderas
- En preparaciones medicinales.
- El nitrato de Bario, llamado también salitre de barita, se utiliza en pirotecnia y señales luminosas (produce color verde) y un poco menos en preparaciones medicinales.
- El óxido de Bario, conocido como barita, o barita calcinada, se utiliza como agente de secado en la industria y en el endurecimiento de aceros.
- El peróxido de Bario se emplea en ocasiones como agente blanqueador.
- El cromato de Bario, cromo limón o amarillo cromo, se emplea en pigmentos amarillos y fósforos de seguridad.
- El clorato de Bario se utiliza en pirotecnia.
- El acetato y cianuro de Bario su usan en la industria como reactivo químico y en metalurgia, respectivamente.
- Los compuestos del Bario son usados por las industrias del aceite y gas para hacer lubricantes para taladros.
- Los compuestos del Bario son también usados para hacer pinturas, vidrio y gomas.

4.2.2 Efectos del Bario sobre la salud[10]. De forma natural los niveles de Bario en el medio ambiente son muy bajos. Altas cantidades de Bario pueden sólo ser encontradas en suelos y en comida, como son los frutos secos, algas, pescados y

[10] Ibid pág 27

ciertas plantas. La cantidad de Bario que es detectada en la comida y en agua generalmente no es suficientemente alta como para llegar a ser concerniente a la salud. La gente con un gran riesgo a la exposición del Bario con efectos adicionales sobre la salud son los que trabajan en la industria del Bario. Los mayores riesgos para la salud que ellos pueden sufrir son causado por respirar aire que contiene sulfato de Bario o Carbonato de Bario.

Muchos vertederos de residuos peligrosos contienen ciertas cantidades de Bario. La gente que vive cerca de ellos posiblemente están expuestos a niveles dañinos. La exposición podrá entonces ser causada por respirar polvo, comer tierra o plantas, o beber agua que está contaminada con Bario. Por contacto en la piel puede también ocurrir.

Los efectos sobre la salud del Bario dependen de la solubilidad de los compuestos. La toma de gran cantidad de Bario que es soluble puede causar parálisis y en algunos casos incluso la muerte.

Pequeñas cantidades de Bario soluble en agua puede causar en las personas:

Dificultad al respirar,Incremento de la presión sanguínea,arritmia, Dolor de estómago,debilidad en los músculos, cambios en los reflejos nerviosos, inflamación del cerebro y el hígado, daño en los riñones y el corazón.

No se ha demostrado que el Bario cause cáncer en los humanos. No hay prueba de que el Bario pueda causar infertilidad o defectos de nacimiento.

4.2.3 Efectos ambientas del Bario[11]. El Bario es un metal plateado-blancuzco que puede ser encontrado en el medioambiente, donde existe de forma natural. Aparece combinado con otros elementos químicos, como el azufre, carbón u oxígeno.

Debido al uso extensivo del Bario en las industrias, el Bario ha sido liberado al ambiente en grandes cantidades. Como resultado las concentraciones de Bario en

[11] Ibid pág 27

el aire, agua y suelo pueden ser mayores que las concentraciones que ocurren de forma natural en muchos lugares.

El Bario es liberado al aire por las minas, proceso de refinado, y durante la producción de compuestos de Bario. Puede entrar también al aire durante la combustión del carbón y aceites.

Algunos compuestos del Bario que son liberados durante procesos industriales se disuelven fácilmente en agua y son encontrados en lagos, ríos y arroyos.

Debido a sus solubilidades estos compuestos del Bario pueden alcanzar largas distancias desde sus puntos de emisión. Cuando peces y otros organismos acuáticos absorben los compuestos del Bario, el Bario se acumulará en sus cuerpos. Los compuestos del Bario que son persistentes usualmente permanecen en la superficie del suelo, o en el sedimento de las aguas. El Bario es encontrado en la mayoría de los suelos en bajos niveles. Estos niveles pueden ser más altos en vertederos de residuos peligrosos.

5. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD[12]

Los ensayos de toxicidad están definidos con el objeto de evaluar y reconocer la reacción que puede producir sobre organismos vivos una sustancia toxica en un periodo determinado, permitiendo establecer la respuesta de un organismo (miembro de un ecosistema presente en cualquier recurso) a cambios específicos en su hábitat, lo que hace de este método una opción para determinar los limites de tolerancia a diferentes sustancias de interés sanitario y evaluar los efectos

[12] SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA,RAMIREZ Patricia, MENDOZA Cantú Ania. “Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en Mexico” Enero 2008.
Disponible en: http://relascmex.files.wordpress.com/2009/09/ensayos-toxicologicos-para-la-evaluacion-de-sustancias-quimicas-en-agua-y-suelo-la-experiencia-en-mexico.pdf

potenciales e impactos en los cuerpos de agua, biota acuática y ecosistemas presentes.

Son herramientas que se utilizan en ecotoxicología a través de mediciones experimentales en condiciones controladas en laboratorio, cuya finalidad primordial es establecer la concentración en la cual un contamínate dado produce efectos tóxicos en organismos vivos, y determinar la relación dosis – respuesta. Esta se puede manifestar con la muerte, inmovilización, pérdida del equilibrio, deterioro de la facultad de reproducción, de desarrollo o natatoria, cambios histológicos o bioquímicos, etc, dependiendo de las características del bioensayo y del ciclo de vida del organismos que se esté utilizando en el.

Existen ciertas características de los ensayos de toxicidad con organismos. Según la EPA (1999), son:

- Suministran información sobre los posibles efectos y probable deterioro de los ecosistemas acuáticos.
- Su predicción es alta cuando en el ambiente acuático existen descargas con altas magnitudes de toxicidad.
- Se han encontrado concentraciones confiables para muchas sustancias altamente toxicas que causan efectos de bioacumulación en ecosistemas acuáticos.
- Proveen resultados confiables por estar altamente estandarizados con alta calidad y especifica, controles, replicas y comparaciones con otros bioensayos.
- Proporcionan una anticipada señal de alerta para minimizar impactos negativos y tomar medidas sobre ella.
- Al ser interpretados en forma rápida y a corto plazo, permiten la acumulación de dosis – respuesta, caracterizando las aguas residuales o sistemas ambientales.

Al encontrar la relación dosis-respuesta, se puede establecer una curva de toxicidad que permita un análisis estadístico de los resultados para así obtener la concentración letal media (CL_{50}) de los organismos prueba, expresada en parte por millón.

Cuando se implementan las pruebas de toxicidad, se debe realizar la estandarización de estas, en la cual se establece la sensibilidad de las especies y su secuencia de efectos frente a un toxico de referencia, según las repeticiones del experimento. Con esto se certifica que la respuesta de la población en estudio se debe al efecto del toxico de referencia y no a las variaciones de sensibilidad de los organismos o a fallas operacionales en la aplicación del método, lo que permite elaborar cartas de vigilancia, teniendo en cuenta la precisión y exactitud qué se debe y puede obtener en los resultados generados por un determinado bioensayo.

Este tóxico de referencia debe cumplir con las siguientes características:

- Amplio espectro tóxico
- Facilidad de obtención en forma pura
- Alta solubilidad en agua
- Persistencia y estabilidad en solución
- Facilidad de acumulación

. En los ensayos toxicológicos se pueden determinar distintas variables, como[13]:

- **Concentración efectiva (CEx):** Concentración del efluente que produce efectos negativos apreciables en un porcentaje "x" de la población de ensayo. Se usa el CE50 o EC50, que sería la concentración efectiva que afecta al 50 % de la población.

[13] http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap17.pdf

- **Concentración letal (CLx):** Concentración del efluente que produce la muerte de un porcentaje "x" de la población de ensayo. Se usa el CL50 o LC50, que sería la concentración letal que mata al 50 % de la población.

- **NEANO (Nivel de efectos agudos no observados):** Mayor concentración del efluente para la cual la mortalidad registrada es del 10 % o menor.

- **CENO (Concentración de efectos no observables):** Mayor concentración continuada medida de un efluente para la cual no se observa reacción crónica alguna en las especies ensayadas.

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

Los ensayos de toxicidad son útiles para establecer criterios o patrones de calidad de aguas superficiales o efluentes, la evaluación del impacto ambiental, del riesgo ecológico y el monitoreo de las condiciones de un cuerpo de agua. Los ensayos pueden ser de laboratorio (con un número reducido de especies y en condiciones estandarizadas, las cuales reproducen sólo en forma muy parcial las condiciones naturales del ambiente), o de campo (con “encierros” sometidos a las condiciones del medio). Los organismos empleados para los ensayos deben tener un alto grado de sensibilidad a los contaminantes, ya que al establecer concentraciones seguras para ellos se espera proteger a todo el ecosistema. La cantidad de tóxico suministrada se puede expresar de dos formas:

- **Concentración:** Masa de tóxico por unidad de volumen de agua.
- **Dosis:** Cantidad de tóxico que penetra en el organismo por unidad de masa de tejido o de ser vivo sobre el que actúa.

La toxicidad que experimentan los organismos tras los ensayos puede ser de varios tipos:

5.1. TOXICIDAD AGUDA: se realizan durante períodos de tiempo breves, que generalmente están entre 48 y 96 horas. Se seleccionan individuos de edad muy concreta, la corta duración de esta prueba hace que sólo se analice el efecto sobre una parte muy pequeña del ciclo de vida del organismo.

5.2. TOXICIDAD CRÓNICA: se realizan por períodos de tiempo que oscilan entre 21 y 28 días, dependiendo de las especies usadas y el tipo de dato deseado. Este tipo de bioensayos también se utiliza para evaluar la toxicidad subletal o crónica, utilizando como parámetro de control la tasa de crecimiento, la reproducción u otro parámetro.

5.3 TOXICIDAD SUBAGUDA: los organismos son expuestos al agente tóxico diariamente durante períodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas.

5.4 BIOACUMULACIÓN: estas pruebas miden la cantidad de tóxico que se acumula en el organismo durante el experimento. Hidrocarburos, pesticidas y metales pesados son los tóxicos comúnmente analizados.

Las diferentes clases de bioensayos se pueden ver resumidas en el cuadro 1

6. FACTORES QUE AFECTAN LA TOXICIDAD

Las características del agua como las de los microorganismos pueden modificar la toxicidad de los contaminantes presentes en el agua. Por consiguiente se deben eliminar los factores extraños que pueden afectar las pruebas de toxicidad y controlar factores como el Oxígeno disuelto (OD), pH, dureza y temperatura, con este registro se mantiene un valor constante o se controla que su variación este en un rango aceptable, eliminando así todas las variables excepto la concentración del tóxico.

El conocimiento de las posibles variaciones puede ayudar a tener certeza sobre los resultados obtenidos.

Tanto las características bióticas como las abióticas actúan, como factores modificantes de la toxicidad.

