



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**



**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

---

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA BIOLÓGICA PARA DETERMINAR  
NIVELES DE TOXICIDAD APLICANDO *Daphnia magna* (CRUSTÁCEA:  
CLADÓCERA) EN EL AGUA DE VERTIENTE UTILIZADA EN EL SECTOR DE  
HUACHI LA LIBERTAD**

---

---

*Trabajo de Graduación, modalidad: Seminario presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.*

**AUTOR:** Ricardo Javier Garcés Veloz

**TUTOR:** Ing. Gladys Navas Miño

**Ambato – Ecuador**

**2013**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de Tutor del trabajo de investigación sobre el tema: “Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad aplicando *Daphnia magna* (Crustácea: Cladóceras) en el agua de vertiente utilizada en el sector de Huachi La Libertad”, por el egresado Ricardo Javier Garcés Veloz, alumno de la Carrera de Ingeniería Bioquímica de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada y considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Julio de 2012

.....

Ing. Gladys Navas

**TUTOR DEL PROYECTO**

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los contenidos del presente Trabajo de investigación denominado: “Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad aplicando *Daphnia magna* (Crustácea: Cladóceras) en el agua de vertiente utilizada en el sector de Huachi La Libertad” le corresponden exclusivamente al Egdo.; Ricardo Javier Garcés Veloz y, la Ing. Gladys Navas; Tutora del Proyecto de Investigación; que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que se ha consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

Ambato, Julio de 2012

EL AUTOR

.....  
Ricardo Javier Garcés Veloz

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Junio 2013

Para constancia firman:

.....

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**Ing. Gladys Navas Miño**

.....

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Dr. Ramiro Velasteguí

.....

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Dr. Homero Vargas

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica de Ambato y por medio de ella a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, especialmente a la carrera de Ingeniería Bioquímica, que gracias a los conocimientos transmitidos a través del personal docente y administrativo me han hecho crecer como persona y me han preparado para el ámbito profesional.

A la Ing. Cecilia Carpio, por su apoyo y constante preocupación en el trayecto del trabajo de graduación, alentándonos a alcanzar las metas en el plazo definido.

Un sincero y especial agradecimiento a la Ing. Gladys Navas Miño, por guiarme en el transcurso del proyecto y culminación del trabajo de graduación, quien con su admirable paciencia ha estado presente en cada momento difícil de este trabajo y ha sabido transmitir su experiencia y valiosos conocimientos.

A mis compañeros que estuvieron a cada momento del transcurso universitario, a pesar de todos los inconvenientes y malos entendidos me han dado su gran apoyo.

A mis amigos Anita, Ale, Lore, Cris Flores, Adry, Gabo, Alejo, Luis Alfredo, quienes han estado conmigo y han sabido escucharme y comprenderme, espero que nuestra amistad perdure.

A mis hermanos y hermanas: Mony, Mauro, Chris, Lore, Andy y Emily, que me han brindado su apoyo en los momentos más difíciles de mi vida y gracias a sus consejos y su irremplazable compañía, he podido superar muchas adversidades... Ustedes son lo mejor.

## **DEDICATORIA**

Dedicado a Dios que me ha acompañado en cada momento de mi vida y me ha enseñado que cada caída no significa una derrota, sino una oportunidad para levantarme con más fuerza.

A mis padres Blanqui y Adán por creer en mí y brindarme su constante apoyo y dedicación, por hacer lo posible para sacar adelante a nuestra familia, por inculcarme los valores que me permiten desenvolverme correctamente en la sociedad y por el amor incondicional de cada día... no les fallaré.

A mi mejor amigo Jhon que me acompañó en todo momento hasta que Dios lo llevó a su lado, y con su fuerza ha impulsado a muchas personas a seguir adelante, dejaste una gran huella en nuestros corazones, nunca te olvidaremos... Este triunfo es por los dos; querido amigo.

## RESUMEN

El presente trabajo evalúa el uso de *Daphnia magna* como indicador biológico en ensayos de toxicidad frente a metales pesados, tales como el arsénico, cadmio, plomo, zinc y estaño.

Se aislaron 5 neonatos de *Daphnia magna*, se evaluó el desarrollo de la población mediante el conteo total de individuos al término de 24 días, empleando dos medios de cultivo, medio A1: agua potable declorada, para la eliminación de cloro por volatilidad se recogió agua distribuida por tubería y se la dejó reposar por 8 días. El medio A2: agua reconstituida, formada por agua destilada con sales esenciales. Se utilizó dos tipos de alimento: alimento B1: jugo puro de alfalfa (0,10 g/mL), alimento B2: levadura fresca disuelta (0,10 g/mL) y alimento B3: jugo de alfalfa (0.05g/mL) + levadura disuelta (0.05g/mL).

Para el estudio se aplicó un diseño experimental “a x b” y se determinó el óptimo desarrollo con la combinación A2B2, en las demás combinaciones la supervivencia de los neonatos se veía afectada en los primeros días.

Se colocaron 10 neonatos de *Daphnia magna* procedentes del medio de cultivo óptimo en cada unidad experimental y se realizó un total de 3 grupos de bioensayos toxicológicos con 9 concentraciones del tóxico de referencia (Dicromato de potasio) en una gradiente de concentración desde 0,015 mg/L hasta 0,160 mg/L, con intervalos de 0,02 mg/L, cada uno por triplicado; se utilizó el método de unidades probabilísticas “Probit” para determinar la concentración letal media en *Daphnia magna*. El parámetro utilizado fue la mortalidad de los individuos; criterios como la movilidad y el descenso de la población fueron empleados para evaluar las diferentes concentraciones, en los bioensayos toxicológicos frente a Dicromato de potasio, se encontraron valores de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) entre 0.0786 y 0,0847 mg/L.

Con el mismo procedimiento se realizó los bioensayos con agua de vertiente recogida del sector de Huachi la Libertad, se preparó un total de 8 diluciones desde 12,5% a 100% con intervalos de concentración de 12,5% en agua reconstituida, se obtuvo valores de CL<sub>50</sub> entre 0,0806 y 0,0837mg/L con una concentración inicial de arsénico de 0,0228 mg/L. Los

valores de  $CL_{50}$  en referencia al arsénico están sobre los límites permisibles en el agua potable, que según la norma INEN debe ser menor a 0,01 mg/L para ser usada por la población, el agua de vertiente debe ser tratada para eliminar en lo posible la presencia de metales pesados como el arsénico el cual se encuentra en una cantidad considerable, otros metales en menores cantidades no representan alteraciones en los resultados de los bioensayos, por lo tanto son considerados inofensivos



## CONTENIDO

### CAPÍTULO I

#### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

<b>1.1</b>	<b>Tema de investigación .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Contextualización .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4</b>	<b>Análisis crítico.....</b>	<b>5</b>
1.4.1	Prognosis.....	6
1.4.2	Formulación del problema.....	6
1.4.3	Preguntas directrices .....	6
1.4.4	Delimitación.....	7
<b>1.5</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>7</b>
<b>1.6</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>8</b>
1.6.1	Objetivo general.....	8
1.6.2	Objetivos específicos .....	8

### CAPÍTULO II

#### MARCO TEÓRICO

<b>2.1</b>	<b>Antecedentes investigativos .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Fundamentación filosófica .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Fundamentación legal .....</b>	<b>12</b>

<b>2.4</b>	<b>Categorías fundamentales.....</b>	<b>16</b>
2.4.1	Marco teórico de la variable independiente.....	17
2.4.2	Marco teórico de la variable dependiente.....	18
<b>2.5</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Señalamiento de variables.....</b>	<b>20</b>

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

<b>3.1</b>	<b>Enfoque.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Modalidad básica de la investigación.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Nivel o tipo de investigación.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Población y muestra.....</b>	<b>22</b>
3.4.1	Población.....	22
3.4.2	Muestra.....	22
<b>3.5</b>	<b>Operacionalización de variables.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Recolección de información.....</b>	<b>24</b>
3.6.1	Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>Daphnia magna</i> ...	24
3.6.2	Determinación de la concentración letal media de metales pesados para <i>Daphnia magna</i> .....	30
3.6.3	Preparación de las concentraciones de Dicromato de potasio como tóxico de referencia.....	30
3.6.4	Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ).....	31
3.6.5	Determinación de la concentración de tóxicos presentes en el agua de vertiente .	35
<b>3.7</b>	<b>Procesamiento y análisis.....</b>	<b>39</b>

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1	Datos preliminares.....	40
4.2	Tasa de reproducción de <i>Daphnia magna</i> en condiciones de laboratorio .....	42
4.3	Concentración letal media de metales pesados para <i>Daphnia magna</i> .....	44
4.4	Verificación de la hipótesis .....	46

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones.....	47
5.2	Recomendaciones.....	48

## CAPÍTULO VI

### PROPUESTA

6.1	Título: .....	49
6.1.1	Institución Ejecutora: .....	49
6.1.2	Beneficiarios: .....	49
6.1.3	Ubicación: .....	49
6.1.4	Tiempo estimado de ejecución: .....	49

<b>6.2</b>	<b>Antecedentes de la propuesta .....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>50</b>
<b>6.4</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>51</b>
6.4.1	General.....	51
6.4.2	Específicos .....	51
<b>6.5</b>	<b>Análisis de factibilidad .....</b>	<b>51</b>
<b>6.6</b>	<b>Fundamentación .....</b>	<b>52</b>
<b>6.7</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>53</b>
<b>6.8</b>	<b>Administración .....</b>	<b>54</b>
<b>6.9</b>	<b>Previsión De La Evaluación.....</b>	<b>55</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1</b>	<b>Factores en estudio para el crecimiento de <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 3.2</b>	<b>Niveles de estudio para el desarrollo de <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 3.3</b>	<b>Factores en estudio para determinar la concentración letal media en <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 3.4</b>	<b>Parámetros y criterios de evaluación en el desarrollo de <i>Daphnia magna</i>...</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 3.5</b>	<b>Factores en estudio para determinar DL<sub>50</sub> en el agua de vertiente.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 4.1</b>	<b>Población obtenida a partir de tres réplicas en el cultivo de <i>Daphnia magna</i> al término de 24 días.....</b>	<b>40</b>

Tabla 4.2 indicadores de crecimiento obtenidos a partir de tres réplicas en el cultivo de <i>Daphnia magna</i> al término de 24 días.....	43
Tabla 4.3 Valores obtenidos con <i>Daphnia magna</i> correspondiente a la concentración letal media al término de 2 días.....	45
Tabla 4.4 Concentraciones de arsénico en las diluciones de agua de vertiente.....	45
Tabla 6.1 Modelo operativo.....	54
Tabla 6.2 Administración del proyecto.....	55
Tabla 6.3 Previsión de la evaluación.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Árbol de problemas.....	5
Figura 2.1: Categorización de variables.....	16
Figura 3.1 Proceso de cultivo de <i>Daphnia magna</i> en agua potable declarada.....	28
Figura 3.2 Proceso de cultivo de <i>Daphnia magna</i> en agua reconstituida.....	29
Figura 3.3 Procedimiento para obtener la concentración letal 50.....	34
Figura 3.5 Procedimiento para medir arsénico con el kit comercial.....	38
Figura 4.1 Número total de individuos de <i>Daphnia magna</i> en cada tratamiento.....	41
Figura 4.2 Representación de la tasa de reproducción de <i>Daphnia magna</i> .....	44
Figura 6.1 Evolución de la concentración del contaminante en una columna de adsorción.....	5

## INTRODUCCIÓN

La contaminación procede de la mayor parte de actividades ligadas al crecimiento de la población mundial y a su desarrollo tecnológico; tales como la minería y el crecimiento en los cultivos que usan pesticidas, estos procesos liberan gran cantidad de metales pesados en el suelo, lo cual no solo afecta a la salud humana sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños a veces irreparables, tales como la pérdida de biodiversidad.

Si bien el agua es uno de los recursos más vitales para la vida en el planeta, resulta ser también uno de los más contaminados, La contaminación del agua potable no es común y normalmente no registran niveles de contaminantes que representarían un riesgo a la salud. Sin embargo, a medida que siga incrementando el desarrollo de la sociedad moderna, se aumenta constantemente el número de actividades que pueden contaminar el agua potable. Todo lo que se desecha inapropiadamente; los químicos, desechos humanos y animales, los desechos inyectados bajo la superficie y las sustancias que ocurren naturalmente, tienen el potencial de contaminarla.

La manera más efectiva de prevenir los efectos de la contaminación es el control periódico de la calidad del agua; conocer qué sustancias tiene disueltas o suspendidas, las sustancias potencialmente tóxicas pueden encontrarse en concentraciones tan bajas, o en condiciones ambientales tales, que son indetectables con los métodos químicos convencionales.