6.1 Condiciones bióticas. Incluyen todos los factores que son inherentes a los microorganismos; entre ellas:

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

6.2 Condiciones abióticas. Dentro de estas condiciones modificantes se encuentran toda la gama de características fisicoquímicas del agua que rodea al microorganismo: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad, dureza, sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos, sales disueltas, nutrientes y sus proporciones relativas; el CO_2 disuelto y otros gases, la intensidad de la luz, el

fotoperiodo, el movimiento del agua y las variaciones de todos estos factores en un cuerpo de agua particular.

De las nombradas anteriormente, las más importantes y medidas en esta investigación son:

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

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

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

- Mantener la temperatura que no cause letalidad en exposiciones cortas
- Mantener un máximo durante las estaciones frías que proteja contra la letalidad producida por las caídas repentinas de temperatura
- Mantener un promedio semanal de temperatura en la estación cálida que proteja contra la carga metabólica sub-letal
- Tener en cuenta para ciertas especies los requerimientos específicos de temperatura.

6.2.2 Oxígeno Disuelto (OD). Como el oxígeno disuelto se requiere para la respiración; la disminución en los niveles de este, puede tener un efecto como si se tratara de un factor limitante para los organismos acuáticos. Los criterios modernos de calidad del agua reconocen que una reducción del OD por debajo

del nivel natural tendrá un efecto drástico sobre los organismos y no existe un número que pueda usarse como criterio de nivel aceptable.

Se debe esperar que el estrés causado en los organismos por una reducción en el nivel de oxígeno disuelto, incrementa considerablemente la toxicidad de los contaminantes en el agua.

Este comportamiento se basa en la relación incremento de la letalidad - disminución de oxígeno que entra en las branquias de los organismos prueba; la reducción de oxígeno, origina una mayor concentración de los contaminantes en las membranas de las branquias y por consiguiente una alta concentración de los tóxicos dentro de las branquias; si la toxicidad de una sustancia depende del pH, un cambio en el mismo puede reducir los niveles de OD.

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

6.2.4 Dureza. El calcio y en menor extensión el magnesio, son los cationes disueltos predominantemente en aguas naturales y son los principales responsables de la dureza de las aguas.

Figura 3 .Equipo medidor de dureza.

Fuente. Las autoras

7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TOXICIDAD[14]

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

7.1 DISEÑOS DE EXPERIMENTOS.

[14] BURONE Federico y FORGET Gilles "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones" 2004. Capitulo 5
Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-84468-201-1-DO_TOPIC.html

Para la elaboración de la prueba de toxicidad se siguieron los principios básicos planteados para el diseño de experimentos. Esto implica:

- ✓ Un número razonable de repeticiones (dependiendo de la prueba),
- ✓ Aleatorización de las dosis en las unidades experimentales y
- ✓ Un control para lograr una estimación válida del error experimental.

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

7.1.1 Diseño experimental. Las condiciones o requisitos formales de experimentación tienen que ver con la *reproducibilidad* o *replicabilidad*. En este sentido, las propiedades físicas y químicas de los compuestos químicos que se utilizan deben ser muy bien conocidas y controladas, por lo que la preparación y almacenamiento de los compuestos constituyen un elemento técnico importante, además de los asociados con la producción de los organismos de prueba. Igualmente, el uso de réplicas es básico cuando se lleva a cabo la evaluación estadística de medidas.

En pruebas de toxicidad deben tenerse en cuenta algunos factores que pueden ser una fuente potencial de confusión. Entre ellos se pueden mencionar: número de organismos al momento de la inoculación o tamaño inicial de los organismos en pruebas de crecimiento, número de repeticiones, número de tratamientos/grupos de dosis o concentraciones, intervalo de las dosis y la selección de controles.

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

1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta.

2. Pruebas para evaluar la diferencia entre organismos tratados o expuestos a distintas dosis contra un control negativo (dosis 0).

En lo que respecta al método de análisis de los resultados obtenidos, se puede hacer una primera y gran división entre *métodos paramétricos* y *no paramétricos*. Los métodos paramétricos involucran suposiciones y/o estimaciones acerca de los parámetros de las distribuciones probabilísticas de la variable, utilizadas en la prueba estadística en cuestión, mientras que los no paramétricos no hacen este tipo de suposición.

7.1.2 Establecimiento de una relación dosis-respuesta. Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y a continuación, utilizar el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable concentración de tóxico que causan un grado de efecto, en particular sobre los organismos expuestos. Entre estas concentraciones, la más utilizada es la que se conoce como concentración letal, efectiva o inhibitoria 50 (CL50/CE50/CI50), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.
Dado que la variable concentración del tóxico es de tipo continua, el tipo de variable de la respuesta (mortalidad, inhibición de la elongación de la raíz, etcétera) condiciona el modelo a utilizar en el análisis.

7.1.3 Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad.
La selección del método a utilizar para estimar los valores de CL50/CE50/CI50 de este tipo de pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones dependerá

de la forma de la distribución de tolerancias[15], y que tan bien las concentraciones o dosis seleccionadas la caracterizan (por ejemplo, el número de mortalidades parciales).

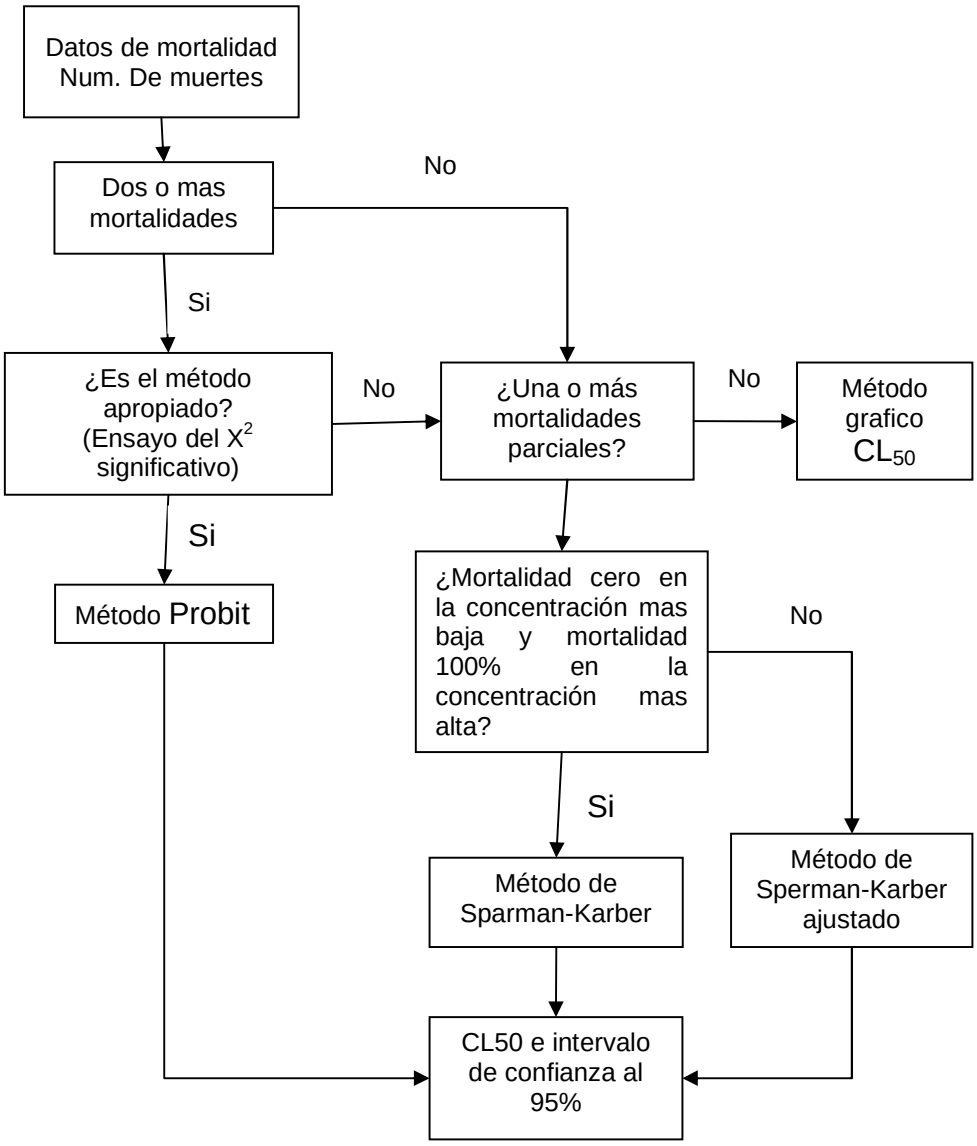
En general, se recomiendan los siguientes cuatro métodos para la estimación de CL50/CE50/CI50:

1. Método Probit (paramétrico).
2. Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico).
3. Método de Sperman-Karber (no paramétrico).
4. Método gráfico.

En la Figura 4 se presenta el diagrama de flujo recomendado por la USEPA (1993) para la selección del método, basado en los requerimientos de cada uno.

Figura 4. Determinación de CL50/CE50/CI50 para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones.

[15] Tolerancia se refiere al porcentaje de organismos de una población dada que se verá afectada a una cierta dosis. Así, la distribución de tolerancias es una cierta distribución de frecuencias o de probabilidades de tolerancias a las distintas dosis del tóxico.



Fuente. BURONE Federico y FORGET Gilles "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones" 2004. Capitulo 5 Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-84468-201-1-DO_TOPIC.html

7.1.3.1 Análisis de regresión y análisis Probit[16] Para el cálculo de los CL50/CE50/CI50 generalmente se usa el análisis Probit (con o sin ajuste). En un experimento típico de pruebas de toxicidad aguda se tiene la siguiente situación:

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

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

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* = log10(*d*), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma *S* o sigmoidea normal, de esta manera la distribución de *p vs*. *X* será de tipo normal.

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

$$y = a + bx$$

[16] CASTILLO Morales Gabriela "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas" 2004, Capitulo 5. Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-84468-201-1-DO_TOPIC.html

Donde:

$$y \text{ (expresado en unidades probit)} = z+5$$

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

$$a \text{ y } b \text{ son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión}$$

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

$$x_5 = \log_{10} \mathrm{CL}_{50}, \text{ entonces } \mathrm{CL}_{50} = 10^{x5}$$

Para facilitar los cálculos, se usa un *software* como el suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (US EPA): *Probit Analysis Program*, versión 1.5. 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 cuantales, analizando porcentajes de efecto *vs.* dosis dentro del marco de la regresión. Adicionalmente, hacen dos pruebas de bondad de ajuste: Pearson y Log-Likelihood Ratio. Estas pruebas son importantes, porque si los datos no se ajustan a la línea recta generada, es necesario llevar a cabo un análisis Probit ponderado o aplicar métodos no paramétricos o gráficos para poder determinar la CL50/CE50/CI50.

7.1.4 Análisis de varianzas ANOVA

Se trata de una técnica que consiste en aislar y estimar las varianzas separadas que contribuyen a la varianza total de un experimento; es entonces posible ensayar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas.

8. MATERIALES Y METODOS

El análisis estadístico empleado para los resultados obtenidos en esta investigación fue el análisis Probit con en que se obtuvo la $Cl_{50\text{-}48}$, así como los respectivos limites de confianza al 95%. La información obtenida fue analizada por el método conocido como análisis de varianza ANOVA.

Para el control y análisis de los parámetros fisicoquímicos, se contó con los siguientes equipos:

- pH-metro (Metter Delta 340-240)
- Oxímetro (Cornin M-90)
- Balanza analítica (Metter AE-160)
- Aireadores

Para el control de parámetros biológicos, se contó con un microscopio trinocular (American Optical 120).

- Para la realización de las Pruebas de toxicidad se conto con un cuarto climatizado a 20 ℃, con control de luz, una nevera , el software estadístico (Probit y análisis de varianza) y un deionizador (Barnstead NanoPure).
- Se contó además con los siguientes materiales de vidrio y otros elementos:
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Pipetas graduadas de 1 ml
- Pipetas graduadas de 0.2 ml
- Pipetas pasteur de vidrio
- Tubos de ensayo de 20 ml de capacidad
- Gradilla para tubos de ensayo
- Beaker de 200 ml
- Pipeteador para 10 ml

- Acuario de 20 Litros de capacidad para preparar el agua reconstituida.
- Bombas aireadoras de salida sencilla y doble para acuario
- Garrafón en polipropileno de 50 litros con llave inferior.

8.1 REACTIVOS

Para la preparación del agua reconstituida (agua de dilución) y para el mantenimiento de los cultivos de *Daphnias* y algas, se utilizaron los siguientes reactivos químicos de calidad "grado analítico".

Reactivos para el mantenimiento de los cultivos de *Daphnia púlex:*

$NaHCO_3$, $CaCL_2$, KCl, $MgSO_4$.

Reactivos químicos para el cultivo de algas:

$NaNO_3$, $CaCl_2$ $.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ K_2HPO_4 NaCl KH_2PO_4 KOH EDTA $FeSO_4.$ $7H_2O$ H_2SO4 H_3BO_3 $ZnSO_4.$ $7H_2O$ $MnCl_2.$ $4H_2O$ MoO_3 CuSO4. $5H_2O$ Co $(NO_3)_2.$ $6H_2O$ $CoCl_2.$ $6H_2O$

8.2 PROCEDIMIENTO

En esta investigación se controlaron y midieron las siguientes variables:

8.2.1 Variable independiente. Concentración de las sustancias de prueba o de interés (Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$),dióxido de Selenio (SeO_2) y cloruro de Bario ($BaCl_2$) y el porcentaje de dilución del vertimiento, buscando establecer un efecto sobre una determinada población.

8.2.2 Variable dependiente. Concentración letal media de Selenio y Bario en un tiempo de 48 horas de exposición.

8.2.3 Constantes. Permanecieron constantes, el número de organismo utilizados (20 neonatos de *Daphnia púlex* por cada concentración), tiempo de exposición al tóxico (48 horas, esto se debe al ciclo de vida de la *Daphnia púlex*, pues se considera que en esta etapa aun se alimenta de las reservas del huevo y no los afecta la falta de alimento.) y los parámetros fisicoquímicos requeridos durante el mantenimiento de los organismos y durante las pruebas toxicológicas (pH, dureza, temperatura y oxigeno disuelto). Estos parámetros fueron controlados con el fin de cumplir con los protocolos internacionales validados para este tipo de ensayos.

Una vez obtenidos los resultados de mortalidad se realizó el análisis Probit para la obtención de la respectiva CL_{48}^{50} , utilizando el protocolo LB06 “Análisis de Regresión y Análisis Probit”, donde se dan a conocer los pasos a seguir para la obtención de la misma; la información obtenida a partir del experimento diseñado estadísticamente, fué analizada por el método conocido como Análisis de Varianza (ANOVA).

El procedimiento llevado a cabo durante la investigación consta de 3 fases, el diagrama de flujo que describe claramente el procedimiento se muestra en el Anexo A.

8.3 FASE 1: FASE DE MANTENIMIENTO DEL CULTIVO

Figura 5. Cultivo

Fuente: las autoras

8.3.1 AGUA RECONSTITUIDA (AGUA DE DILUSION)

El agua reconstituida se preparó según metodología CETESB, protocolo L5.017 y Escobar Malaver con el fin simular las condiciones de sales disueltas encontradas en el hábitat natural de este tipo de microorganismos por medio de la dureza, la cual se debe encontrar en un intervalo entre 40 – 48 mg/l $CaCO_3$, preparada a partir de agua deionizada grado analítico. Para ello se prepararon las soluciones de los reactivos con las siguientes especificaciones:

- 10 g/L de $NaHCO_3$,
- 13.5 g/L de $CaCL_2$,
- 10g/L de KCl,
- 20,5 g/L de $MgSO_4$ $7H_2O$

Una vez preparada el agua reconstituida, se oxigenó por un período mínimo de 48 horas antes de adicionar los organismos de prueba. Se realizaron las pruebas de viabilidad para garantizar las óptimas condiciones del agua reconstituida.

Forma de preparar el agua reconstituida. (Cuadro 2)

Figura 6. Acuario con agua reconstituida

Fuente: las autoras

Cuadro 2. Especificaciones para preparación de agua reconstituida

No	Reactivo	Cantidad a preparar (L)	Mililitros adicionados (ml)	
			A partir de dureza cero (0mg/l)	A partir de dureza veinte (20 mg/l)
1	NaHCO3 (8 ml)*	20	100	56
2	CaCl2 (6 ml)*	20	75	42
3	KCl (3 ml)*	20	38	22
4	MgSO4 (2.5 ml)*	20	30	16
		Rango de pH	7.3 – 7.5	7.8 – 8

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

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

Parámetros de Control

Dureza 40 – 48 mg/l; ideal 45 mg/l

Oxigeno Disuelto 5 – 7 mg/l ; ideal 6 mg/l

pH 7.3 – 7.5; ideal 7.4

Temperatura 18 – 22 °C; ideal 20 ℃

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

8.3.2 PREPARACION MEDIO BRISTOL

El método más utilizado para cultivar algas verdes en el laboratorio es el medio Bristol. La preparación de este se realizó según la metodología Dutka (1989) con el fin de multiplicar las algas, en condiciones estandarizadas por medio de la fotosíntesis. Para la preparación del medio Bristol se utilizaron las siguientes soluciones de macro y micronutrientes.

Cuadro 3. Especificaciones para preparación del medio Bristol

No.	Compuesto	Stock	ml de Stock para 1 L/ agua destilada
1	NaNO3	25.0 gr./l	10
2	$CaCl_2$.$2H_2O$	2.5 gr./l	
3	$MgSO_4$.$7H_2O$	7.5 gr./l	
4	K_2HPO_4	7.5 gr./l	
5	NaCl	2.5 gr./l	
6	KH_2PO_4	17.5 gr./l	
7	KOH	15.5 gr./ 500 ml	1
	EDTA	25.0 gr. / 500 ml	
8	$FeSO_4$. $7H_2O$	2.49 gr. / 500 ml	1
	H_2SO_4	0.05 ml. / 500 ml	
9	H_3BO_3	5.71 gr. / 500 ml	1
SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZA			
10	$ZnSO_4$. $7H_2O$	4.41 gr. / 500 ml	1 ml del stock combinado
11	$MnCl_2$. $4H_2O$	0.72 gr. / 500 ml	
12	MoO_3	0.355 gr. / 500 ml	
13	$CuSO_4$. $5H_2O$	0.785 gr. / 500 ml	
14	Co $(NO_3)_2$. $6H_2O$	0.245 gr. / 500 ml	
15	$CoCl_2$. $6H_2O$	0.174 gr. / 500 ml	

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

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Adicionar los volúmenes indicados de macronutrientes para la preparación de 2 litros de medio Bristol, y completar a volumen (2L).
2. Llevar la solución ya preparada a la autoclave a una presión de 15 PSI y 250 ℉, por 15 minutos.
3. Sacar de la autoclave y se deja enfriar a temperatura ambiente antes de agregar los dos (2) ml del alga concentrada.
5. Por un período de 15 días dejar la solución cerca a una lámpara luminiscente prendida las 24 horas y oxigenar para su constante movimiento y garantizar el proceso de fotosíntesis.
6. Cen2trifugar a 2000 rpm por un tiempo de diez (10) minutos, para evitar la ruptura de los tubos de ensayo y asegurar el concentrado de las algas. Las algas deben estar siempre refrigeradas y rotuladas con la fecha de preparación y centrifugación para tener un control sobre estas.

8.3.2.1 Conteo con la cámara Neubauer*[17]*. La cámara Neubauer, también conocida como hemocitómetro, consta de un cubreobjetos de cuarzo y un portaobjetos de un grosor mayor a los de uso común (figura 7). En la parte superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de 9 mm2 de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña (figuras 7A-B) (UNAM, 1986).

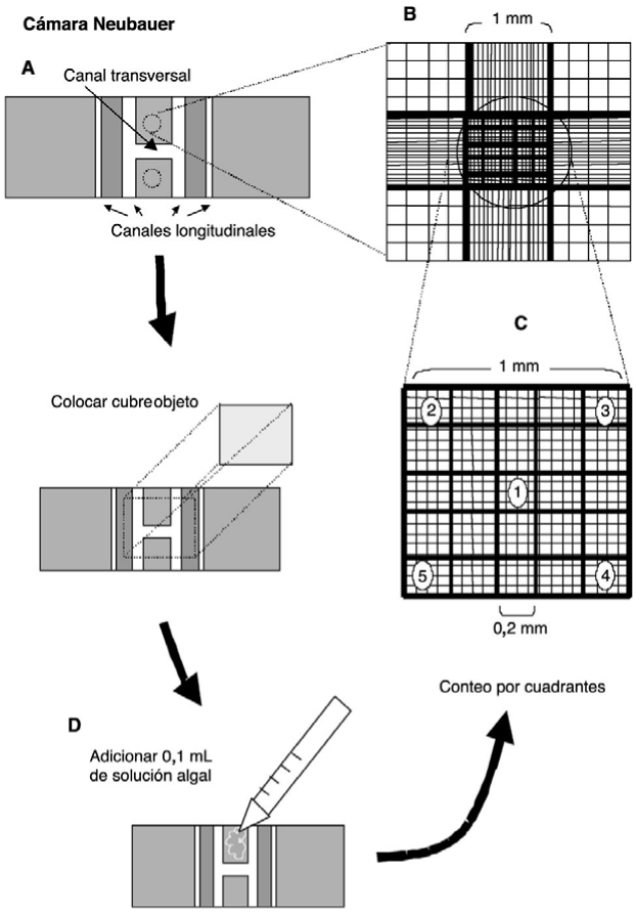
Usando el objetivo de 10x de un microscopio óptico, se enfoca de forma que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponda a 1 mm^2; generalmente se trabaja con el cuadro central. El área del cuadro central es de 1 mm^2 y se

[17] CASTILLO Morales Gabriela "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas" 2004, Pag 90. Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-84467-201-1-DO_TOPIC.html

encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide 0,2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será de 0,04 mm^2 (figura 7 C).
Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1mm, de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será 0,1 mm^3 (1,0 mm^2 x 0,1 mm = 0,1 mm^3).