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 a los ecosistemas acuícolas y terrestres. 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

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 Tema de investigación

“Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad aplicando *Daphnia magna* (Crustácea: Cladóceras) en el agua de vertiente utilizada en el sector de Huachi La Libertad”

#### 1.2 Planteamiento del problema

El agua proveniente de las vertientes aparenta ser adecuada para el consumo, sin embargo esta puede contener muchos elementos nocivos que pueden causar enfermedades a largo plazo debido a la bioacumulación en el organismo. Las fuentes difusas más evidentes de estos contaminantes corresponden a la agricultura, por el uso de pesticidas e insecticidas, así como el aporte de residuos de insumos agrícolas, restos de vegetales y animales, los cuales muchas veces producen la contaminación de acuíferos. La actividad forestal intensiva, sobre todo de plantaciones, también es una fuente de contaminantes y produce, al igual que la actividad agrícola, cargas de nutrientes, pesticidas y sedimentos. Constantemente se analiza el agua a utilizar, donde se utilizan reactivos químicos de elevado valor, con el fin de estar preparados para variaciones en la concentración de contaminantes y alterar los procesos rutinarios, pues es de vital importancia identificar que el agua que ingresa a las plantas potabilizadoras no presente metales pesados tales como arsénico, cadmio, plomo, zinc y estaño en su constitución, de ser así se la debe dar un adecuado tratamiento para eliminar la mayor cantidad posible de estos metales y no sobrepasar los límites establecidos por las normas ecuatorianas para el agua potable.

### 1.2.1 Contextualización

El análisis de metales en Países como México, Chile, Perú entre otros, se realiza con procedimientos ecológicos y fácilmente reproducibles, según Núñez y Hurtado (2005), *Daphnia magna* comúnmente conocida como pulga de agua; es utilizada como bioindicador ambiental de efluentes dulciacuícolas en ensayos ecotoxicológicos, sin embargo los sistemas de cultivo tradicionales pueden resultar costosos, por lo cual se desarrollan nuevos medios de cultivo.

Núñez y Hurtado (2005), mencionado por Biesenger y colaboradores, (1997) Instituciones en todo el mundo, como la EPA de Estados Unidos están desarrollando estrategias de biomonitoreo ambiental para determinar el grado de contaminación en el medio ambiente. Los costos de análisis fisicoquímicos convencionales pueden resultar muy elevados y no representan de manera real el impacto de los contaminantes sobre el ambiente por lo que el uso de bioindicadores sería una estrategia simple y efectiva para sospechar de la presencia de contaminación que estaría afectando al ecosistema en estudio.

Castillo (2004), menciona que el análisis de toxicidad en el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá desde la instauración de la Década del Agua y Saneamiento por las Naciones Unidas (1980) desarrolla importantes aportes a la evaluación y control de la calidad del agua, contribuyendo al desarrollo de estudios ecotoxicológicos utilizando especies de diferentes niveles tróficos, en particular organismos de agua dulce.

Las metodologías descritas corresponden a ensayos para determinar efectos agudos letales y sub-letales con los organismos de prueba *Daphnia magna* e *Hydra attenuata*, efectos fitotóxicos sub-letales agudos con *Allium cepa L* y *Lactuca sativa*, y efectos crónicos con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

En el Ecuador, en la Región Sierra, las aguas provienen de acuíferos o ríos. Algunos acuíferos y aguas superficiales están contaminados con arsénico, estas aguas contienen concentraciones por sobre los 10 µg/L que es la norma permitida en Ecuador y por La Organización Mundial de la Salud, a pesar de que existe una norma sobre la calidad de agua de bebida adoptada en el año de 1992, en la cual se describe que la concentración



permisible de arsénico es de 0.05 mg/L (BVSA, 2004). La concentración establecida en Ecuador por el INEN es de 10 µg/L. (Espíndola y otros, 2010)

Rivas (2009), indica que en la ciudad de Ambato la potabilización del agua se basa en la eliminación de impurezas mediante coagulantes, filtración y adición de cloro con el fin de eliminar turbiedad y la mayor cantidad de microorganismos, sin embargo los metales disueltos en el agua son de difícil remoción, por lo que se opta por escoger que el agua de ingreso a las plantas potabilizadoras no contenga una mayor cantidad de estos metales para evitar tratamientos exhaustivos, aun así solamente se realiza análisis de arsénico en ciertas plantas de EMAPA.

Santander (2011), menciona que existen varias acequias las cuales están encargadas de la distribución del agua de riego para el sector de Huachi La Libertad y la acequia Chimborazo con un caudal de 242 lt/s como valor máximo decrecida y un valor de 180 lt/s en condiciones normales, de este canal se subdivide en el ovalo Misquilli, cabe recalcar que todos estos datos fueron obtenidos del SENAGUA e INAR, instituciones encargadas de la regulación del agua de riego en Tungurahua.

Por otro lado el uso de aguas de pequeñas vertientes que nacen de los canales construidos en el sector principalmente del canal Ambato Huachi-Pelileo, la cual es usada para riegos en zonas específicas, pues la mayor parte de agua de vertiente es canalizada a subplantas de EMAPA

Según Ledezma (2011), las fuentes de agua, pozos, y vertientes subterráneas pierden su calidad y cantidad. Entre las principales causas para esta problemática están la deforestación, la contaminación, y la sobreexplotación en pozos para riego. El 80 por ciento de las causas es atribuido a las malas prácticas del hombre. La calidad es afectada por la contaminación de las fuentes subterráneas en las zonas altas principalmente en la producción agrícola convencional, que utiliza productos químicos como fertilizantes y plaguicidas que se infiltran en las recargas acuíferas.

### 1.2.2 Análisis crítico

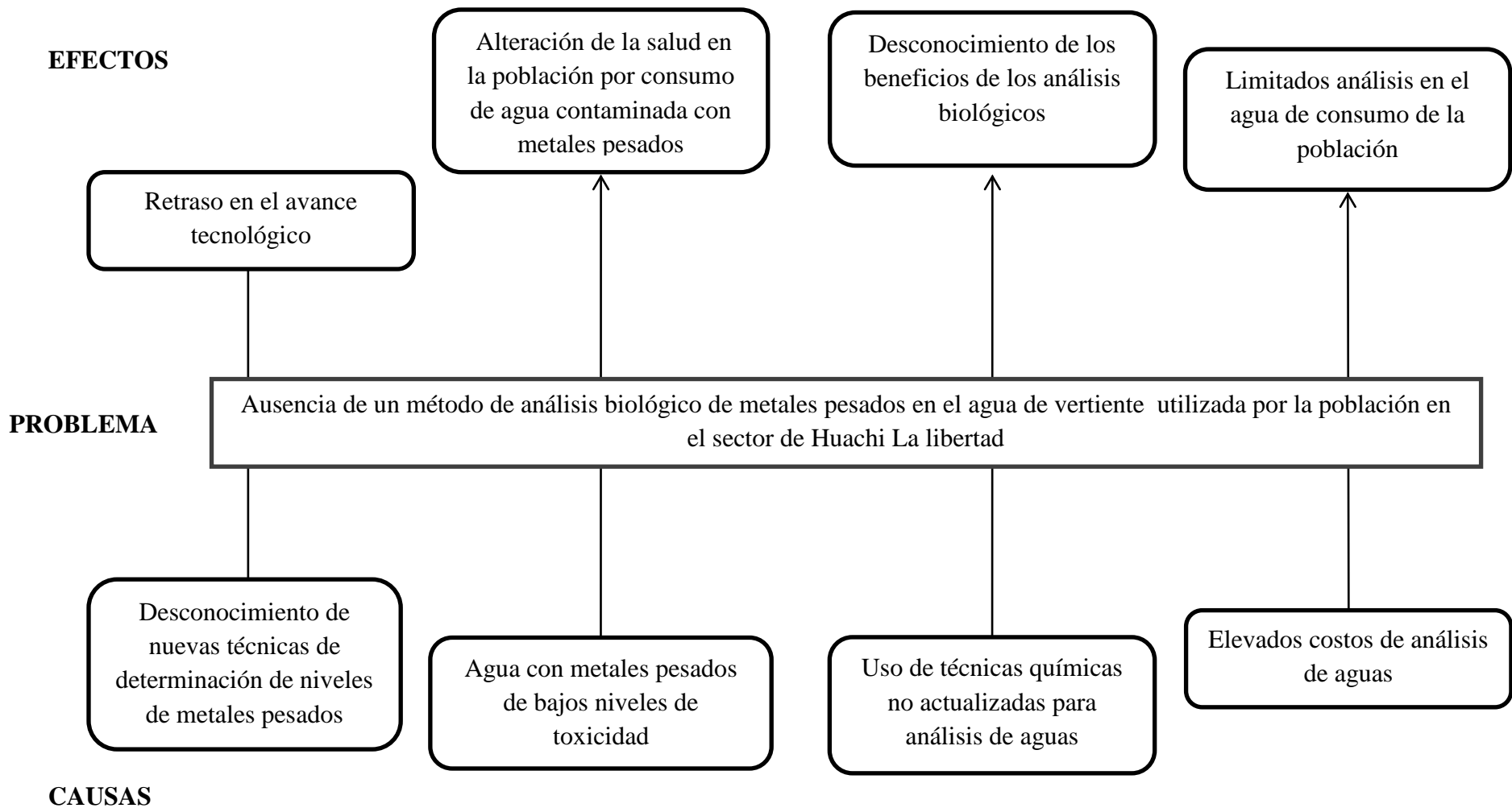


Figura 1.1 Árbol de problemas

### **1.2.3 Prognosis**

Ante la presencia de metales pesados tales como el arsénico, cadmio, plomo, zinc y estaño, el agua de vertiente puede contener una concentración alta de estos contaminantes, para lo cual se debería aplicar nuevas técnicas para la remoción de los mismos, si bien el agua de vertiente se la considera apta para tratarla con los métodos convencionales de potabilización, esta no ha sido analizada directamente con un ser vivo, por lo tanto si no se realiza la investigación, el crecimiento tecnológico se perderá y en muchos casos el agua consumida no será analizada, por lo tanto no se identificará si el agua es apta para el consumo humano o su la aplicación en medios de cultivo, los estudios referentes a la toxicidad son necesarios, ya que las pruebas físicas y químicas no resultan suficientes para la valoración de los efectos potenciales sobre la vida acuática y terrestre, variados compuestos de baja toxicidad pueden encontrarse en el agua, los cuales no son identificados debido a los múltiples análisis, los cuales son específicos para cada componente y no pueden ser aplicados todos constantemente, además de tener costos elevados al usar químicos específicos, los consumidores pueden ingerir agua con altos niveles de metales pesados, los cuales se acumularían en el organismo, provocando enfermedades graves en el futuro del consumidor. Esta metodología servirá de bases para aplicar técnicas innovadoras en nuevos campos de análisis y tratamientos de agua.

### **1.2.4 Formulación del problema**

¿La utilización del microcrustáceo *Daphnia magna* aportará a la incorporación de nuevos bioensayos de toxicidad para determinar dosis letales por metales pesados en el agua para asegurar su uso por la población en el sector de Huachi La Libertad?

### **1.2.5 Preguntas directrices**

¿Cuáles son las condiciones óptimas de crecimiento de *Daphnia magna*?

¿Cuál es la concentración letal media por metales pesados para *Daphnia magna*?

¿Cómo se determina la concentración letal media de metales pesados presentes en el agua de vertiente?

### **1.2.6 Delimitación**

**Área:** Biotecnología Ambiental

**Sub-área:** Análisis de aguas

**Sector:** Indicadores Biológicos

**Sub-sector:** Tecnología con *Daphnia magna*

**Delimitación espacial:** Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

**Delimitación temporal:** Noviembre 2011 /Junio del 2012

### **1.3 Justificación**

El presente proyecto se realiza con el fin de incorporar técnicas biológicas en el análisis de metales pesados en el agua, tales como el arsénico, cadmio, plomo, zinc y estaño, ya que actualmente muchos de estos procesos requieren de reactivos químicos de costos elevados, por lo que cada día se busca nuevos procesos económicos que sean fácilmente reproducibles y confiables.

El organismo a utilizar *Daphnia* es un microcrustáceo usado en muchos países como un indicador biológico de agua dulce, el cual permite identificar que en el agua donde habita no contiene elementos nocivos para la vida, este organismo presenta alta sensibilidad a la presencia de metales pesados especialmente arsénico y no pueden exponerse a los mismos por más de 24 horas, ya que al cabo de este tiempo mueren, esto permite determinar que el agua a analizar no es apta para ser consumida por ningún organismo.

El procedimiento a utilizar es relativamente sencillo por lo que se busca incorporarlo en las plantas de análisis y tratamiento de aguas, con el fin de detectar la más mínima concentración de tóxicos que afecten al organismo, ya que algunas personas pueden ser más vulnerables que la población en general a los contaminantes presentes en el agua potable. Las personas bajo tratamientos médicos, los pacientes de trasplante de órganos, los niños y

bebés, los ancianos que tengan salud frágil, las mujeres embarazadas y sus fetos pueden correr riesgos adicionales de contraer alguna enfermedad.

Si el agua es aplicada en los cultivos, estos pueden recoger los metales presentes y acumularlos en su constitución, consecuentemente serán ingeridos por la población.

Con esta técnica se pueden reducir costos de operación, pues se utilizan organismos de fácil cultivo y de rápido crecimiento, además se pretende innovar las tecnologías ya existentes, para que puedan ser utilizadas en distintas plantas de tratamiento de agua.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Determinar niveles de toxicidad mediante la aplicación de una técnica biológica con *Daphnia magna* (Crustácea: Cladóceras) en el agua de vertiente utilizada en el sector de Huachi La Libertad.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de *Daphnia magna* en diferentes medios de cultivo
- Identificar la concentración letal media de metales para *Daphnia magna* utilizando Dicromato de potasio como tóxico de referencia.
- Determinar la concentración letal media de metales pesados (arsénico) en la muestra de agua de vertiente tomando como referencia los datos obtenidos con el tóxico de referencia.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

En el XVIII Congreso de Investigación realizado en el Centro Universitario Anglo Mexicano Morelas, en el área de biología, se realizó un proyecto cuyo objetivo fue comprobar la sensibilidad de la *Daphnia magna* a los niveles reducidos de toxicidad en las aguas. Según Barrios (2007), su hipótesis fue que mientras más alto sea el nivel de toxicidad más alta será la tasa de mortalidad, es decir el porcentaje de mortalidad está directamente relacionado con que tan alto sean los niveles de toxicidad en las aguas.

Utilizaron para su objetivo el organismo *Daphnia magna*, que es una pequeña “pulga de agua” que mide alrededor de 1mm y 3 mm; habita en lagos, ríos y lagunas y se alimenta de algas microscópicas.

Se usa las especies de *Daphnia* para bioensayos ya que sus resultados son comparables, debido a su fácil manejo además de que en general *Daphnia* es menos tolerante que los peces a las sustancias tóxicas (Castañeda, 2001).

Esta pequeña pulga es capaz de medir niveles de toxicidad muy bajos, principalmente se utiliza para medir los metales que se encuentran disueltos en el agua así como arsénico, mercurio, bromo entre otros (Barrios y otros, 2007).

Castillo (2004), citado por Díaz y otros (2008), señalan que el género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceras de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura,

luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos compuestos tóxicos, los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y agua de poro de sedimentos, entre otros.

*Daphnia* es una especie que se reproduce sexual y asexualmente, siendo esta última modalidad reproductiva una característica importante en la implementación de cultivos controlados de laboratorio. Según Martínez (2003), se tiene bien documentado que la reproducción asexual, que se realiza mediante partenogénesis (anexo J-6), se presenta principalmente cuando las condiciones de desarrollo son las adecuadas, produciéndose entonces camadas exclusivamente de hembras, que pueden a su vez alcanzar la fase reproductiva y continuar reproduciéndose de manera asexual mientras persistan condiciones favorables de alimentación, baja densidad poblacional, y los principales factores ambientales y de calidad química del agua sean los adecuados.

Martínez (2003), además indica que 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 (Anexo J-5), dando como consecuencia la formación de una estructura de resistencia conocida como efipio (anexo J-1), que contiene uno o dos embriones (dependiendo de la especie) en estado latente, y que mantienen la diapausa hasta que se propician condiciones ambientales adecuadas para que se reinicie el desarrollo embrionario y emerjan juveniles que pueden dar inicio a un nuevo ciclo de reproducción asexual.

Baldwin y colaboradores (1997); Gerritsen (1997); Ankley y otros, (1998), citado por Sánchez (2002), mencionan que existen estudios que demuestran la capacidad de determinados compuestos disruptores endocrinos de interferir en el metabolismo hormonal, inducir la masculinización, reducir la fecundidad y en última instancia afectar la reproducción de *Daphnia magna*

Castro y otros (2002), señalan que el medio acuático es quien frecuentemente recibe las consecuencias de las actividades antrópicas, entre ellas la actividad industrial. En los efluentes se encuentran una serie de sustancias contaminantes, tanto orgánicas como

inorgánicas, que ponen en riesgo la salud del ecosistema. Los bioensayos de laboratorio posibilitan tener un primer acercamiento al posible impacto que produce un tóxico aislado o una mezcla de ellos, máxime cuando se considera una batería de bioensayos con organismos con un nicho ecológico particular, en los ambientes dulceacuícolas.

Organizaciones internacionales (ASTM, 1996; OECD, 1993; ISO, 1996; EC, 1992 y USEPA, 1994) han estandarizado metodologías para la realización de estos bioensayos con distintos organismos, en donde además se describen métodos de cultivo, condiciones de los experimentos, aplicabilidades y restricciones. El Servicio Ambiental Canadiense (EPS, 1990) indica la realización de bioensayos de toxicidad triplicados consecutivos para una correcta calibración intra-laboratorio (Silva y otros, 2003)

Un problema en la toxicidad es la variabilidad en la susceptibilidad, esto quiere decir que un tóxico puede afectar más que otro, es por eso que se han hecho estudios toxicológicos con *Daphnia* para determinar la dosis o concentración que mata a la mitad de los sujetos de prueba, esta concentración es llamada concentración letal 50 o CL<sub>50</sub> (Persoone y otros, 2009)

Distintas empresas usan esta técnica para evaluar la reducción de la toxicidad de sus efluentes, evaluando el efecto letal sobre organismos vivos. De acuerdo a esto, se plantea determinar un sistema de tratamiento biológico más efectivo en la disminución de la toxicidad de efluentes provenientes de las industrias a través de la respuesta aguda (LC<sub>50</sub> 48 horas) mediante *Daphnia magna* (Altindag, 2008)

Villegas y otros (1999), citado por Movahedian (2005), reportaron que usan *Daphnia magna* como un indicador de toxicidad en efluentes de industrias textiles, mostrando así que los análisis toxicológicos combinados con los análisis físico-químicos son esenciales en la evaluación de la calidad de los efluentes y también en el aseguramiento de una planta de tratamiento eficiente en México

Biesenger y otros (1997), citado por Núñez y Hurtado (2005), señalan que instituciones en todo el mundo, como la EPA de Estados Unidos están desarrollando estrategias de biomonitoreo ambiental para determinar el grado de contaminación en el medio ambiente.



La investigación en ecotoxicología con diferentes especies de *Daphnias* ocupa un importante lugar en la evaluación de los contaminantes del agua en ciertos ecosistemas. Sus características genéticas, fisiológicas, nutricionales y funcionales han sido evaluadas comparando los cambios que se producen en estos organismos, fundamentalmente en presencia de agentes tóxicos. Ello ha dado lugar a la existencia de protocolos normalizados con *Daphnias* para ensayos de toxicidad.

Los estudios convencionales son efectuados de manera “estática”, es decir, incorporando el agente tóxico en el medio en el que viven estos organismos, y comprobando posteriormente el porcentaje de inmovilización en relación al número total de *Daphnia magna* empleada. No obstante estos organismos poseen numerosos parámetros que pueden ser evaluados de forma directa, es decir mientras que se produce la exposición o inmediatamente después de la misma, siendo ésta la base del diseño de los experimentos “on line” (Martínez y otros, 2006).

## **2.2 Fundamentación filosófica**

La presente investigación se basa en aplicar técnicas existentes en la naturaleza, pues la *Daphnia magna* permite conocer que el agua en donde habita no presenta toxicidad, y por lo tanto este conocimiento puede ser adaptado a nivel de laboratorio para determinar una concentración adecuada de metales que puedan matar a *Daphnia*, con esto se establece una concentración permitida de estos contaminantes sin que afecten a la vida, por lo tanto este estudio se aplica un paradigma positivista, ya que se basa en leyes que permiten predecir, controlar y explicar fenómenos naturales, y que pueden ser descritas con métodos y técnicas por parte del investigador, y además puede ser estandarizado para ser usado en cualquier lugar del mundo, para su análisis se puede usar el paradigma cualitativo, pues se recoge datos y se analiza experimentalmente mediante técnicas estadísticas, con el fin de verificar la investigación realizada.

## **2.3 Fundamentación legal**

### **Ley de Aguas**

Codificación 16, Registro Oficial 339 de 20 de Mayo del 2004.

**Art. 2.-** Las aguas de ríos, lagos, lagunas, manantiales que nacen y mueren en una misma heredad, nevados, caídas naturales y otras fuentes, y las subterráneas, afloradas o no, son bienes nacionales de uso público, están fuera del comercio y su dominio es inalienable e imprescriptible; no son susceptibles de posesión, accesión o cualquier otro modo de apropiación.

No hay ni se reconoce derechos de dominio adquiridos sobre ellas y los preexistentes sólo se limitan a su uso en cuanto sea eficiente y de acuerdo con esta Ley.

**Art. 4.-** Son también bienes nacionales de uso público, el lecho y subsuelo del mar interior y territorial, de los ríos, lagos o lagunas, quebradas, esteros y otros cursos o embalses permanentes de agua.

**Art. 13.-** Para el aprovechamiento de los recursos hidrológicos, corresponde al Consejo Nacional de Recursos Hídricos:

- a) Planificar su mejor utilización y desarrollo;
- b) Realizar evaluaciones e inventarios;
- c) Delimitar las zonas de protección;
- d) Declarar estados de emergencia y arbitrar medidas necesarias para proteger las aguas; y,
- e) Propender a la protección y desarrollo de las cuencas hidrográficas.

**Art. 21.-** El usuario de un derecho de aprovechamiento, utilizará las aguas con la mayor eficiencia y economía, debiendo contribuir a la conservación y mantenimiento de las obras e instalaciones de que dispone para su ejercicio.

## **Normas INEN**

La norma NTE INEN 1 108:2006 establece valores para el agua potable (Anexo A)

Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el agua potable para consumo humano.

Se aplica al agua potable de los sistemas de abastecimiento públicos y privados a través de redes de distribución y tanqueros.

## **Normas y requisitos de homologaciones nacionales e internacionales**

### **Norma NSF/ANSI 61**

Titulada “Efectos sobre la salud de los componentes de los sistemas de tratamiento de agua potable”. Para cumplir esta norma, los materiales de estanquidad tienen que someterse a un proceso de certificación externo, que requiere la revelación de la fórmula íntegra, la realización de un análisis toxicológico y su revisión por parte de la NSF.

### **EPA (Environmental Protection Agency)**

La EPA ha elaborado la norma para el agua potable con dos niveles de protección.

- La meta de Nivel Máximo Contaminante (MCLG) es cero. Este es el nivel que se considera seguro, independientemente de la viabilidad de conseguirlo.
- La determinación final de la EPA marca un nivel de acción de 15 µg/L.

Para el nivel de arsénico estándar para el agua bebible es de 0.010 partes por millón para proteger a los consumidores de los efectos de larga exposición a este elemento.

### **Serie de normas ISO publicadas**

#### **• ISO 24510**

Actividades relacionadas con los servicios de agua potable y agua residual.

Esta norma establece directrices para la evaluación y mejora del servicio a los usuarios.

#### **• ISO 24511**

Actividades relacionadas con los servicios de agua potable y agua residual.

Esta norma establece directrices para la gestión de las entidades prestadoras de servicios de agua residual y para la evaluación de los servicios de agua residual.

• **ISO 6341-1996**

Esta Norma Internacional describe un método para la determinación de la toxicidad aguda frente a *Daphnia magna Straus* (*Cladocera, Crustacea*) de:

- a) sustancias químicas solubles en las condiciones del ensayo, o que pueden mantenerse en suspensión o en dispersión estable en las condiciones de ensayo;
- b) efluentes industriales o urbanos, tratados o no, después de decantación, filtración o centrifugación, si es necesario;
- c) aguas superficiales o aguas subterráneas.