El conteo con la cámara se llevó a cabo siguiendo la siguiente secuencia:
• Limpieza con papel de arroz la cámara de Neubauer.
• Colocación el cubreobjetos sobre los canales, tal como se indica en la figura 7.
• Agitación manual del frasco con la solución de algas a evaluar, hasta observar coloración homogénea o disolver los agregados celulares.
• Con ayuda de una pipeta serológica de 1 ml o con una pipeta automática de 100 µL, se tomó 0,1 ml de la suspensión de algas y coloque la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos; se dejó que la solución ingrese a la cámara por capilaridad, sin que pase a los canales laterales (figura 7 D). Si se forman burbujas se debe repetir la operación, lavando y secando la cámara previamente.
• Colocar la cámara Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x.
• Localizar el cuadro central de la rejilla (ubicando la cuadrícula de 25 cuadros de 0,04 mm^2), hacer un cambio de lente al objetivo de 40x y contar las células que se encuentran sobre el mismo (figura 7 C).
• Contar el número de células en el cuadrado central tomando precauciones para evitar contar dos veces la misma célula u omitir alguna.

Figura 7. Conteo celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer.



Fuente: CASTILLO Morales Gabriela "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas" 2004, Pag 90. Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-84467-201-1-DO_TOPIC.html

• Anotar el número de cuadros contados.

• En caso opuesto, en que el número de células sea muy elevado y se dificulte su conteo, será necesario diluir la suspensión en una proporción conocida, la que deberá ser tenida en cuenta en la estimación final.

8.3.2.2 Determinación de la densidad celular. La densidad celular de la suspensión de algas se calcula de la siguiente forma:

Figura 8. Suspensión de *Selenastrum capricornutum*,

Fuente. Las autoras

8.3.2.3 Alimentación de organismos prueba. El cultivo de Daphnia púlex se alimentó con una suspensión de Selenastrum capricornutum, las cuales son cultivadas en el laboratorio mediante el montaje del medio Bristol descrito anteriormente. Se tuvo en cuenta que cada organismo en su mantenimiento, necesita una dosis de 3.0 x 10^6 células por Daphnia púlex /día., según la metodología CETESB y la Universidad Nacional de Colombia. La cantidad de alimento necesaria se calculó con ayuda de la cámara de Neubauer, la cual se utiliza para realizar el conteo de células en una cantidad fija de líquido.

La profundidad de la cámara es de 0.1 mm. La cuadrícula de recuento muestra cuadros grandes, cada uno de un (1) mm^2; los cuatro cuadrados grandes de las esquinas tienen 16 cuadrados con aristas de 0.25 mm.

Se alimentaron las Daphnias con la frecuencia de alimentación sugerida por los protocolos del convenio UN-CAR del año 1994 donde se plantea que la frecuencia de alimentación será los días lunes, miércoles y viernes de cada semana.

Figura 9. Conteo de algas en la cámara de Neubauer

		56	
			62

		40	
			51

x5

3

26				
	20			
		17		
			22	
				26

x4

4

52			
	46		
		53	
			43

x4

5

46			
	41		
		47	
			29

Conteo en de células:

$$\#\ de\ Células\ cuadro\ 1 = (38 * 4) + (52 * 4) + (56 * 4) + (62 * 4) = 832$$

$$\#\ de\ Células\ cuadro\ 2 = (52 * 4) + (57 * 4) + (40 * 4) + (51 * 4) = 800$$

$$\#\ de\ Células\ cuadro\ 3 = (26 * 5) + (20 * 5) + (17 * 5) + (22 * 5) + (26 * 5) = 555$$

$$\#\ de\ Células\ cuadro\ 4 = (52 * 4) + (46 * 4) + (53 * 4) + (43 * 4) = 776$$

$$\#\ de\ Células\ cuadro\ 5 = (46 * 4) + (41 * 4) + (47 * 4) + (29 * 4) = 652$$

Promedio de Número de células:

$$\sum Células = 832 + 800 + 555 + 776 + 652 = 3615\ células$$

$$X = \frac{\sum Células}{5} = 723\ células$$

Se determino el número de células que hay en 1 mililitro del concentrado de algas, teniendo en cuenta que la cámara de Neubauer tiene una capacidad de 1 X 10^{-4}ml

$$\frac{X}{1\ X10^{-4}ml} = \frac{No.\ de\ células}{1\ ml}$$

Despejando y reemplazando:

$$\frac{1\ ml * 723\ células}{1\ X10^{-4}ml} = 7.2\ X10^{6}$$

$$7.2\ X\ 10^{6} = No.\ de\ células$$

El número de células multiplicado por el factor de dilución (10), da el valor real de células presentes en 1 ml de concentrado de alga.

$$7.2\ X\ 10^{6} * 10 = 7.2\ X\ 10^{7}$$

Dado que se tienen 20 organismos por pecera y la dosis óptima de alimento por Daphnia es de 3 X 10^{6} células/ día, se calculo volumen de alimento necesario para 1 pecera:

$$V = \frac{20 * 3.0\ X\ 10^{6}}{7.2X107} = 0.83\frac{celulas}{dia}$$

Como la alimentación va a ser día de promedio, hacemos el cálculo, para saber cuánto se le da de alimento se le dará a las pulgas.

$$Alimento\ para\ cada\ 2\ dias = 0.83\ cel/dia * 2\ dias = 1.66\frac{ml}{2dias}$$

8.3.3 CULTIVO DE LOS ORGANISMOS Daphnia púlex.

Este mantenimiento se realizó según la metodología CETESB (L5.018), para conservar un cultivo masivo de 4 edades.

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

El cultivo se reanudó de acuerdo al ciclo reproductivo de la *Daphnia púlex*, conservándose las etapas óptimas de reproducción en peceras separadas por edad desde 0 – 1 semanas, hasta cuatro semanas, eliminando los organismos mayores a cinco semanas y renovando el cultivo con neonatos que se obtuvieran ese día.

Esto se controló según la fecha de separación que cada pecera tuvo. El cultivo se manejó en 4 peceras por semana, obteniendo 16 peceras en el mes con un total de 320 organismos cultivados. Hasta obtener organismos de quinta generación.

Diariamente se verificó que la temperatura ambiente fuera de 20 ± 2℃.

8.3.3.1 Separación de organismos. La separación de los organismos se realizó todos los días, con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico de 3 mililitros, con una abertura lo suficientemente ancha como para no ocasionar daños a los neonatos ni a las madres, con ella se extrajeron los neonatos de 6 a 24 horas de nacidos.

La obtención de neonatos se utilizó para la renovación de los cultivos, pruebas de viabilidad del agua reconstituida, pruebas de sensibilidad y realización de las pruebas preliminares y definitivas de toxicidad.

8.3.3.2 Limpieza. Diariamente retiraron las mudas y los restos que se encuentren en el fondo de los recipientes usando un colador. Cada lunes se

cambió el 50% del agua de las peceras. Estas deben lavarse con abundante agua, asegurándose de retirar bien del vidrio las algas adheridas a este, enjuagar varias veces con agua caliente y purgar con agua reconstituida. No se deben emplear jabón ni otros detergentes.

8.4 FASE 2: PRUEBAS DE TOXICIDAD.

Para estas pruebas se expusieron individuos de 6 a 24 horas de nacidos de *Daphnia púlex.*

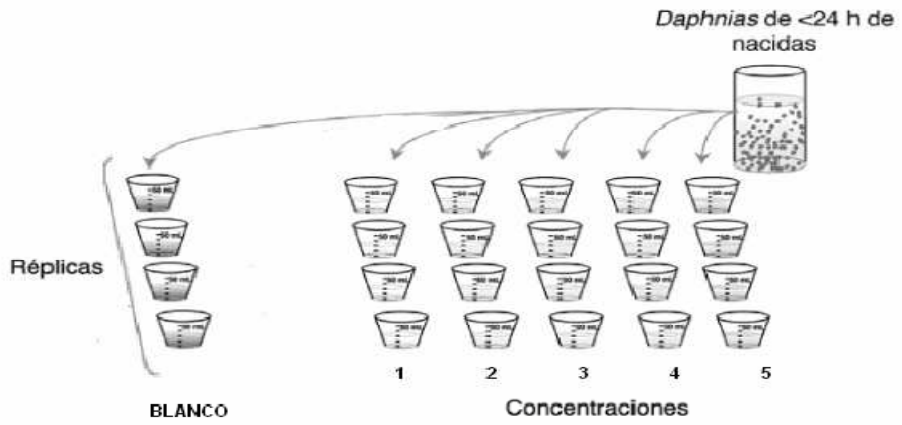
8.4.1 Preparación de soluciones. Para todas las pruebas de toxicidad las soluciones se prepararon con un volumen de agua reconstituida de 500 ml, refrigerándolas por un tiempo no mayor a seis (6) meses.
Las soluciones preparadas fueron aclimatadas durante un periodo de 3 horas, antes de los ensayos de toxicidad, para evitar la mortalidad de los organismos de prueba debido a un cambio brusco de temperatura.

8.4.2 Montaje de las pruebas de toxicológicas. Para este montaje fué necesario:

Batería de ensayo:
Esta consta de: copas plásticas de 30 ml, distribuidas para cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones para las pruebas (de sensibilidad con $K_2Cr_2O_7$, con sustancias puras (Selenio y Bario), muestra artificial), un control, es decir donde no hay ningún toxico y cuatro réplicas por cada concentración.
Teniendo lista la batería de ensayos se adicionaron 10 mililitros de las soluciones preparadas con sus respectivas concentraciones a evaluar en cada copa y sus respectivos controles.

La prueba se inició en el momento de adicionar un total de 20 organismos por concentración, distribuidos en un número de cinco (5) neonatos en cada una de las o copas de las cuatro replicas, utilizándose un total de 120 organismos por batería de ensayo. En la figura 10 se ilustra el montaje de una batería de ensayo común.

Figura 10. Batería de ensayo



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

La batería de ensayo se cubrió totalmente con un forro negro y se guardó en el área de mantenimiento de cultivos a una temperatura de 20± 2 ℃, sin luz y por un periodo de 48 horas. Al término de este tiempo, con ayuda de una lámpara, se realizó la lectura de los organismos muertos en cada copa, reportando el número de ellos en el registro LB 001 “Registro de resultados por muestra analizada”.

8.4.3 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$)

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

Se expusieron neonatos de *Daphnia púlex* a diferentes concentraciones de dicromato de potasio y se determinó la Cl_{48}^{50} que generó la muerte del 50% de los organismos expuestos en un período de 48 horas, Se prepararon cinco concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 ppm y un blanco (agua reconstituida), cada una de ellas por cuadruplicado.

Figura 11. Soluciones de dicromato de potasio

Fuente. Las autoras

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante el programa Probit, después de ingresar los datos de la mortalidad presentada en cada prueba.