## 2.4 Categorías fundamentales

### Red de inclusión de variables

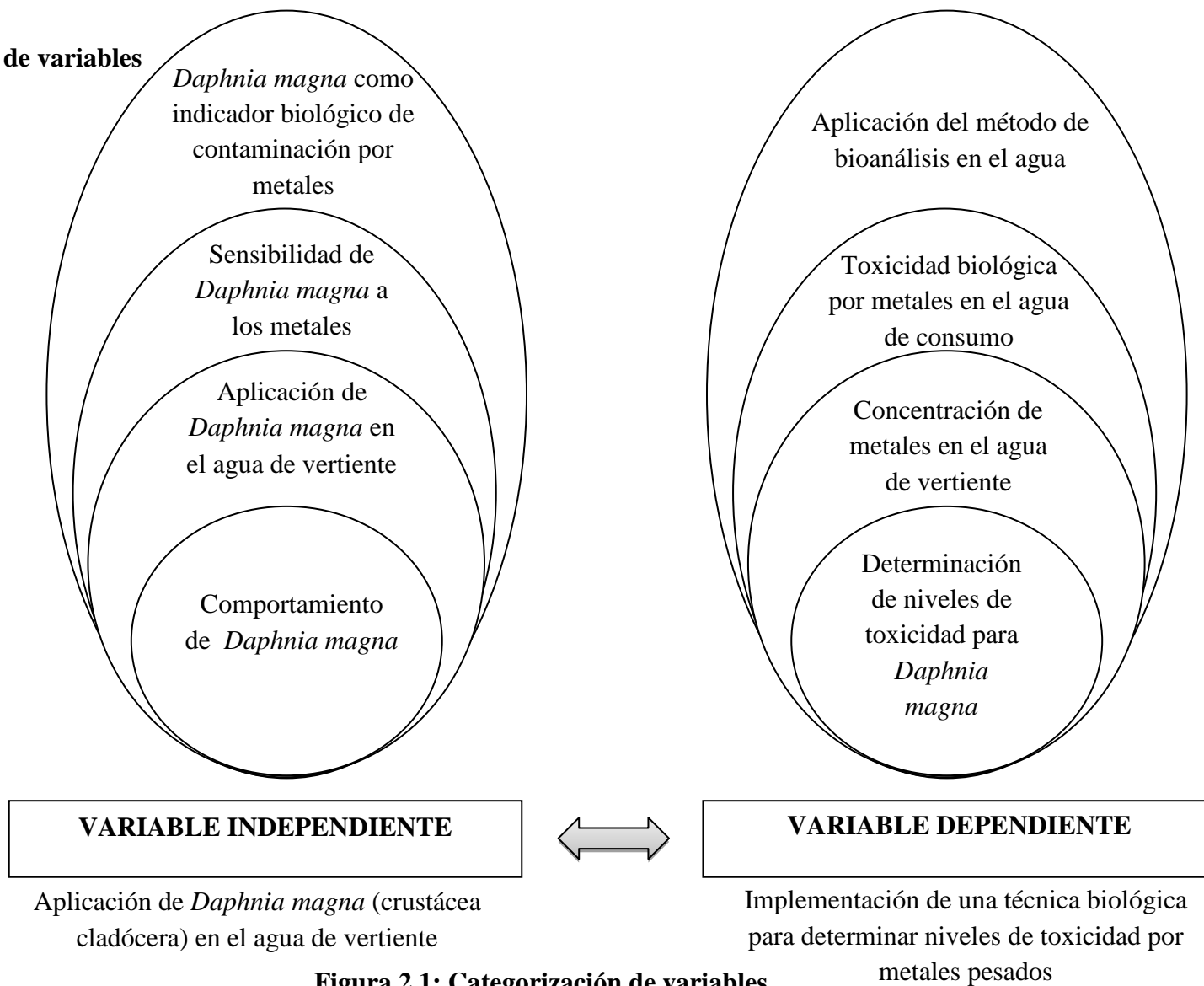


Figura 2.1: Categorización de variables

### 2.4.1 Marco teórico de la variable independiente

Los cladóceros, son pequeños crustáceos de agua dulce comúnmente llamados pulgas de agua, por su pequeño tamaño y por su movimiento en el agua (Snell, 1988). Muchas especies de agua dulce de la familia *Daphniidae*, orden Cladóceras, son cosmopolitas. El género *Daphnia spp.*, es el más diverso de los daphnidos y es el mejor alimento para peces dulceacuícolas en desarrollo y adultos. *Daphnia magna* se ha usado por muchos años como alimento en muchas piscifactorías.

Las pulgas de agua o *Daphnias* se reproducen por partenogénesis. Las hembras producen huevos diploides (que contienen dos copias del cromosoma), subitáneos o vírgenes de los que vuelven a nacer hembras. Dado que de este modo no se mezclan los genes, todos los descendientes son idénticos a sus madres que prácticamente se clonan a sí mismas y a una velocidad increíble: durante un período de vida máximo de dos meses, una hembra cada tres días produce hasta cinco crías, que a su vez, están en condiciones de reproducirse a partir del sexto día. En unas pocas semanas, una población así podría alcanzar más de cien individuos. Bajo determinadas condiciones externas (por ejemplo superpoblación), algunos huevos se definen masculinos (la determinación del género es fenotípica; los cromosomas sexuales no inciden).

Otros factores ambientales – en su mayoría desfavorables – determinan la formación de huevos haploides (que contienen una única copia cromosómica) de resistencia o diapausa. Para no perecer, deben ser fecundados antes de ingresar a la cavidad incubadora.

Los huevos de resistencia están protegidos por membranas especiales y recién se desarrollan después de un período de inactividad que puede durar semanas o años.

En la actualidad los protocolos de prueba con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) y *Artemia franciscana*, se encuentran publicados en México por la entonces Secofi (1995) y forman parte de los métodos normados para la evaluación de toxicidad en agua.

## **2.4.2 Marco teórico de la variable dependiente**

TULAS define a la toxicidad en el agua como la propiedad de una sustancia, elemento o compuesto, de causar efecto letal u otro efecto nocivo en 4 días a los organismos utilizados para el bioensayo acuático.

La toxicidad procede de una bioacumulación, definida como un proceso mediante el cual circulan y se van acumulando a lo largo de la cadena trófica una serie de sustancias tóxicas, las cuales pueden alcanzar concentraciones muy elevadas en un determinado nivel.

Las sustancias tóxicas pueden ser metales de número atómico elevado, como arsénico, cadmio, cobre, cromo, hierro, manganeso, mercurio, níquel, plomo, y zinc, entre otros, que son tóxicos en concentraciones reducidas y tienden a la bioacumulación.

El término “dosis” se refiere a la concentración o cantidad de una sustancia que hay en el interior de una persona u organismo expuesto. En el ámbito de la salud laboral, las normas y directrices suelen expresarse en términos de exposición, o de concentraciones límite-permisibles en situaciones concretas, como por ejemplo en el aire del lugar de trabajo

Varios gobiernos, industrias privadas, grupos ecológicos y académicos se unen para salvar el agua contaminada por metales pesados tóxicos de aguas residuales arrojadas a los ríos sin control por varias industrias a lo largo de las riberas. Uno de los más perniciosos es el cromo, que puede causar dermatitis y, en concentraciones altas, hasta cáncer. Se aplican técnicas en microbiología para ayudar a resolver el problema, aislando microbios que producen gas de sulfuro de hidrógeno. Este gas precipita y transforma el cromo en un compuesto mucho menos tóxico, lo cual torna más manejable el metal y disminuye el riesgo de aislarlo. En el laboratorio, los microbios reducen el cromo en un 99% en cuatro a siete días. Se hallan en marcha ahora investigaciones para establecer una comprensión detallada de lo que sucede a la bacteria durante y después del tratamiento, y se diseña una versión más eficiente, de amplia escala (Lean, 2008).

Las pruebas de toxicidad, bioensayos o ensayos biológicos, son empleadas para evaluar los efectos que un contaminante o una mezcla de ellos es capaz de causar en los organismos de

prueba expuestos a diferentes dosis (medidas como series de diluciones de la muestra de prueba).

No todos los efectos observados en los organismos vivos pueden ser utilizados en el desarrollo de estudios toxicológicos. Es necesario que los efectos tengan un significado ecológico bien definido, por ello la muerte y la afectación sobre las funciones biológicas fundamentales, tales como la reproducción y el crecimiento, son las más empleadas en el desarrollo de pruebas, ya que son las que inciden de manera más relevante sobre el desempeño de las comunidades acuáticas, sus interrelaciones recíprocas y la dinámica de los ecosistemas.

Es importante realizar una calibración del método, la calibración es un proceso cuyo objetivo es determinar la precisión y exactitud que debe alcanzarse en los resultados generados por un determinado bioensayo. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a un xenobiótico se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto de la sensibilidad de los organismos como a fallas operacionales en la aplicación del método.

La determinación de la  $CL_{50}$ , se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias; en el desarrollo de pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos, por ejemplo, ante ciertos biocidas. En la investigación fitoquímica valiéndose del principio de que farmacología es simplemente toxicología a bajas concentraciones o toxicología es farmacología a concentraciones altas se puede correlacionar la bioactividad con el valor de la  $CL_{50}$  y al mismo tiempo su grado de toxicidad.

Tomando en cuenta la relevancia de fortalecer el marco legal dirigido al control de descargas de agentes químicos potencialmente peligrosos, y tratar de evitar daños deletéreos en los ecosistemas acuáticos, las pruebas de toxicidad adquieren una especial importancia ya que son la única clase de herramientas analíticas que permite evidenciar los efectos y complementar objetivamente la información que surge de los procedimientos químicos ya adoptados y tradicionalmente empleados para el control de la calidad y contaminación del agua (Granados y otros, 2008).



## **2.5 Hipótesis**

Hi: La aplicación de *Daphnia magna* en el agua de vertiente permite determinar los niveles de toxicidad por metales pesados

## **2.6 Señalamiento de variables**

### **Variable independiente**

Aplicación de *Daphnia magna* (crustácea cladócer) en el agua de vertiente

### **Variable dependiente**

Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Enfoque**

Este trabajo de investigación tiene un enfoque cuantitativo porque se analiza la concentración existente de ciertos metales pesados en el agua utilizada por la población en un determinado sector. Se utilizará un bioensayo aplicando *Daphnia magna* en determinadas muestras de agua, las cuales presentan una concentración desconocida de tóxicos, que se llegará a determinar mediante comparaciones con los efectos causados mediante una concentración conocida de tóxico aplicado en un medio de cultivo inicialmente libre de metales.

#### **3.2 Modalidad básica de la investigación**

Dentro del presente trabajo se utilizaron las siguientes modalidades de investigación:

##### **Investigación bibliográfica - documental**

Debido a que se requirió de fuentes tales como: libros, textos, revistas electrónicas y páginas de Internet.

##### **Investigación de campo**

Por cuanto la investigación se realizó en su mayor parte en el lugar de los hechos y el investigador toma contacto en forma directa con la realidad, lo cual ayudó a obtener información sobre la problemática en estudio.

## **Investigación Experimental**

Porque se relacionaron las variables de las hipótesis las cuales se pusieron a prueba para precisar la relación causa - efecto.

### **3.3 Nivel o tipo de investigación**

#### **Exploratorio**

El presente estudio propone una metodología no aplicada en nuestro país para el análisis y control de toxicidad en el agua a utilizar, mediante la tasa de mortalidad de *Daphnia magna* por consecuencia de los metales pesados

#### **Descriptivo**

Se recolectará datos acerca de las distintas concentraciones que pueden afectar a *Daphnia magna*. Estos datos se tabularon y permitieron observar las variaciones producidas en su desarrollo debido a la concentración de alimentos y contaminantes.

### **3.4 Población y muestra**

#### **3.4.1 Población**

La población considerada para la presente propuesta de investigación está compuesta por el agua de vertiente que recorre por la zona de Huachi la Libertad, la cual es recogida diariamente para su distinto uso, tanto agrícola como para la ingestión.

#### **3.4.2 Muestra**

La muestra está compuesta por 48 litros de agua recolectada al azar en distintas horas del día antes de la aplicación de *Daphnia magna* para analizar su toxicidad

### 3.5 Operacionalización de variables

Hipótesis	Variables	Indicadores	Índices
<p>La aplicación de <i>Daphnia magna</i> en el agua de vertiente permite determinar los niveles de toxicidad por metales pesados</p>	<p>VI</p> <p>Aplicación de <i>Daphnia magna</i> en el agua de vertiente</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Número de individuos</li> <li>- Tasa de reproducción</li> </ul>	<p>Unidades/L</p> <p>%</p>
	<p>VD</p> <p>Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de metales</li> <li>- Mortalidad de <i>Daphnia magna</i></li> </ul>	<p>µg/L</p> <p>%</p>

Elaborado por: Ricardo Garcés.

### 3.6 Recolección de información

Se recolectó los individuos de *Daphnia magna* en la ciudad de Ambato, en la laguna ubicada en el interior del parque Juan Benigno Vela, los cuales fueron trasladados en recipientes abiertos y con el agua propia del sector, estas fueron observadas bajo el microscopio compuesto para su diferenciación.

Se eligió las hembras de las cuales se observó su estado de gestación, gracias al uso del microscopio compuesto, apartándolas de la población con el uso de un gotero o una pipeta. De estas pulgas de agua se utilizó los neonatos para las pruebas de un medio de cultivo adecuado (Núñez y Hurtado, 2005).

Para el caso de las muestras de agua de vertiente, estas fueron recolectadas en el sector de Huachi La Libertad, su recolección se realizó de manera aleatoria en el transcurso de la mañana y en recipientes de plástico completamente limpios hasta completar 6 litros, posteriormente los envases se cerraron y trasladaron a los laboratorios, para ser preservados en refrigeración, por un período máximo de tres días, hasta el día de su aplicación para determinar su toxicidad por bioensayos con neonatos de *Daphnia magna*.

#### 3.6.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *Daphnia magna*

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un Diseño Experimental AxB.

**Tabla 3.1 Factores en estudio para el crecimiento de *Daphnia magna***

<b>Factor A:</b>	<b>Factor B:</b>
<b>Tipo de medio de cultivo</b>	<b>Tipo de alimento</b>
Agua potable declorificada o declorada	Jugo de alfalfa
Agua reconstituida	Levadura comercial de panadería
	Mezcla de jugo de alfalfa con levadura

## **Preparación de los medios de cultivo (Factor A)**

### **Cultivo A1**

Se utilizó agua potable declorada, para lo cual se dejó reposar 8 días, donde el cloro se eliminó por volatilización natural. Esta agua contiene una concentración de sales en bajas proporciones, la cual es distribuida por la planta de tratamiento de EMAPA, donde diariamente es evaluada para que cumpla con los requerimientos INEN para el agua potable en la misma empresa.

### **Cultivo A2**

Para su preparación se colocó 3.8 L de agua destilada en un garrafón, posteriormente se adicionó 0.453 g de  $MgSO_4$ , 0.726 g de  $NaHCO_3$  y 0.032 g de KCl. Se agitó hasta disolver completamente las sales. Paralelamente se disolvió 0.453 g de  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  en 200 ml de agua destilada, se utilizó un agitador magnético para la disolución de esta sal, posteriormente se incorporó la solución de  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  al garrafón, lo cual permitió obtener 4 L de agua dura reconstituida.

## **Tipos de Alimento (Factor B)**

Como fuentes de alimento se utilizó:

**B1)** 0.1 ml de jugo de alfalfa con una concentración de 0,1 g/ml en 200 ml de medio de cultivo.

**B2)** 0.1 ml de levadura fresca disuelta con una concentración de 0,1 g/ml en 200 ml de medio de cultivo

**B3)** 0,05 ml de jugo de alfalfa + 0,05 ml de levadura disuelta (B1 + B2)

Se colocó un total de 5 neonatos de *Daphnia magna* en cada unidad experimental

La alimentación se realizó cada tres días, con un cambio del medio de cultivo cada 8 días, se reemplazó el agua en un 70% por medio de cultivo fresco.

## CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO

**Réplicas:** 3

**Tratamientos:** 6

**Unidades experimentales:** 18

A1B1	A1B1	A1B1
A1B2	A1B2	A1B2
A1B3	A1B3	A1B3
A2B1	A2B1	A2B1
A2B2	A2B2	A2B2
A2B3	A2B3	A2B3

## PARÁMETROS Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN

**Tabla 3.2 Niveles de estudio para el desarrollo de *Daphnia magna***

<b>Indicador</b>	<b>Método</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Unidad</b>
Población máxima	Observación y Conteo	Cada 3 días	%
Tasa de reproducción	Conteo	mensual	%
Madurez reproductiva	Observación	Cada 3 días	días
Longevidad	Observación y conteo	Cada 3 días	días

Los neonatos fueron apartados de la población, se realizaron observaciones cada 3 días durante 30 días hasta que la primera hembra reproductiva murió, con esto se registró la tasa de reproducción.

El crecimiento y madurez reproductiva termina con el primer parto. El tiempo transcurrido entre el inicio del experimento y el primer parto define el tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual.

La longevidad de los individuos se determina con el seguimiento diario de los organismos adultos en cada uno de los recipientes de cultivo, hasta que el número de individuos disminuye.

El tiempo promedio de vida de los organismos corresponde al tiempo transcurrido desde el inicio del experimento hasta el primer caso de mortalidad natural.

Se determinó la tasa de reproducción mediante el método exponencial; este método implica el cálculo de una regresión exponencial mediante Mínimos Cuadrados Ordinarios (MCO). Se asume que la relación existente entre una variable dependiente (número de individuos) y otra independiente (el tiempo) se puede describir a través de la ecuación:

$$y_t = \alpha \cdot e^{\beta x}$$

Para poder aplicar el método de MCO se linealiza esta ecuación, para ello se aplica logaritmos naturales:

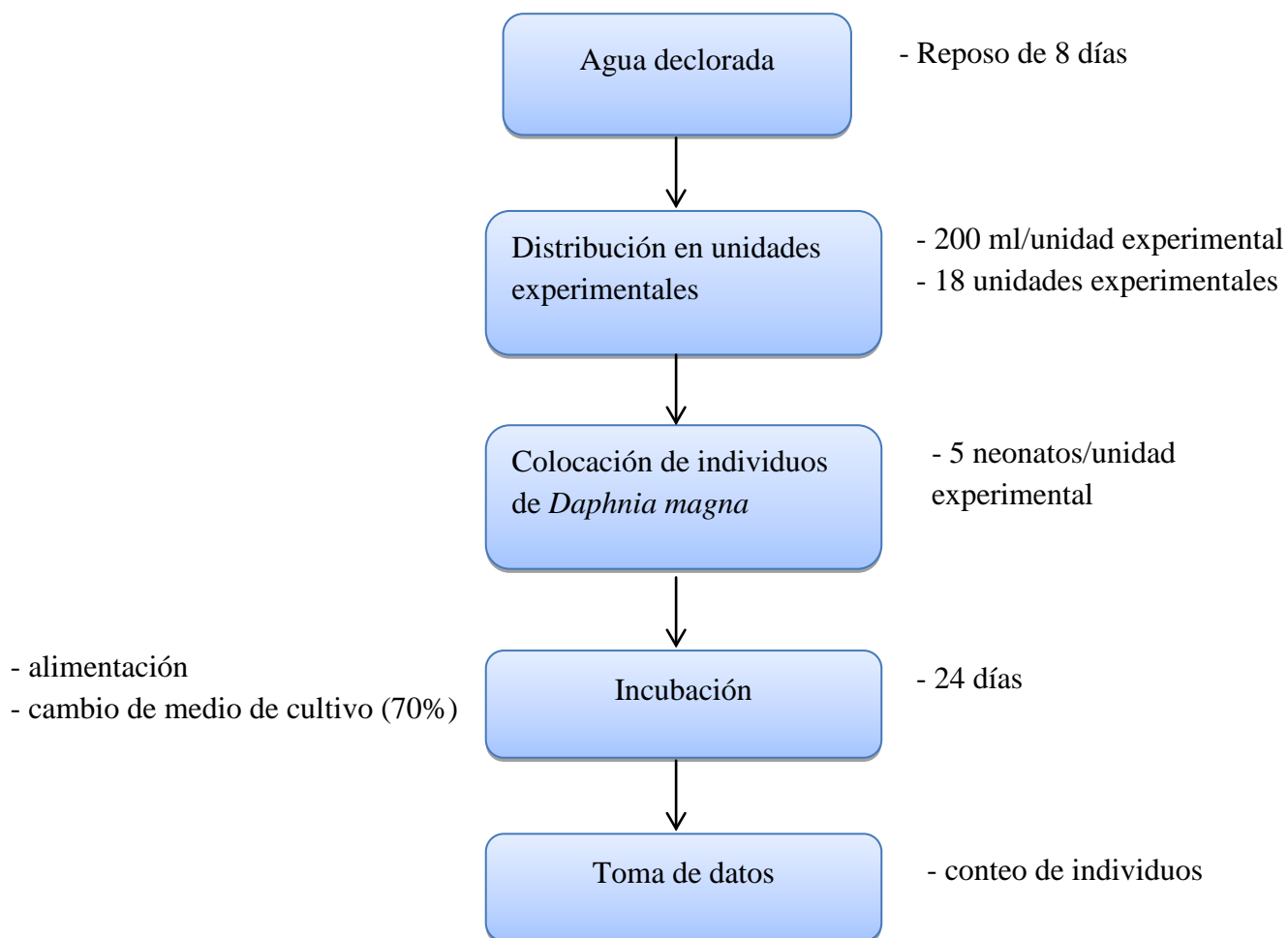
$$\ln y_t = \ln \alpha + \beta x$$

En este caso la tasa de reproducción está representada por el valor estimado de la pendiente:

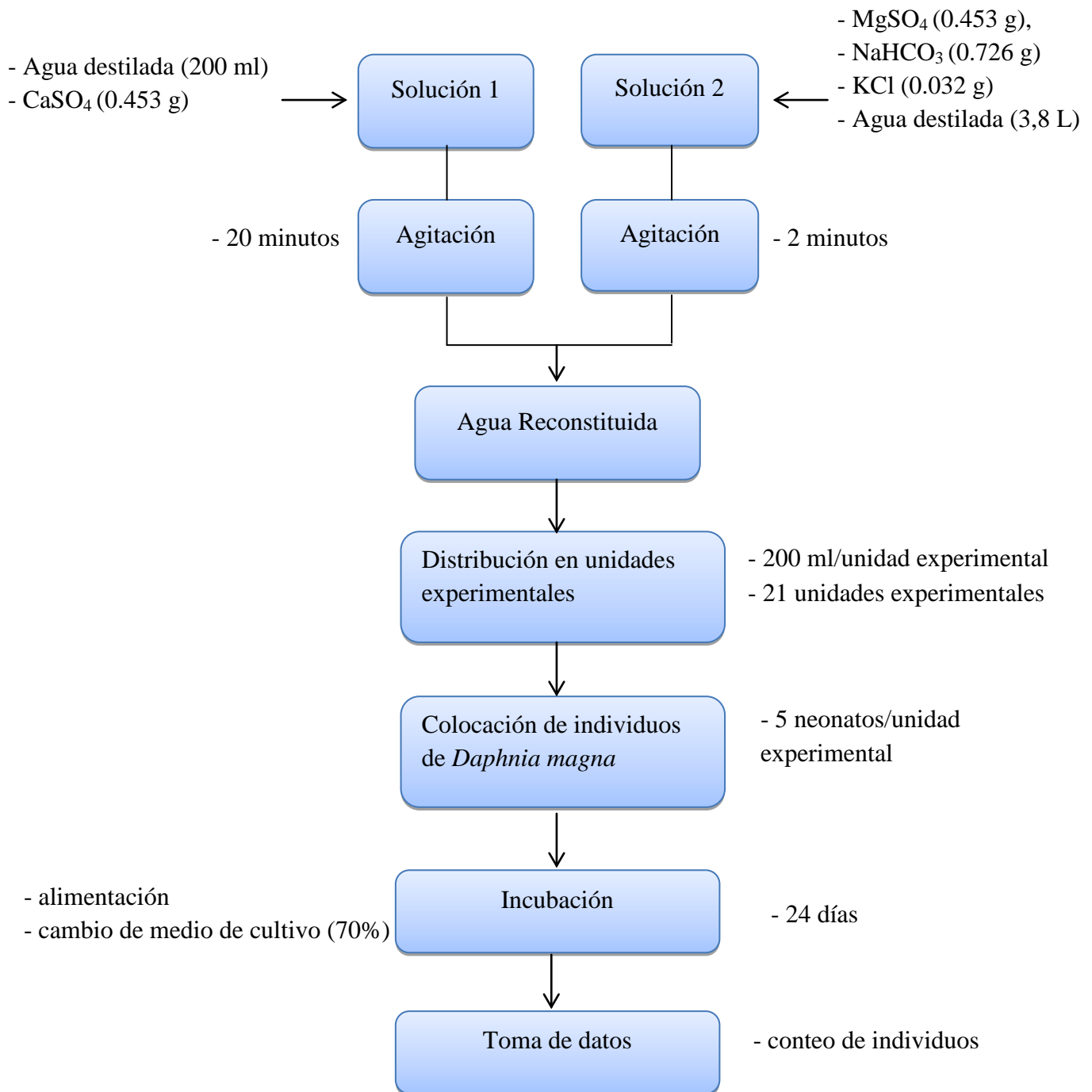
$$r = \beta$$



## DIAGRAMAS DEL PROCESO



**Figura 3.1** Proceso de cultivo de *Daphnia magna* en agua potable declorada



**Figura 3.2** Proceso de cultivo de *Daphnia magna* en agua reconstituida

### **3.6.2 Determinación de la concentración letal media de metales pesados para *Daphnia magna***

Para determinar la concentración letal media de *Daphnia magna* se realizó un bioensayo de toxicidad aguda, donde se utiliza neonatos del organismo para determinar la mortalidad en un plazo de 48 horas al someterse a metales pesados, para lo cual es necesario calibrar el método, se utiliza el Dicromato de potasio como tóxico de referencia pues es el recomendado por la norma ISO 6341-1982, además es el tóxico usado en calibraciones de la metodología aplicada en el Laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción en Chile (Silva y colaboradores, 2003).

Se utilizó el Método de Unidades Probabilísticas “Probit” el cual evalúa la relación concentración respuesta de un contaminante sobre un organismo. El método Probit se basa en la aplicación de correlaciones estadísticas de la vulnerabilidad de personas e instalaciones, en este caso el agua de ríos lagunas etc., ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos.

## **CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO**

**Réplicas:** 3

**Tratamientos:** 11

**Unidades experimentales:** 33

### **3.6.3 Preparación de las concentraciones de Dicromato de potasio como tóxico de referencia**

Para el tóxico de referencia se preparó una solución estándar de alta concentración en agua destilada (1 mg/L), de la cual se preparó varias diluciones a diferentes concentraciones con el medio de cultivo seleccionado como adecuado para el desarrollo de *Daphnia magna*

**Tabla 3.3 Factores en estudio para determinar la concentración letal media en *Daphnia magna***

<b>Factor A: reactivo</b> <b>Tóxico de referencia</b>	<b>Factor B: concentración</b> <b>Tóxico de referencia en 200 ml de agua reconstituida</b>
- Dicromato de potasio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blanco (0,0 mg/L)</li> <li>- 0,015 mg/L</li> <li>- 0,025 mg/L</li> <li>- 0,045 mg/L</li> <li>- 0,065 mg/L</li> <li>- 0,085 mg/L</li> <li>- 0,100 mg/L</li> <li>- 0,120 mg/L</li> <li>- 0,140 mg/L</li> <li>- 0,160 mg/L</li> <li>- Control positivo (1,0 mg/L)</li> </ul>

Se utilizaron neonatos de *Daphnia magna* para la prueba, según Barrios y otros (2007), estos no requieren de alimento por 4 días, pues desde el nacimiento ya contienen los nutrientes necesarios para alimentarse hasta adaptarse al medio donde habitan, además son más sensibles a los tóxicos que puedan presentarse.