Tabla 3. Sensibilidad del cultivo de *Daphnia púlex*

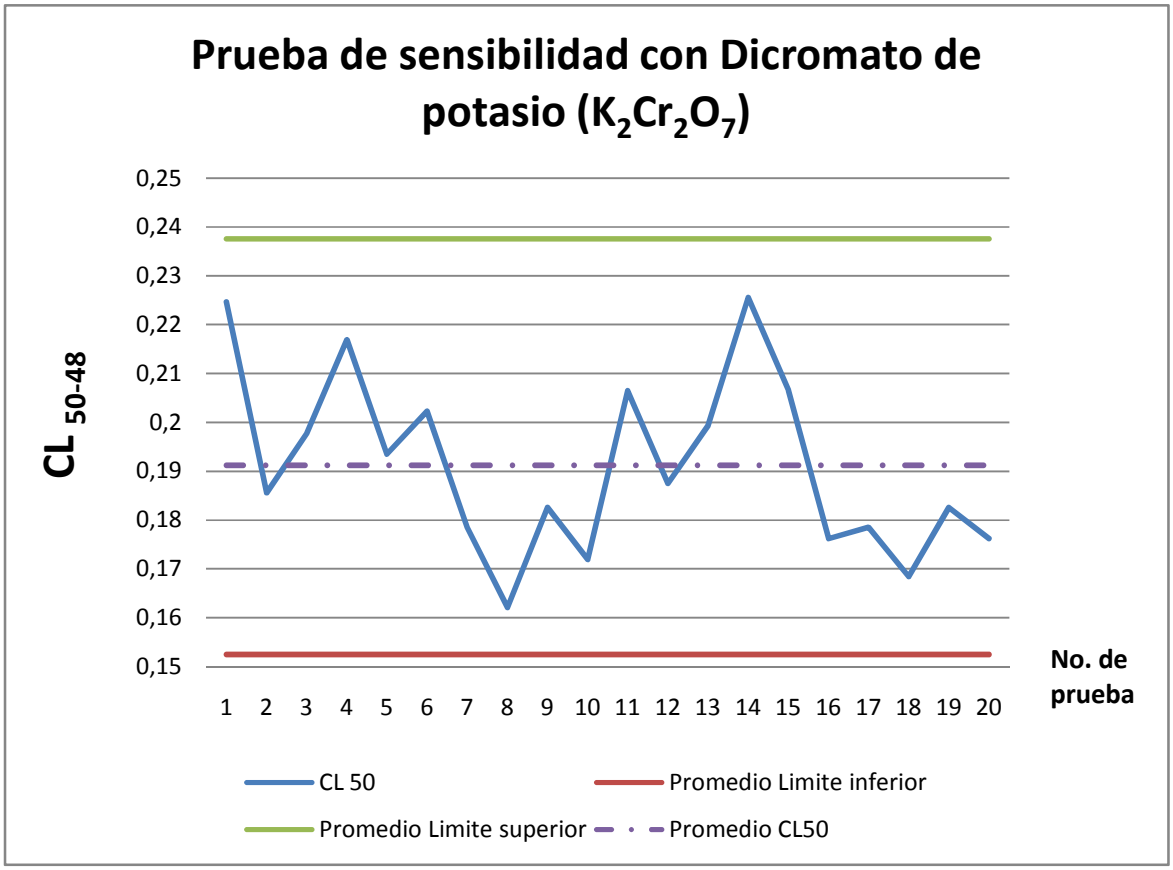
No. De la prueba	CL 50 mgl	Límite inferior	Límite superior
1	0,224	0,174	0,295
2	0,185	0,146	0,233
3	0,197	0,157	0,247
4	0,216	0,155	0,299
5	0,193	0,157	0,236
6	0,202	0,168	0,240
7	0,178	0,120	0,251
8	0,162	0,132	0,193
9	0,182	0,153	0,213
10	0,171	0,142	0,204
11	0,206	0,165	0,258
12	0,187	0,149	0,232
13	0,199	0,161	0,244
14	0,225	0,191	0,263
15	0,206	0,171	0,248
16	0,176	0,145	0,210
17	0,178	0,120	0,251
18	0,168	0,136	0,203
19	0,182	0,153	0,213
20	0,176	0,145	0,210
Promedio	**0,191**	0,152	0,237

Fuente. Las autoras

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la sensibilidad de los cultivos de Daphnia púlex a la sustancia de referencia (dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$) durante los meses de Abril y Mayo de 2010.

Ver más detalladamente en los anexo B de este documento.

Figura 12. Prueba de sensibilidad con Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)



Fuente. Las autoras

En la Figura 10 se ilustra la correspondiente carta de vigilancia junto con las concentraciones utilizadas en su construcción. La Cl_{48}^{50} promedio para veinte (n=20) bioensayos fue de 0.191 mg/l. Los límites de vigilancia inferior (LVI) y superior (LVS) al 95 % de confianza quedaron establecidos en 0,152 mg/l y 0,237 mg/l respectivamente.

COMPARACIONES DE RESULTADOSCON OTROS ESTUDIOS

AÑO	PAIS	REFERENCIA	CL 50-48 mg/l	Límite inferior	Límite superior
2001	Cuba	Pérez-Davison Gema , Restrepo Manrique Ricardo	0.028	0,01	0,03
2003	Chile	Jeannette Silva Guillermo	0,145	0,092	0,197
2007	Colombia	Orozco Holguín Juliana, Toro Barbier Angela María	0,09712	0,0688	0,1213
2008	Colombia	Alarcon Orjuela Julie Ardila Amaya Liz Natalia	0,1591	0,117	0,1872
2010	Colombia	Montañez Cardozo Yinny ;Velandia Guauque Lina	0.22	0.18	0.28
2010	***Colombia***	***Morales Johanna, Contreras Laura***	***0,1911***	***0,1524***	***0,2375***

Haciendo la comparación de los resultados obtenidos en este proyecto con otros proyectos realizados, podemos decir que los organismos estudiados presentan una sensibilidad con una variación cercana a la de los otros estudios. La sensibilidad de las especies puede variar por características como la dureza del agua donde se encuentra el cultivo.

8.4.4 PRUEBAS PRELIMINARES (SCREENING TEST)

En estos ensayos se usó un amplio rango de concentraciones del respectivo contaminante, teniendo en cuenta en que concentración se morían el 0% y el 100% de los individuos. Se realizaron las pruebas por cuadruplicado por concentración y cada montaje completo se repitió 10 veces, para cada uno de los metales.

Esta fase se desarrollara mediante la metodología descrita en el protocolo LB05 “Pruebas de Toxicidad” obteniendo el rango de concentraciones a utilizar en las pruebas definitivas.

8.4.4.1 Pruebas preliminares de toxicidad con Selenio:

8.4.4.1.1 Preparación de soluciones madre:

La solución madre fue preparada a partir de Oxido de Selenio (SO_2).

Se recomienda preparar inicialmente la solución madre con una concentración de 1000 ppm y de allí tomar alícuotas para preparar las soluciones de 100 ppm y 10 ppm.

Figura 13 .Preparación de las soluciones.

Fuente: las autoras

Peso de el Dióxido de Selenio SeO_2 =110.96 gr

Peso del Selenio Se = 78.96 gr

Debido a que se desea preparar una solución de 1000 ppm se debe tener en cuenta que

$$1000\ ppm = \frac{1000\ mg\ Se}{1\ L}$$

Se necesita saber entonces qué cantidad de SeO2 contiene exactamente 1 gr de Se:

$$1\ gr\ Se * \frac{110.96\ gr\ SeO_2}{78.96\ gr\ Se} = 1.4052\ gr\ SeO_2$$

Finalmente para obtener la solución de 1000 ppm, tendremos que agregar a 1L de agua reconstituida preparada previamente $1.4052\ gr\ SeO_2$.

Para preparar las soluciones de 100 ppm y 10 ppm se sigue el siguiente procedimiento:

Condiciones de la Sln madre de 1000ppm Condiciones que queremos obtener

$$\overbrace{C_1 * V_1}^{} = \overbrace{C_2 * V_2}^{}$$

Donde:

C = Concentración (ppm)

V= Volumen (ml)

Entonces: si se quiere obtener una concentración de 100 ppm en un volumen de 250 ml, se toma la siguiente cantidad de solución madre de 1000 ppm:

Despejando y reemplazando:

$$V_1 = \frac{100\ ppm * 250\ ml}{1000\ ppm}$$

$$V_1 = 25\ ml$$

Se sigue el mismo procedimiento para preparar la solución de 10 ppm, pero en ese caso se utiliza como solución madre la solución de 100 ppm y no la de 1000 ppm

Para estas pruebas se utilizaron inicialmente concentraciones de 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 ppm con base a la concentración letal media del Selenio que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.01 ppm (Art. 45) tomando valores por encima y por debajo de este y posteriormente se midió la mortalidad y de

acuerdo a los resultados se procedió a aumentar o disminuir las concentraciones, hasta llegar a los valores definitivos.

Las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

Condiciones de la Sln madre $\overbrace{C_1 * V_1}$ = Condiciones que queremos obtener $\overbrace{C_2 * V_2}$

Donde:

C = Concentración (ppm)

V= Volumen (ml)

Entonces: si se quiere obtener una concentración de 0.001 ppm en un volumen de 250 ml, se toma la siguiente cantidad de solución madre de 10 ppm:

Despejando y reemplazando:

$$V_1 = \frac{0.001\ ppm * 250\ ml}{10\ ppm}$$

$$V_1 = 0.025\ ml$$

Para cada una de las concentraciones usadas en esta prueba se usa la siguiente cantidad de solución madre de 10 ppm:

Tabla 4. Especificaciones de las soluciones de pruebas preliminares con Selenio

Concentración requerida en la solución (ppm)	Volumen a preparar (ml)	Volumen requerido de solución madre (ml)
Blanco	250	0
0,001		0,025
0,005		0,125
0,01		0,25
0,05		1,25
0,1		2,5

Fuente. Las autoras

A continuación se registran los resultados de mortalidad obtenidos con estas primeras concentraciones:

Tabla 5. Resultados de mortalidad de organismos en pruebas preliminares con Selenio

Concentración nominal	No. de organismos muertos				No. Observado de muertes / No. Total de organismos	% mortalidad obtenido
	1	2	3	4		
Blanco	0	0	0	0	0/20	0%
0.001	0	0	0	0	0/20	0%
0.005	0	0	0	0	0/20	0%
0.01	0	0	0	0	0/20	0%
0.05	0	0	0	0	0/20	0%
0.1	0	0	0	0	0/20	0%

Fuente. Las autoras

Según estos resultados se puede ver que de las concentraciones utilizadas, ninguna genera el 100% de las muertes de los microorganismos, por tal motivo se sigue aumentando la concentración del tóxico hasta aumentar el número de muertes, partiendo de una concentración mayor a 0.1ppm.

Figura 14 .Batería de ensayo

Fuente: las autoras

8.4.5 PRUEBAS DEFINITIVAS

Se realizaron de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, empleando concentraciones por encima de la que no provocó ninguna muerte y también concentraciones por debajo de la que determinó el 100% de mortalidad. Cada una de estas concentraciones se repitió por cuadruplicado.