Se colocaron 10 neonatos en cada unidad experimental.

**Tabla 3.4 Parámetros y criterios de evaluación en el desarrollo de *Daphnia magna***

<b>Indicador</b>	<b>Método</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Unidad</b>
Mortalidad de individuos	Observación y Conteo	Las primeras 48 horas	%

### 3.6.4 Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)

La concentración letal media se refiere a la concentración de tóxicos que mata al 50% de los organismos a prueba.

Según Castillo (2004), los neonatos no sobrevivirán a las primeras 48 horas si la concentración de tóxico es muy alta para la supervivencia de un organismo, por lo tanto si más del 50% de individuos sobrevive se determina que el agua es adecuada para el consumo humano

Se realizó la cuantificación de organismos a 1 y 48 horas determinándose su muerte como ausencia de movimiento. Se efectuaron mediciones de control durante la prueba, pH cercano a la neutralidad y la temperatura se mantuvo dentro del intervalo de 20-25 °C.

Los recipientes se cubrieron para reducir la evaporación de las diluciones de prueba y evitar que se depositaran polvo u otros materiales contaminantes.

### **Descripción del método “Probit”**

Para calcular la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se utilizó el método de Unidades Probabilísticas o “Probit” al 95%, para lo cual se determinó en primer lugar el porcentaje de efecto de los tóxicos sobre los organismos a prueba con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

n = número de individuos

r = número de organismos muertos y deformes

p = porcentaje de efecto

Luego se transformó las concentraciones de tóxico utilizadas en cada dilución a una escala logarítmica  $X = \log_{10}(d)$ , para obtener una curva sigmoidea normal o de forma “S” en la representación gráfica de la relación dosis – respuesta, con este paso se evita dificultades en la construcción de un modelo lineal, se debe trabajar con números positivos, por lo tanto si se obtiene un logaritmo negativo se le sumó una unidad a todos los valores hasta hacerlos positivos.

Posteriormente mediante tablas de Probit (Anexo G) se transformó el porcentaje de efecto (p) a unidades Probit, con los cuales se graficó la relación concentración o dosis (x) con los

valores Probit ( $y$ ), se obtiene una distribución de puntos para procesarlos mediante un análisis de regresión lineal, generando la siguiente ecuación:

$$y = a + bx$$

Luego se estima con el modelo calculado la concentración de tóxico o dosis para un 50% de mortalidad, en unidades Probit correspondería a 5. ( $y = 5$ )

$$5 = a + bx$$

Se despeja la concentración ( $x$ )

$$x = \frac{5 - a}{b}$$

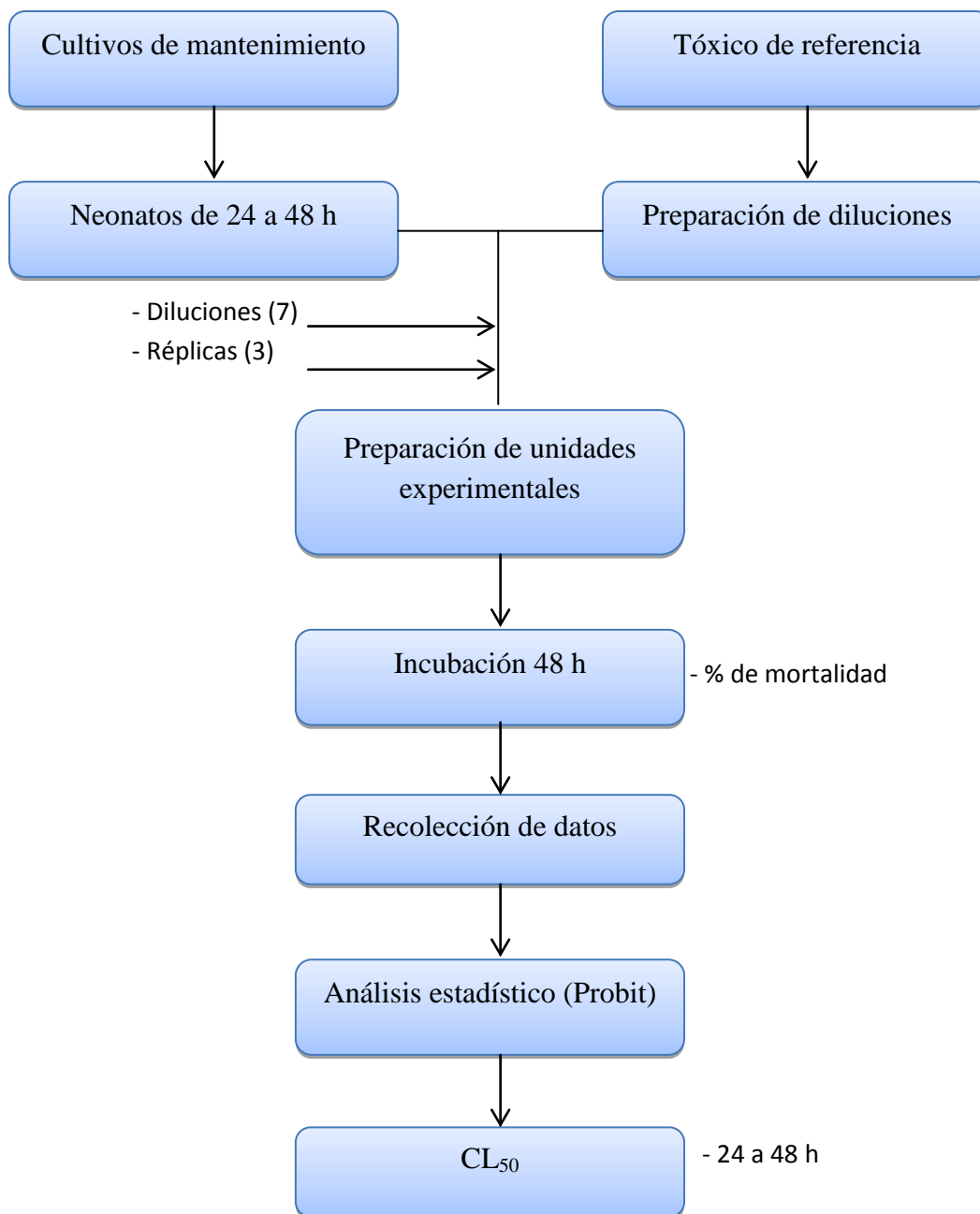
Consecuentemente se resta la unidad a la concentración obtenida, inicialmente sumada en la transformación logarítmica

$$x = \left( \frac{5 - a}{b} \right) - 1$$

se aplica antilogaritmo y obtiene la concentración letal que mata al 50% de organismos a prueba o  $CL_{50}$ .

$$CL_{50} = \frac{\left( \frac{5 - a}{b} \right) - 1}{\text{antilog}}$$

## DIAGRAMAS DEL PROCESO



**Figura 3.3 Procedimiento para obtener la concentración letal 50**

### 3.6.5 Determinación de la concentración de tóxicos presentes en el agua de vertiente

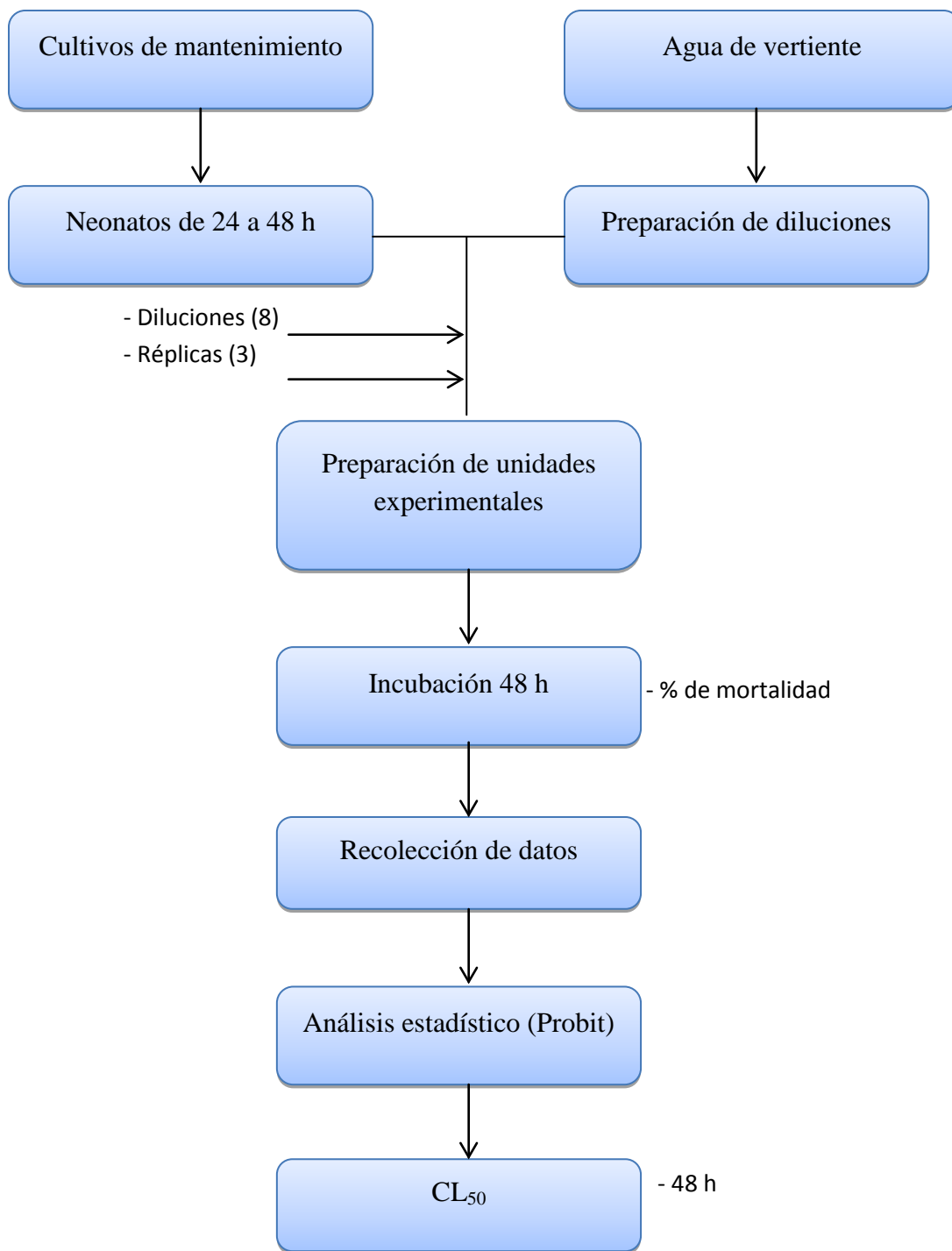
Para este objetivo se realizó el mismo proceso descrito con el Dicromato de potasio, se reemplazó el agua de medio de cultivo por el agua de vertiente sin la adición del tóxico de referencia, se realizó distintas soluciones con el medio de cultivo elegido como óptimo para localizar la concentración letal (CL<sub>50</sub>)

**Tabla 3.5 Factores en estudio para determinar DL<sub>50</sub> en el agua de vertiente**

<b>Factor A: Muestra</b>	<b>Factor B: Dilución en 200 mL de agua reconstituida</b>
- Agua de vertiente	- Blanco (0,0 mg/L) - 100% - 87,5% - 75% - 62,5% - 50% - 37,5% - 25% - 12,5% - Control positivo (1,0 mg/L de Dicromato de potasio)



## DIAGRAMA DEL PROCESO



**Figura 3.4 Procedimiento para obtener la concentración letal media (CL<sub>50</sub>)**

Se obtuvo la información acerca del contenido de metales pesados en la planta de tratamiento Santa Marianita perteneciente a EMAPA, con el fin de tener una referencia confiable en cuanto a la concentración de metales pesados específicamente arsénico, debido a que es el metal que se encuentra en concentraciones considerables.

## **Descripción del proceso para la detección de arsénico**

### **Materiales y Equipos**

- Matraz con vidrio esmerilado
- Válvula de arsénico
- Filtros con sulfito de hidrogeno
- Prefiltro (rojo y negro)
- Papel filtro de etiqueta negra
- Papel filtro de etiqueta roja
- Reactivo A1 en sachet (ácido sulfámico)
- Reactivo A2 en pastilla (boro hidrato de sodio al 10%)
- Medidor de arsénico (arsenator)

### **PROCESO**

Se arma los Prefiltros, donde se coloca cada papel filtro de acuerdo al color. Se enciende el medidor de arsénico con cualquiera de los dos botones.

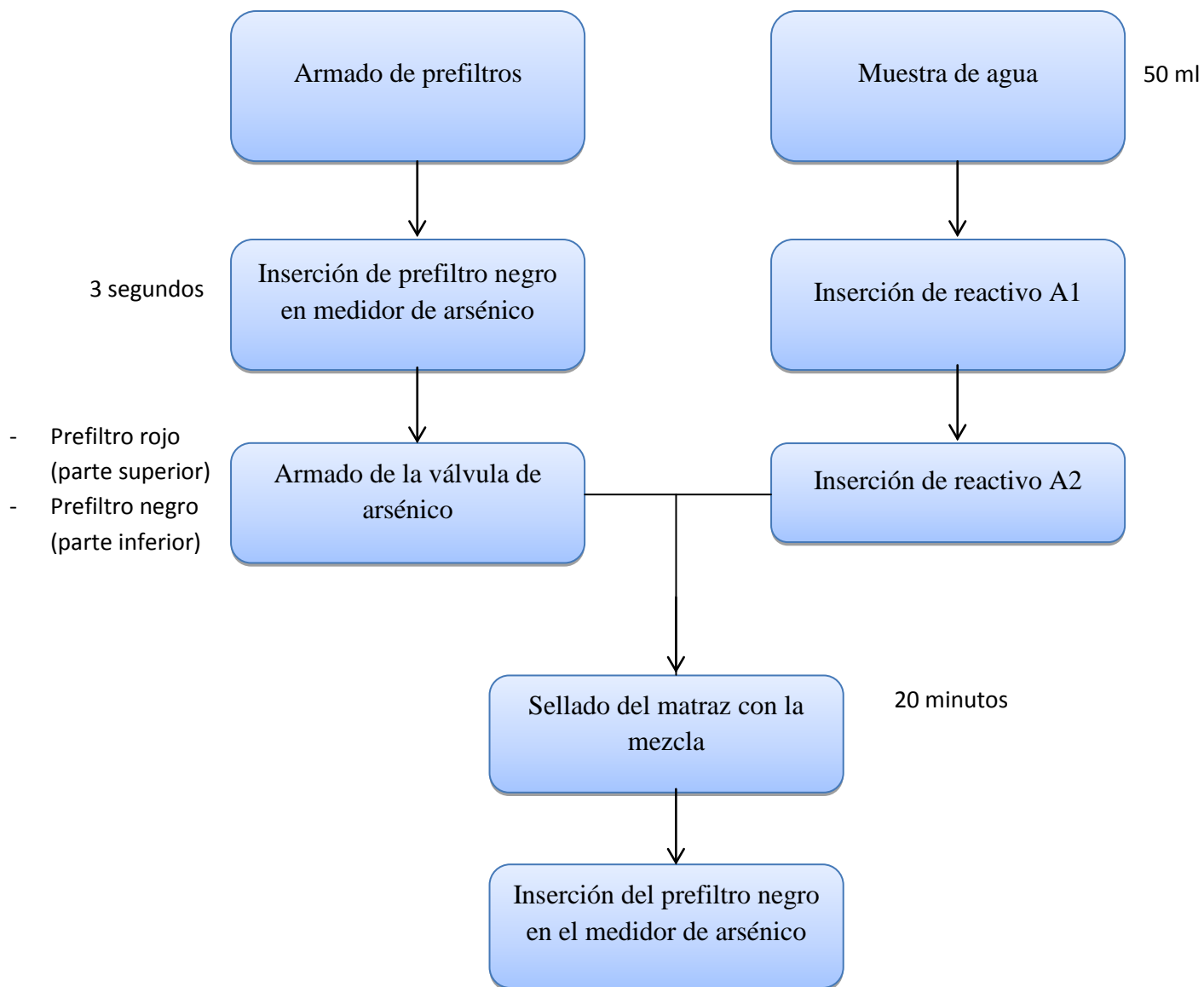
El prefiltro negro se incrusta en el medidor de arsénico por 3 segundos y al sacarlo comenzará un conteo de 20 minutos límite.

Los prefiltros son colocados en la válvula de arsénico, el prefiltro negro con el papel filtro grueso es colocado en la parte inferior, es el que recibirá los gases que detecten arsénico en la reacción. El prefiltro rojo es colocado en la parte superior con el papel filtro delgado, este filtro es de seguridad para evitar que salgan los gases que puedan atravesar el filtro negro

Se coloca 50 ml de la muestra de agua en el matraz, luego se coloca el Reactivo A1 y se agita. Con una pinza se coloca el reactivo A2 e inmediatamente se tapa el matraz con la válvula armada, para evitar la salida de los gases tóxicos. Al cabo de 20 minutos se retira el

prefiltro negro y se inserta en el medidor de arsénico, automáticamente proporciona la lectura en ppb ( $\mu\text{g}/\text{lt}$ )

### DIAGRAMA DEL PROCESO



**Figura 3.5 Procedimiento para medir arsénico con el kit comercial**

### **3.7 Procesamiento y análisis**

Para la evaluación estadística de los datos obtenidos en cuanto a la comparación entre los distintos medios de cultivo y su alimentación se usaron los programas de análisis estadístico Infostat versión 2007d y Statgraphics versión 5.1

Con respecto a la concentración letal media con el tóxico de referencia y el agua de vertiente se aplicó el análisis comparativo "t" de student en la hoja de cálculo Excel, con el fin de determinar si existen diferencias significativas con la toxicidad por metales pesados en el agua de vertiente y el agua de control.

Se presentan los datos en tablas comparativas con la concentración de tóxicos existentes en las muestras.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Datos preliminares

Para establecer el medio adecuado para el cultivo de *Daphnia magna*, se evaluó las distintas combinaciones de los factores medio de cultivo y alimento. En la Tabla 4.1 se indica los resultados promedio y desviación estándar de la población máxima alcanzada de *Daphnia magna* en diferentes medios de cultivo.

La máxima población alcanzada se observó hasta el día 24, después del cual las primeras hembras reproductivas fallecían. (Anexo B)

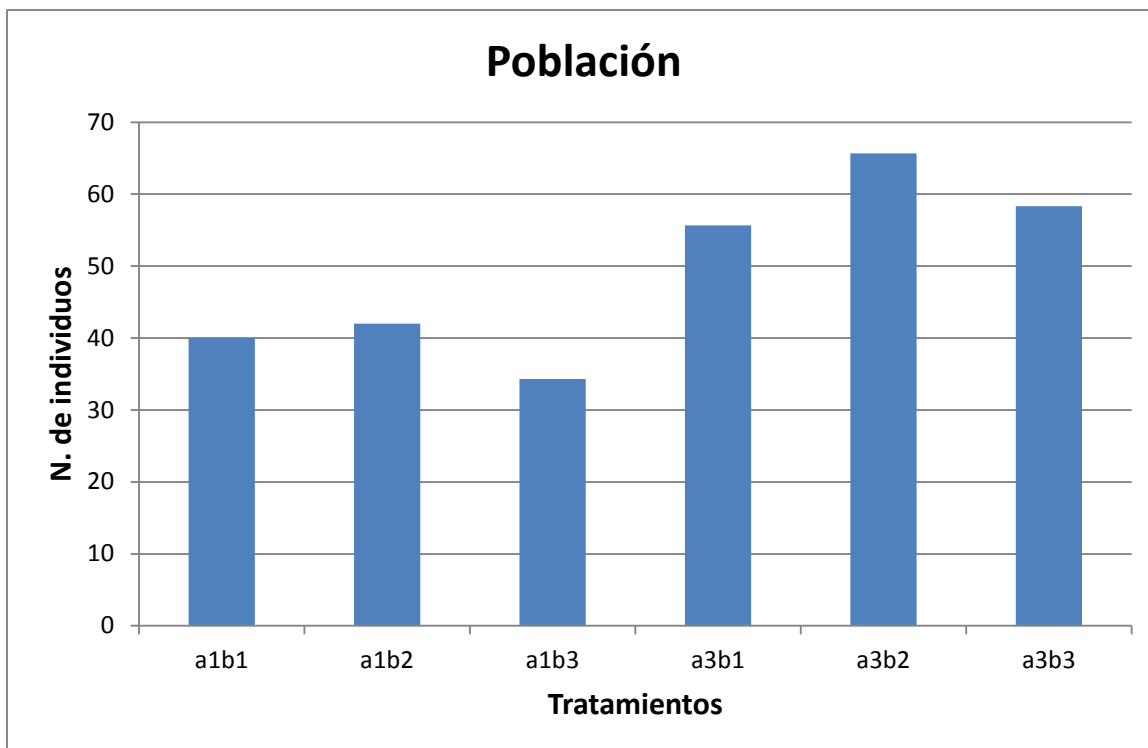
**Tabla 4.1 Población obtenida a partir de tres réplicas en el cultivo de *Daphnia magna* al término de 24 días.**

Código	Tratamiento	Población			Promedios	Desviación estándar
		Réplicas				
a1b1	Agua potable declorada + Jugo de alfalfa	36	42	42	20,000	± 3
a1b2	Agua potable declorada + Levadura	44	46	36	21,000	± 5
a1b3	Agua potable declorada + Alfalfa +	30	35	38	17,333	± 4

	Levadura					
a2b1	Agua reconstituida + Jugo de alfalfa	55	52	60	27,000	± 4
a2b2	Agua reconstituida + Levadura	68	64	65	33,333	± 2
a2b3	Agua reconstituida + Alfalfa + Levadura	62	59	54	29,000	± 4

**Elaborado por:** Ricardo Garcés

Al comparar gráficamente los resultados se observa que *Daphnia magna* tiene un número total de individuos mayor en el medio de cultivo con agua reconstituida y alimentada con levadura. Se procedió a evaluar los datos con el programa estadístico infostat.



**Figura 4.1** Número total de individuos de *Daphnia magna* en cada tratamiento

## **4.2 Selección del tratamiento adecuado para el crecimiento de *Daphnia magna***

En el análisis de varianza en el tratamiento óptimo para *Daphnia magna* (Anexo D), se obtiene un valor de p menor a 0,0001 calculado, en comparación al 0,05% se determina que hay diferencias significativas entre los tres medios de cultivo, por lo tanto se analiza mediante la prueba Tukey al 95 % (Anexo E) para determinar el mejor medio de cultivo, concluyendo que el mejor es el agua reconstituida, debido a que presenta concentraciones conocidas y controladas de sales inorgánicas.

El agua potable no permite el desarrollo óptimo de *Daphnia magna* debido a que en su estructura contiene restos de cloro, el cual es utilizado para eliminar microorganismos en la potabilización.

En el caso tipo de alimento, el análisis de varianza muestra un valor de p de 0.0014, menor a 0,05%, por lo tanto demuestra que existe diferencia significativa entre los tres tipos de alimento. Se procedió a aplicar la prueba de Tukey al 95% de confianza (Anexo F) y se determinó que el mejor alimento es la levadura, ya que según las observaciones su dispersión en el medio de cultivo presenta uniformidad y la precipitación es escasa, por lo tanto la alimentación para los individuos es uniforme y constante, el jugo de alfalfa en suspensión se precipitaba o formaba grumos, los cuales se adherían a los individuos y obstruían sus sistemas filtradores.

En la interacción entre los factores el análisis de varianza muestra un valor de 0.4090, mayor a 0,05%, lo que indica que no hay diferencias significativas entre las interacciones de medio de cultivo y alimento, se realizó el análisis Tukey al 95% para determinar cuál es la mejor combinación (Anexo G) y se determinó que la mejor combinación para *Daphnia magna* es su cultivo en agua reconstituida y alimentada con levadura.

## **4.3 Tasa de reproducción de *Daphnia magna* en condiciones de laboratorio**

La tasa de reproducción se obtuvo con el conteo final de individuos, la madurez sexual se obtuvo en los primeros 12 días (Anexo C), *Daphnia magna* presenta un ciclo de vida

bastante corto, ideal para su uso en bioensayos, ya que permite obtener resultados rápidamente, su longevidad se determinó a los 24 días, tiempo promedio en el cual murió la primera hembra reproductiva.

Los resultados referentes a la tasa de reproducción, longevidad y madurez reproductiva se muestran en la tabla 4.2.