Igual que en el caso de las pruebas preliminares todo el montaje de este bioensayo se repitió 10 veces tanto para el Selenio como para Bario y se realizó mediante la metodología descrita en el protocolo LB05 “Pruebas de Toxicidad”

8.4.5.1 Pruebas definitivas con Selenio. Las soluciones con concentraciones usadas para esta prueba fueron 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, y 1.5 ppm, las cuales se prepararon de la siguiente manera:

$$\underbrace{C_1 * V_1}_{\text{Condiciones de la Sln madre}} = \underbrace{C_2 * V_2}_{\text{Condiciones que queremos obtener}}$$

Donde:

C = Concentración (ppm)

V= Volumen (ml)

Entonces: si se quiere obtener una concentración de 0.3 ppm en un volumen de 250 ml, se toma la siguiente cantidad de solución madre de 100 ppm:

Despejando y reemplazando:

$$V_1 = \frac{0.3\ ppm * 250\ ml}{100\ ppm}$$

$$V_1 = 0.75\ ml$$

En la siguiente tabla se indica la cantidad de solución madre de 100 ppm a utilizar para la preparación de las 5 soluciones utilizadas en estas pruebas.

Figura 15. Preparación de las soluciones con Selenio.

Fuente: Las autoras

Tabla 6. Especificaciones de las soluciones de pruebas definitivas con Selenio

Concentración requerida en la solución (ppm)	Volumen a preparar (ml)	Volumen requerido de solución madre (ml)
Blanco	250	0
0,3		0,75
0,5		1,25
0,7		1,75
1,0		2,5
1,5		3,75

Fuente. Las autoras

La mortalidad de las especies con cada una de estas concentraciones se pueden ver más detalladamente en los anexo C de este documento.

8.4.5.2 Análisis Probit

En la siguiente tabla se observa la concentración letal media y sus límites de confianza inferior y superior encontrados para cada uno de las diez (10) pruebas de toxicidad con Selenio.

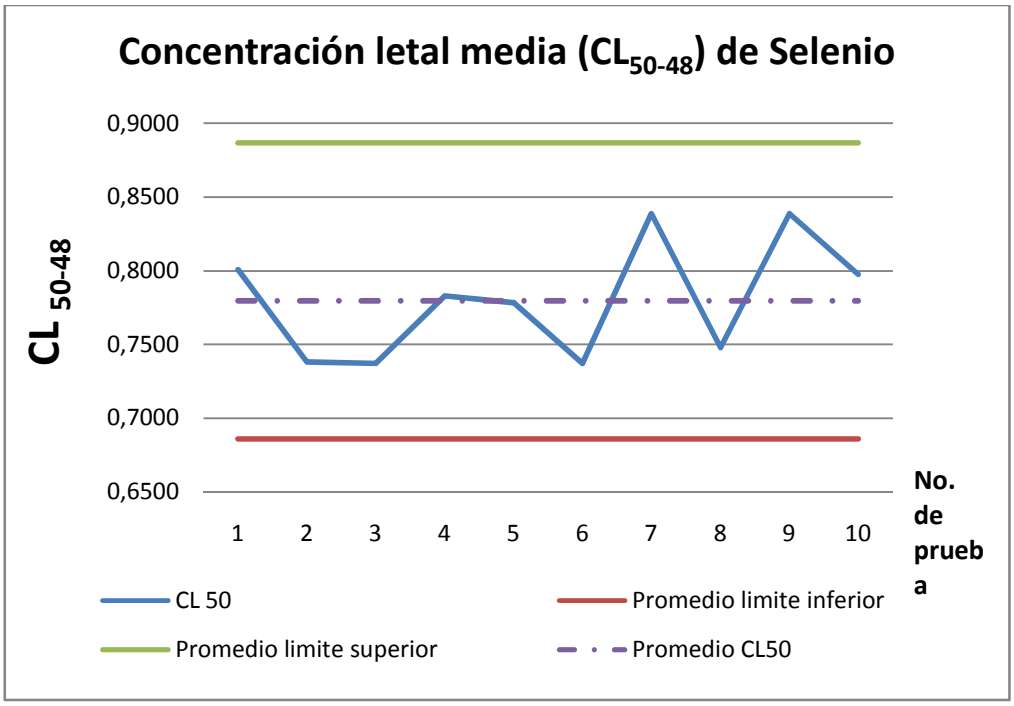
Tabla 7. Concentración letal media de Selenio

No. De la prueba	CL 50	Limite inferior	Limite superior
1	0,800	0,694	0,926
2	0,738	0,658	0,825
3	0,737	0,655	0,827
4	0,782	0,681	0,905
5	0,778	0,661	0,908
6	0,737	0,641	0,844
7	0,838	0,750	0,938
8	0,747	0,671	0,833
9	0,838	0,750	0,938
10	0,797	0,694	0,918
Promedio	0,779	0,686	0,886

Fuente. Las autoras

En la Tabla 7, puede ser observada la Cl_{48}^{50} y sus límites de confianza inferior y superior estimados para cada uno de los diez (10) bioensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* realizados con Selenio.

Figura 16. Concentración letal media de Selenio



Fuente. Las autoras

En la gráfica 16 se puede observar que el valor de la concentración letal media, que en este caso es Cl_{48}^{50} = 0,7797 mg/l, se mantiene entre el límite superior e inferior de 0,8866mg/l y 0,6860 mg/l, respectivamente por lo cual se considera que no hay errores procedimentales.

Los límites de vigilancia superior e inferior al 95 % definen la exactitud intralaboratorio y el rango de vigilancia dentro del cual se encuentra el valor de toxicidad verdadero para el tóxico de referencia. Tomando en cuenta que mientras más cerca se encuentre la Cl_{48}^{50} correspondiente a cada uno de los bioensayos consecutivos respecto a la línea de tendencia central y más alejada en relación a los límites de vigilancia superior e inferior al 95 %, mayor será la exactitud alcanzada en la ejecución, se puede apreciar en la gráfica que la ejecución tiene valores muy confiables.

8.4.5.3 Análisis de varianza ANOVA

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

Para la realización del análisis ANOVA de cada una de la pruebas, se postuló la hipótesis nula (Ho) y la hipótesis alternativa (H1) de la siguiente forma:

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

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

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

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Fc< Ft: se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

Donde Fc: F calculado

Ft: F Teórico

En la tabla 8 se muestra la mortalidad de especies para una batería de ensayo seleccionada aleatoriamente entre las 10 pruebas realizadas con Selenio.

Tabla 8.Mortalidad de especies en la prueba 6

Concentración	Número de réplicas				total	Promedio
	R1	R2	R3	R4		
1,5	5	5	5	5	20	5
1	3	4	3	5	15	2,25
0,7	2	3	1	1	7	1,75
0,5	1	0	2	1	4	1
0,3	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	47	10,25

Fuente. Las autoras

Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA de la prueba 6.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	80,708	5	16,141	35,218	2,77
Dentro de Grupos	8,25	18	0,4583		
Total	88,958	23			

Fuente: Las autoras

A continuación se resumen los resultados del análisis ANOVA realizado a cada una de las pruebas con Selenio.

Tabla 10. Resultados del análisis ANOVA de las 10 pruebas definitivas.

No. De prueba	F Calculado	F Teórico
1	64,129	2,77
2	54,552	
3	89,48	
4	35,44	
5	75,141	
6	35,218	
7	39,3	
8	81,066	
9	39,3	
10	50,217	

Fuente. Las autoras

Como se puede observar en todos los casos el F calculado es mayor que el F teórico, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula (Ho), y se acepta la hipótesis alterna (H1) es decir, la que plantea que las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos.

8.4.6 Pruebas preliminares de toxicidad con Bario:

8.4.6.1 Preparación de soluciones madre: La solución madre fue preparada a partir de cloruro de Bario ($BaCl_2$). Se utilizaron inicialmente concentraciones de

0.01, 0.05, 0.2, 0.3 y 0.4 ppm con base a la concentración letal media del Bario que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.1 ppm (Art. 45) posteriormente se aumentaron las concentraciones gradualmente ya que no se evidenciaba el porcentaje de mortalidad requerido.

Las concentraciones usadas se muestran a continuación, igualmente la cantidad de solución madre necesaria para prepararlas.

Tabla 11. Especificaciones de las soluciones de pruebas preliminares con Bario.

Concentración de la solución madre (ppm)	Concentración requerida en la solución (ppm)	Volumen a preparar (ml)	Volumen requerido de solución madre (ml)
10	Blanco	250	0
	0,01		0,25
	0,05		1,25
	0,2		5
	0,3		7,5
	0,4		10
100	0,6		1,5
	0,8		2
	2		5
	4		10
	6		15
	8		20
	10		25

Fuente. Las autoras

A continuación se registran los resultados de mortalidad obtenidos con estas primeras concentraciones:

Tabla 12. Resultados de mortalidad de organismos en pruebas preliminares con Bario.

Concentración nominal	No. de organismos muertos	No. Observado de muertes / No. Total de organismos	% mortalidad obtenido

	1	2	3	4		
Blanco	0	0	0	0	0/20	0%
2	0	0	0	0	0/20	0%
4	0	0	0	0	0/20	0%
6	0	0	0	0	0/20	0%
8	0	0	0	0	0/20	0%
10	1	1	1	0	3/20	15%

Fuente. Las autoras

Según estos resultados se puede ver que de las concentraciones utilizadas, ninguna genera el 100% de las muertes de los microorganismos, por tal motivo se sigue aumentando la concentración del toxico hasta aumentar el número de muertes, partiendo de una concentración mayor a 8 ppm.

8.4.6.2 Pruebas definitivas con Bario. Las soluciones con concentraciones usadas para esta prueba fueron: el blanco, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, las cuales se prepararon de la siguiente manera:

Condiciones de la Sln madre $\quad$ Condiciones que queremos obtener

$$\overbrace{C_1 * V_1}^{\text{Condiciones de la Sln madre}} = \overbrace{C_2 * V_2}^{\text{Condiciones que queremos obtener}}$$

Donde:

C = Concentración (ppm)

V= Volumen (ml)

Entonces: si se quiere obtener una concentración de 10 ppm en un volumen de 250 ml, se toma la siguiente cantidad de solución madre de 1000 ppm:

Despejando y reemplazando:

$$V_1 = \frac{10\ ppm * 250\ ml}{1000\ ppm}$$

$$V_1 = 2.5\ ml$$

Para cada una de las concentraciones usadas en esta prueba se usa la siguiente cantidad de solución madre de 1000 ppm:

Tabla 13. Especificaciones de las soluciones de pruebas definitivas con Bario

Concentración requerida en la solución (ppm)	Volumen a preparar (ml)	Volumen requerido de solución madre (ml)
Blanco	250	0
10		2,5
20		5
30		7,5
40		10
50		12,5

Fuente. Las autoras

La mortalidad de las especias con cada una de estas concentraciones se pueden ver más detalladamente en los anexo D de este documento.

8.4.6.3 Análisis Probit

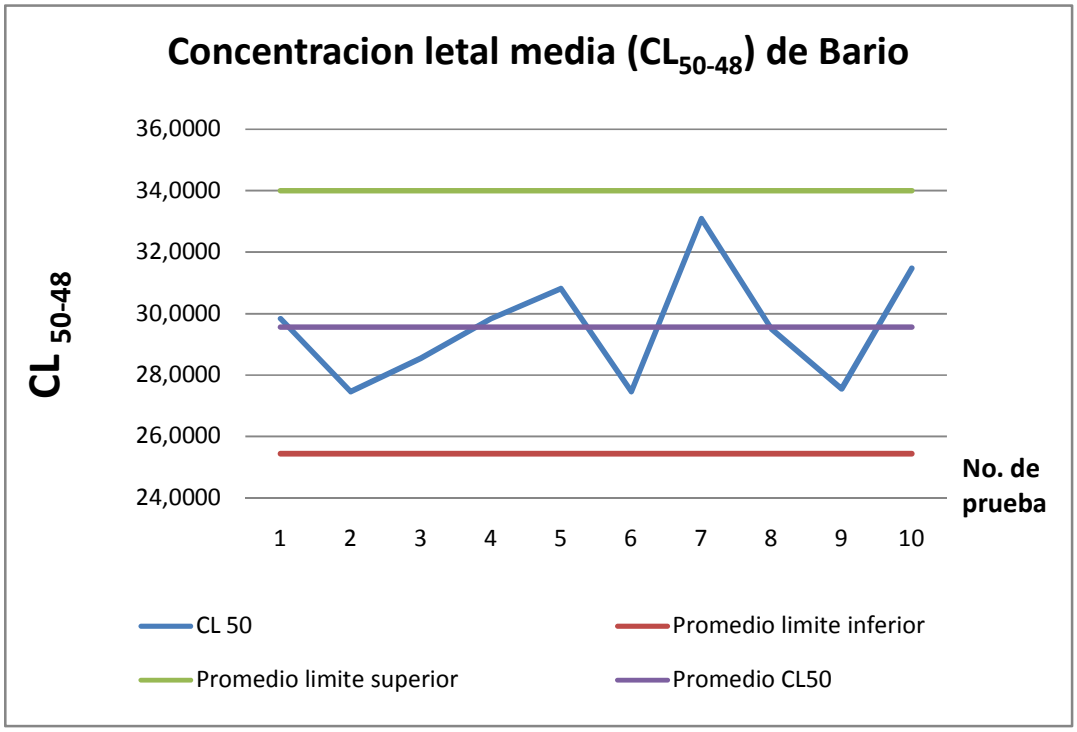
En la siguiente tabla se observa la concentración letal media y sus límites de confianza inferior y superior encontrados para cada uno de las diez (10) pruebas de toxicidad con Bario.

Tabla 14. Concentración letal media de Bario

No. De la prueba	CL 50	Límite inferior	Límite superior
1	29,836	25,888	34,063
2	27,461	22,806	32,585
3	28,542	24,655	32,375
4	29,836	25,888	34,063
5	30,813	27,222	34,477
6	27,461	22,806	32,585
7	33,086	28,330	39,106
8	29,499	25,281	34,046
9	27,554	23,600	31,604
10	31,474	27,914	35,078
Promedio	29,556	25,439	33,998

Fuente. Las autoras

Figura 17. Concentración letal media de Bario



Fuente. Las autoras

La concentración letal media en esta prueba fue Cl_{48}^{50} =29,556 mg/l, con límites superior e inferior de 33,998 mg/l y de 25,439 mg/l respectivamente. El límite de confianza fue del 95%.

8.4.6.4 Análisis de varianza ANOVA

Se siguió la misma metodología que se utilizó para el análisis ANOVA de las pruebas con Selenio. Nuevamente se toma una batería aleatoriamente para mostrar detalladamente sus resultados, en este caso se toma la prueba 3.

Tabla 15. Mortalidad de especies en la prueba 3.

Concentración	Número de réplicas	Total	Promedio

	R1	R2	R3	R4		
50	5	4	5	5	19	4,75
40	5	4	4	3	16	2,25
30	4	0	3	2	9	2,25
20	1	0	3	1	5	1,25
10	0	0	0	0	0	0
0.0	0	0	0	0	0	0
				Total	49	10,5

Fuente. Las autoras

Tabla 16. Resultados del análisis ANOVA de la prueba 3.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	80,708	5	16,141	17,88	2,77
Dentro de Grupos	16,25	18	0,902		
Total	96,958	23			

Fuente. Las autoras

A continuación se resumen los resultados del análisis ANOVA realizado a cada una de las pruebas con Bario.

Tabla 17. Resultados del análisis ANOVA de las 10 pruebas definitivas.

No. De prueba	F Calculado	F Teórico
1	17,541	2,77
2	13,036	
3	17,88	
4	17,541	
5	31,338	
6	13,036	
7	16,8	
8	27,2	
9	15,2	
10	23,856	

Fuente. Las autoras

Según los resultados, también en este caso se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa que plantea que las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos.

8.5 ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Se midió el oxígeno disuelto, la dureza y el pH, en las dos concentraciones extremo de la batería, después de las 48 horas de exposición para corroborar que el efecto tóxico fue producido por un agente químico, en este caso el metal y no por las constantes que se manejan en la prueba toxicológica. Las concentraciones de oxígeno disuelto fueron siempre superiores a 7,6 mg/L y, el intervalo de pH fue de 7,4-8,5 en los grupos tratados y en el control. Estos valores se encuentran en los intervalos reportados por los protocolos de la OECD y la USEPA para esta especie.

Las pruebas definitivas además fueron consideradas válidas ya que se cumplieron las siguientes condiciones:

- La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y preferiblemente no más que el 5%.
- La concentración de oxígeno disuelto en las soluciones test durante el transcurso del ensayo debe ser mayor a 4mg/L.
- La CL_{50} al dicromato estuvo dentro de los límites determinados para la especie utilizada.

8.6 EFLUENTE EVALUADO

El efluente utilizado para las pruebas de toxicidad fue elaborado de forma sintética, ya que en nuestro medio no se encontró industrias que generarán este tipo de vertimientos. Para elaborar este vertimiento sintético se tomó en cuenta:

- Tomar 3 litros de vertimiento de agua residual domestica de la Universidad de la Salle, que se cree proviene del restaurante y los baños. El punto de toma fue exactamente en la calle 11 con carrera 2, en el vertimiento localizado en la antigua entrada de la Universidad de la Salle.
- Tener establecido de los valores de la Cl_{48}^{50} del Selenio para preparar 2 litros de vertimiento que tengan el doble de esa concentracion.

✓ Como la $Cl_{48}^{50}\ de\ Selenio$ = 0.7797 , entonces

$$Concentración\ que\ se\ necesita = 0.7797 * 2 = 1.5594$$

Para saber qué cantidad de solución madre de 100 ppm de Selenio debo tomar para preparar el vertimiento que contenga 1.5 ppm de Se, entonces:

$$V_1 = \frac{1.5\ ppm * 2000\ ml}{100\ ppm}$$

$$V_1 = 30\ ml$$

- Se toma una probeta donde se pueda aforar a 2000 ml , para el este caso se agrega a la probeta 30 ml de solución madre de 100 ppm y se completa a volumen con el vertimiento procedente de la Universidad de la Salle.

✓ Como la $Cl_{48}^{50}\ de\ Bario$ =29,5568, entonces

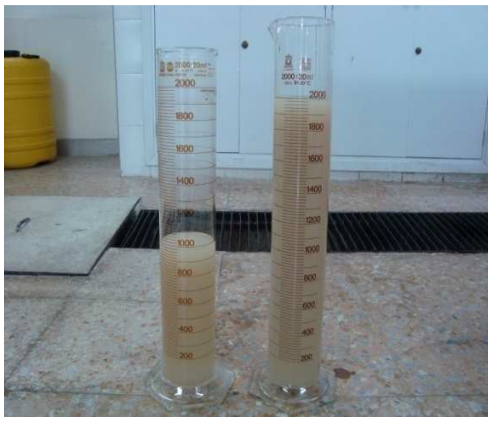
Para saber qué cantidad de solución madre de 1000 ppm de Bario debo tomar para preparar el vertimiento que contenga 30 ppm de Ba, entonces:

$$V_1 = \frac{30\ ppm * 2000\ ml}{1000\ ppm}$$

$$V_1 = 60\ ml$$

- Se toma una probeta donde se pueda aforar a 2000 ml , para el este caso se agrega a la probeta 60 ml de solución madre de 1000 ppm y se completa a volumen con el vertimiento procedente de la Universidad de la Salle.

Figura 18. Preparación del vertimiento sintético.



Fuente. Las autoras

- Estos vertimientos serán las soluciones madres para preparar las soluciones en el momento de hacer las pruebas definitivas.
- Se mandó a analizar el vertimiento en Ivonne Bernier Laboratorio Ltda[18] donde se le realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos: Selenio, Bario, sólidos totales, DQO, dureza y pH, la información de estos análisis se pueden en el Anexo F.

Figura 19 . Material para medición de parámetros

[18] Ivonne Bernier Laboratorio Ltda - IBLAB Ltda, Bogotá D.C – Colombia, Teléfono: (57 1) 263 12 90 - 416 63 01 - 416 77 04, Dirección: Calle 49 No. 70C - 31 (Bogotá), www.iblaboratorio.com

Fuente, las autoras

8.6.1 Pruebas definitivas con el vertimiento. Para la realización de estas pruebas se manejaron diferentes volúmenes de muestra, diluidos con agua reconstituida al 20%, 40%, 60%, 80%, y al 100%, debido la alta mortalidad se procedió a diluir el vertimiento al 0.1%, 0.5%, 1.0% y 10%, posteriormente se agregó a cada copa plástica 10 ml de cada solución con sus respectivas replicas y el control (vertimiento sin metales). Este bioensayo se repitió 5, los resultados de mortalidad en esta prueba se pueden ver en el Anexo E.

Figura 20. Vertimiento Doméstico

Fuente: Las autoras

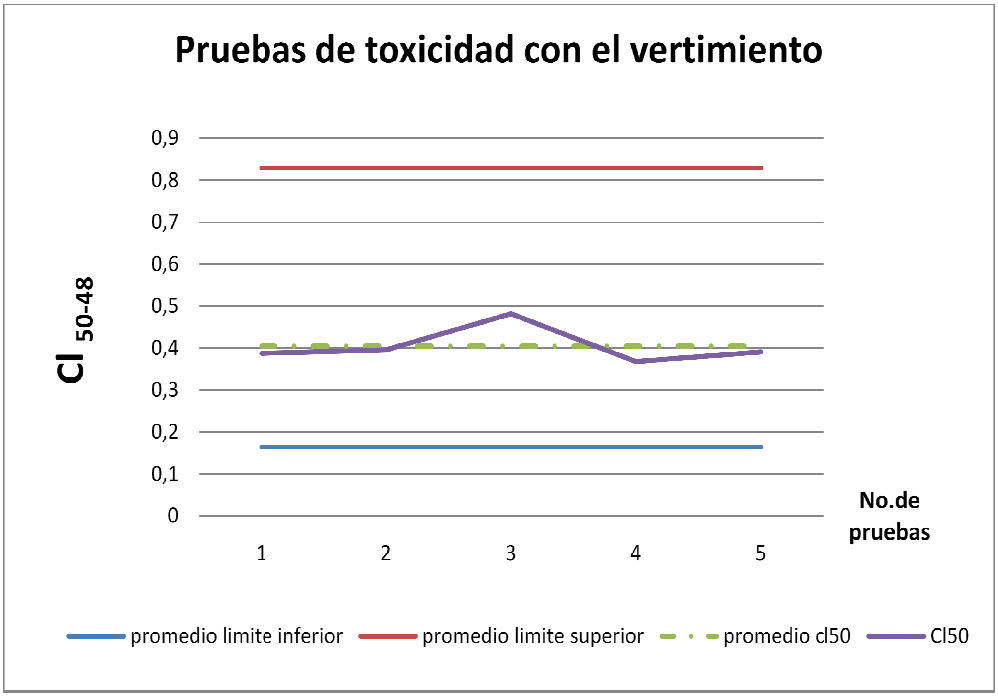
8.6.2 Calculo de la CL50 en el vertimiento. La estimación de este valor siguió un modelo matemático que asume relación continua entre dosis y respuesta. El valor se calculó con una confiabilidad del 95% por medio del método Probit, obteniéndose la CL_{48}^{50} con sus respectivos límites de confianza, para ello se utilizó el protocolo “LB 06 Análisis de regresión y análisis Probit “.

Tabla 18. Concentración letal media del vertimiento.

No de prueba	CL 50 (%V/V)	Limite inferior	Limite superior
1	0,387	0,220	0,620
2	0,395	0,199	0,674
3	0,482	0,099	1,300
4	0,367	0,214	0,574
5	0,390	0,086	0,975
Promedio	0,404	0,164	0,829

Fuente. Las autoras

Figura 21. Pruebas de toxicidad con el vertimiento



Fuente. Las autoras

La concentración letal media en esta prueba fue Cl_{48}^{50} =0.404 mg/l, con límites superior e inferior de 0.164 mg/l y de 0.829 mg/l respectivamente. El límite de confianza fue del 95%.

8.6.3 Análisis de varianza ANOVA. Después de tener este resultado se procedió a realizar el análisis de varianza según el protocolo LB07 “Análisis de varianza” para comprobar que a diferentes concentraciones de la sustancia pura o vertimiento se produce un efecto diferente en todos los organismos.

Tabla 19. Resultados del análisis ANOVA de las 5 pruebas definitivas.

No. De prueba	F Calculado	F Teórico
1	51,692	2,77
2	34,005	
3	48,738	
4	74,431	
5	61,285	

Fuente. Las autoras

8.7 OBTENCION DEL INDICE TOXICOLOGICO Y CLASIFICACION DEL VERTIMIENTO

8.7.1 Cálculo de la carga tóxica. Para el cálculo de la carga tóxica se utilizó la siguiente ecuación: expresada en unidades tóxicas (UT).[19]

$$Carga\ Toxica\ (UT) = \frac{100 * Q}{CL_{50}}$$

En donde:

• CL_{50}: Concentración letal media (Concentración del efluente que produjo la mortalidad del 50% de los organismos expuestos en un período de 48 horas).

• *Q:* Caudal promedio del vertimiento.

Haciendo un promedio entre los caudales medidos se obtiene:

$$Caudal\ (Q) = \frac{Volumen}{Tiempo} = 2.047 \frac{l}{seg}$$

[19] ESCOBAR, MALAVER; Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando Daphnia Púlex para la evaluación de muestras ambientales. 1997

$$Caudal\ (Q) = 2.047\frac{l}{seg} = 176.86\frac{m^3}{día}$$

Para manejar las mismas unidades en los cálculos, entonces:

$$Cl50 - 48 = 0.4045\frac{mg}{l} = 404.58\frac{mg}{m^3}$$

Reemplazando:

$$Carga\ Toxica\ (UT) = \frac{100 * Q}{CL_{50}}$$

$$Carga\ Toxica\ (UT) = \frac{100 * 176.86\frac{m^3}{día}}{404.58\frac{mg}{m^3}}$$

$$Carga\ Toxica\ (UT) = 43.71$$

8.7.2 Calculo del índice toxicológico del efluente. Para el cálculo del índice toxicológico se contó con la información del nivel trófico afectado (*Daphnia púlex*), caudal del vertimiento, concentración letal media del vertimiento y carga tóxica del efluente.

Con el cálculo y transformación logarítmica en base 10 de la carga tóxica se obtiene el índice toxicológico con el que se clasifica el vertimiento según:

Tabla 20. Clasificación de efluentes a partir del índice toxicológico

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 púlex* para la evaluación de muestras ambientales.1997

Se tiene Entonces:

$$IT = Log(1+43.71) = 1.65$$

Según este índice toxicológico el vertimiento tiene una carga tóxica despreciable.

9. FASE 3. ANALISIS DE RESULTADOS

Los bioensayos, como toda herramienta de medición, deben tener cierta precisión y exactitud en sus resultados, por tal motivo un aspecto muy importante en el desarrollo de estos ha sido la reproducibilidad de estas pruebas, lo que consiste en obtener resultados similares con la misma sustancia química. Esto requiere que las pruebas sean estandarizadas de acuerdo a protocolos muy definidos. En el caso de la especie en estudio, el número de resultados consecutivos contemplados se ajusta a lo recomendado por los protocolos CETESB

La estandarización de esta investigación se hizo utilizando el dicromato de potasio como tóxico de referencia y en este caso, ninguno de los 20 datos de la CL_{48}^{50} de dicromato de potasio considerados caen en la categoría de “anormales” . Por lo tanto, los 20 datos fueron incluidos en la determinación de la precisión y exactitud intralaboratorio.

Es importante dejar establecida la sensibilidad que esta especie presenta a un tóxico de referencia como el dicromato de potasio, ya que los bioensayos con esta

especie serán, en un futuro próximo, una herramienta fundamental en la evaluación ecotoxicológica de aguas residuales y efluentes tanto industriales como domésticos, como lo dejan de manifiesto la cantidad más creciente día a día de estudios de este tipo.

Los análisis de varianza efectuados para establecer si las mortalidades en los las diferentes pruebas presentan diferencias significativas, es decir, si dependían de la concentración de los contaminantes, mostraron que para las diferentes pruebas el F calculado fue mayor que el F teórico, por lo que se acepta que la mortalidad obtenida fue función de la concentración de los metales pesados. Es evidente un incremento de la tasa de mortalidad con el aumento de la concentración de Selenio y Baro respectivamente…ver Anexo C y Anexo D.

Según los resultados de toxicidad con el selenio (que en este caso es el condicionante por ser el metal que afecta más rápido a los crustáceos) se concluye que el vertimiento es toxico, pero debido al bajo caudal 176.86 m^3/día se obtiene un índice toxicológico bajo, debido a esto el efluente se clasifica como de carga toxica despreciable.

10. CONCLUSIONES

- ✓ A partir de la aplicación del método Probit se obtuvo una concentración letal media CL_{48}^{50} de 0.7797mg/l para Selenio y de 29.5568 mg/l para Bario, con un índice de confiabilidad del 95% usando D. púlex para 48 horas de exposición.

- ✓ La sensibilidad de los cultivos de Daphnia pulex a la sustancia de referencia $K_2Cr_2O_7$, se midió al inicio y al intermedio del proyecto, obteniendo un CL_{48}^{50} de 0.19117 mg/l con un límite inferior de 0.152445 mg/l y un límite superior de 0.237575 mg/l. Este valor se obtuvo con el 95% de confianza.

- ✓ Los resultados del ensayo indican que *Daphnia pulex* es sensible a la exposición con ambos productos. Sin embargo, toleró con más dificultad el Selenio que el Bario.

- ✓ Mediante los ensayos de toxicidad se pudo determinar que el vertimiento sintético presenta una CL_{48}^{50} de 0.40458 mg/l , lo que hace pensar que el carácter toxico del vertimiento se debe principalmente al Selenio.

- ✓ Según los resultados de toxicidad se concluye que el vertimiento es toxico, pero debido al bajo caudal 176.86 m^3/día se obtiene un índice toxicológico de 1.65, el cual está entre el rango 1-1.99 al cual se le asigna una categoría de carga toxica despreciable.

- ✓ Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución de este trabajo

de grado. Lo anterior considerando que cualquier herramienta o instrumento analítico (como es el caso de un bioensayo de toxicidad) debería ser operado por operarios altamente entrenados.

- ✓ Las variables controladas pH (7.3 – 7.5), temperatura (18 – 22 °C), oxigeno disuelto (5 – 7 mg/l) y dureza (40 – 48 mg/l) fluctuaron sólo ligeramente y se mantuvieron en niveles considerados normales en ensayos agudos.

- ✓ Los límites de vigilancia superior e inferior al 95 % definen el rango de vigilancia dentro del cual se encuentra el valor de toxicidad verdadero para el tóxico de referencia ($Kr_2Cr_2O_7$, SeO_2, $BaCl_2$). Tomando en cuenta que mientras más cerca se encuentre la Cl_{48}^{50} correspondiente a cada uno de los bioensayos consecutivos respecto a la línea de tendencia central y más alejada en relación a los límites de vigilancia superior e inferior al 95 %, mayor será la exactitud alcanzada en la ejecución, se pudo apreciar que los resultados obtenidos son confiables.

11. BIBLIOGRAFIA

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

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

- ✓ CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. Mc Graw Hill. Interamericana de España. Barcelona. 2002

- ✓ DIAZ BAEZ, MARÍA CONSUELO, BUSTOS LOPEZ, MARTHA CRISTINA y ESPINOSA RAMIREZ, ADRIANA JANNETH. Pruebas De Toxicidad Acuática: Fundamentos Y Métodos. *Ingeniería e Investigación*. Universidad Nacional. 2009

- ✓ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN, ICONTEC. Gestión ambiental: agua. Guía para la realización de ensayos de toxicidad en organismos acuáticos (Bioensayos). Bogotá D.C. 2008.

Cibergrafia

- ✓ PETRACINI ROBERTO. Los alimentos vivos: Daphnias [En línea. Página web html]. Copy 2007-2009. http://www.elacuarista.com/alimentos/daphnias.htm [agosto 29 de 2009]

- ✓ SILVA JEANNETTE; *Calibration of the acute toxicity bioassay with* daphnia pulex *(crustacea:cladocera) using a reference toxicant* [En línea .pdf]. Guillermo Torrejón, Enrique Bay-Schmith & Alberto Larrain. 2003. Laboratorio de Bioensayos, Depto. de Zoología, Fac. Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción Chile, 2003, http://www.scielo.cl/pdf/gayana/v67n1/art11.pdf, [agosto 29 de 2009], ISSN 0717-652X.