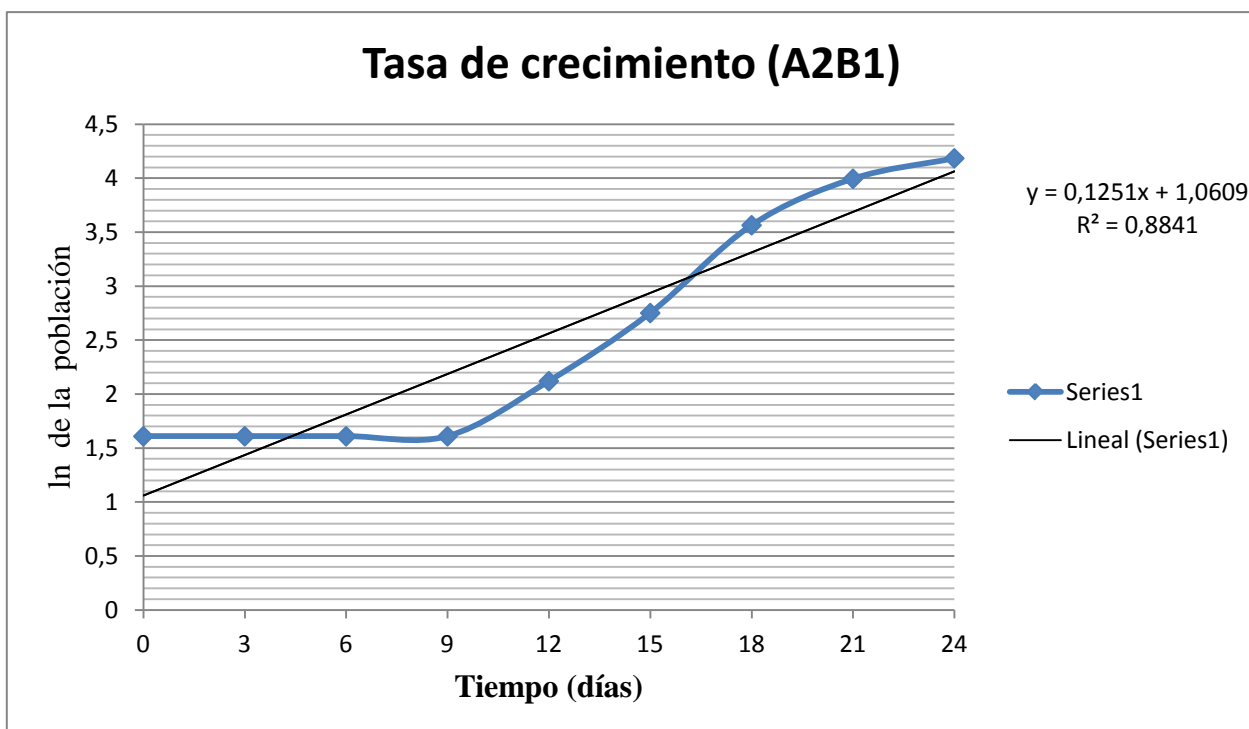
**Tabla 4.2 Indicadores de crecimiento obtenidos a partir de tres réplicas en el cultivo de *Daphnia magna* al término de 24 días**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa de reproducción</b>	<b>Madurez reproductiva</b>	<b>Longevidad promedio</b>
Agua potable declorada + Jugo de alfalfa	0,0943 %	12 días	24 días
Agua potable declorada + Levadura	0,1034 %	12 días	24 días
Agua potable declorada + Alfalfa + Levadura	0,0986 %	12 días	24 días
Agua reconstituida + Jugo de alfalfa	0,1135 %	12 días	24 días
Agua reconstituida + Levadura	0,1251 %	12 días	24 días
Agua reconstituida + Alfalfa + Levadura	0,1212 %	12 días	24 días



La figura 4.2 corresponde al medio de cultivo que presenta los mejores resultados en base al número total de individuos en el período de vida de *Daphnia magna*.

Los valores obtenidos determinan que *Daphnia magna* tiene un ciclo de vida aproximado de 24 días. Es importante conocer el ciclo de reproducción, ya que se puede predecir el momento en que nacerán los neonatos, los cuales son necesarios para aplicarlos en el bioensayo de toxicidad.



**Figura 4.2 Representación de la tasa de reproducción de *Daphnia magna***

#### **4.4 Concentración letal media de metales pesados para *Daphnia magna***

La dosis letal media con el tóxico de referencia y el agua de vertiente para los tres bioensayos se representa en la tabla 4.3. El agua de vertiente fue sometida a análisis de concentración de arsénico como principal contaminante, a partir de este valor se calculó las concentraciones en base al porcentaje de las diluciones realizadas. Los valores para las concentraciones de agua de vertiente se muestran en la tabla 4.4

**Tabla 4.3 Valores obtenidos con *Daphnia magna* correspondiente a la concentración letal media al término de 2 días**

	<b>Tóxico de referencia (Dicromato de potasio)</b>	<b>Agua de vertiente</b>
<b>Bioensayo</b>	<b>Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)</b>	<b>Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)</b>
1	0,078658345 mg/L	0,08369921 mg/L
2	0,081323007 mg/L	0,08333622 mg/L
3	0,084706629 mg/L	0,08066719 mg/L
<b>Promedio</b>	0,081562661 mg/L	0,082567541 mg/L

**Tabla 4.4 Concentraciones de arsénico en las diluciones de agua de vertiente**

<b>Porcentaje de dilución</b>	<b>Concentración de arsénico (mg/L)</b>
100 %	0,0228
87,5 %	0,01995
75 %	0,0171
62,5 %	0,01425

50 %	0,0114
37,5 %	0,00855
25 %	0,0057
12,5 %	0,00285

Aplicando el análisis t de student (Anexo I) se determina que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el tóxico de referencia y el agua de vertiente, utilizando el bioensayo de toxicidad

#### **4.5 Verificación de la hipótesis**

Tras haber realizado los bioensayos, procesamiento de datos y análisis estadísticos, se determina que *Daphnia magna* es un organismo altamente efectivo en la detección temprana de contaminación por metales pesados, por lo tanto se acepta la hipótesis de investigación, afirmando que se pueden detectar niveles de toxicidad por metales pesados esencialmente arsénico, ya que presenta una toxicidad mediante la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna*. Es importante recalcar que el dicromato de potasio puede representar a los tóxicos presentes

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

*Daphnia magna* al ser utilizada ampliamente como bioindicador ambiental determina la concentración letal media, importante para establecer los efectos que producen los metales pesados en los organismos sometidos al agua que los contiene. Por lo tanto su aplicación en bioensayos en el agua de vertiente utilizada en Huachi La Libertad da resultados similares con respecto al uso de un tóxico de referencia, del cual se conocen las concentraciones de contaminante, además de la comparación en referencias bibliográficas, se estima que los resultados obtenidos presentan un alto grado de certeza.

Para establecer las condiciones óptimas de crecimiento de *Daphnia magna* se utilizó tres distintos medios de cultivo con tres distintos tipos de alimentación, demostrando que el mejor medio de cultivo es el sintetizado en el laboratorio, que no presenta metales pesados ni otros contaminantes que puedan dañar al organismo en estudio, por lo tanto la levadura al no contener contaminantes resultó ser una fuente de alimento óptima para *Daphnia magna*.

En estos bioensayos de toxicidad, al ser calibrados contra un patrón, el tóxico de referencia, en este caso el dicromato de potasio, permitieron definir la concentración letal media para el organismo *Daphnia magna*, al utilizar un total de 3 bioensayos con nueve niveles de concentración y con tres réplicas, se obtuvo una concentración letal media de 0,0816 mg/L,

la cual según comparaciones con referencias bibliográficas de aceptabilidad entre 0,0751 - 0,197 mg/L entra en el rango permitido.

En el experimento se obtuvo un rango entre 0.078 y 0.085 mg/L, por lo tanto en los resultados obtenidos con el agua de vertiente se determinó una concentración letal media de 0,0826 mg/L, que cae dentro del rango establecido en la calibración o estandarización del método, por lo tanto se aceptan los organismos a prueba para detectar contaminación por metales pesados, los cuales pueden ser usados como indicadores biológicos para contaminación.

El trabajo propuesto no permite conocer exactamente la concentración de metales pesados en una muestra de agua, solamente permite detectar toxicidad agua mediante el cálculo de la dosis letal media, la cual se da en corto tiempo para establecer si el agua debe ser tratada antes de consumirla por cualquier organismo.

## **5.2 Recomendaciones**

Hacer un seguimiento muy cercano en la aparición de neonatos en los medios de cultivo, ya que estos son más sensibles a determinados factores, se recomienda separarlos de la población, colocándolos en nuevos recipientes con medio de cultivo fresco y clasificarlos de acuerdo a las fechas de nacimiento, esto con el fin de obtener una mejor consistencia en el crecimiento poblacional y evitar muertes prematuras de los neonatos al estar en presencia de sobrepoblación.

Aplicar los bioensayos en otras muestras de agua, como ejemplo el agua de pozo, la cual según cortos ensayos presentó alta mortalidad para los neonatos.

Tomar como respuesta experimental a la deformación de los neonatos sobrevivientes en los bioensayos ante concentraciones de metales pesados mínimas, las cuales no causen la muerte de *Daphnia magna*, ya que se presentaron resultados de deformaciones en las antenas que posteriormente pueden causar la muerte de los organismos a prueba en un período de tiempo más extenso que el utilizado en el análisis para toxicidad inmediata

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1 Título:**

**“Diseño de un filtro para la remoción de metales pesados por el fenómeno de adsorción con aserrín y tallo de banano”**

##### **6.1.1 Institución Ejecutora:**

Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica.

##### **6.1.2 Beneficiarios:**

Población de Huachi la Libertad

##### **6.1.3 Ubicación:**

Entrada a Huachi La Libertad, lugar de recolección del agua de vertiente

##### **6.1.4 Tiempo estimado de ejecución:**

8 meses

#### **6.2 Antecedentes de la propuesta**

En la actualidad existen una serie de procesos que son utilizados en la remoción de metales pesados, entre los que se encuentran la precipitación química, la filtración por medio de membranas, la reducción electrolítica, la extracción por medio de solventes (Silva y otros, 2005), el intercambio iónico, y la adsorción. Algunas de estas tecnologías no son aplicables

en todas las situaciones, debido a una serie de inconvenientes tales como: baja eficiencia y aplicabilidad a una amplia gama de contaminantes, generación de residuos, dificultad de encontrar condiciones óptimas de operación cuando se presentan distintos metales pesados en una solución y la necesidad de pre-tratamientos.

Existen extensos estudios sobre las modificaciones químicas de los residuos agrícolas vía esterificación, entrecruzamiento e injertos. Reportes indican que la introducción de los grupos funcionales reactivos en el núcleo de los materiales lignocelulósicos entrecruzados, da como resultado productos capaces de eliminar metales pesados de las aguas residuales industriales.

Entre los materiales de origen agrícola considerado como promisorio para la remoción de metales pesados de aguas residuales, se encuentra el aserrín. Una de las principales ventajas que presenta este material es su bajo costo, ya que requiere poco procesamiento, es abundante en industrias forestales, además de presentar en muchos casos problemas de disposición.

Numerosos residuos agrícolas de bajo costo han sido utilizados como adsorbentes para la eliminación de metales pesados, incluyendo, la cáscara de coco, fibra de coco, cáscara de banano, cenizas volantes provenientes del bagazo, cáscara de naranja, musgo y cáscaras de nueces. La mayoría de estos adsorbentes tienen una buena capacidad de adsorción en comparación con los carbonos activados e intercambiadores de iones comerciales, pero su uso en su forma original es limitado debido a la filtración de sustancias orgánicas en las soluciones.

### **6.3 Justificación**

La remoción de metales pesados por medio de procesos tales como el intercambio iónico (resinas) y la adsorción (carbón activado), es una alternativa eficiente. Sin embargo, la utilización de estos materiales convencionales no se aplica debido a los altos costos asociados a su adquisición, implementación y operación. Es por esta razón que se requiere de investigaciones centradas en la búsqueda de adsorbentes no convencionales de bajo

costo, tanto de origen industrial como agrícola, que permitan reemplazar el carbón activado y las resinas de intercambio en el tratamiento de aguas residuales.

## **6.4 Objetivos**

### **6.4.1 General**

Diseñar un filtro para la remoción de metales pesados por el fenómeno de adsorción con aserrín y tallo de banano

### **6.4.2 Específicos**

- Recolectar el aserrín generado por locales de madera y los residuos de racimos de banano generados en los mercados de la ciudad de Ambato.
- Desarrollar el dimensionamiento y montaje del filtro para la remoción de metales pesados
- Determinar la concentración letal media por bioensayos de toxicidad con *Daphnia magna* en el agua de salida del filtro.
- Evaluar la efectividad del filtro de acuerdo a la variación de la concentración letal media de metales pesados encontrados en las entradas y salidas del proceso.

## **6.5 Análisis de factibilidad**

En el comercio, los bananos representan la fruta más comercializada después de los cítricos. El tallo de banano no tiene uso alguno y es considerado material de desecho, creando el problema de su eliminación. Principalmente, el tallo está compuesto de celulosa, hemicelulosa, lignina, tanino y pectina. El objetivo principal de este estudio es investigar la factibilidad de utilizar el tallo del banano como un material precursor para desarrollar un adsorbente adecuado para la eliminación de los metales pesados de las soluciones acuosas.

Entre los materiales de origen agrícola considerado como promisorio para la remoción de metales pesados de aguas residuales, se encuentra el aserrín. Una de las principales ventajas que presenta este material es su bajo costo, ya que requiere poco procesamiento, es abundante en industrias forestales, además de presentar en muchos casos problemas de



disposición. El principal mecanismo implicado en la remoción de metales es el intercambio iónico entre iones  $H^+$  presentes en grupos funcionales del aserrín.

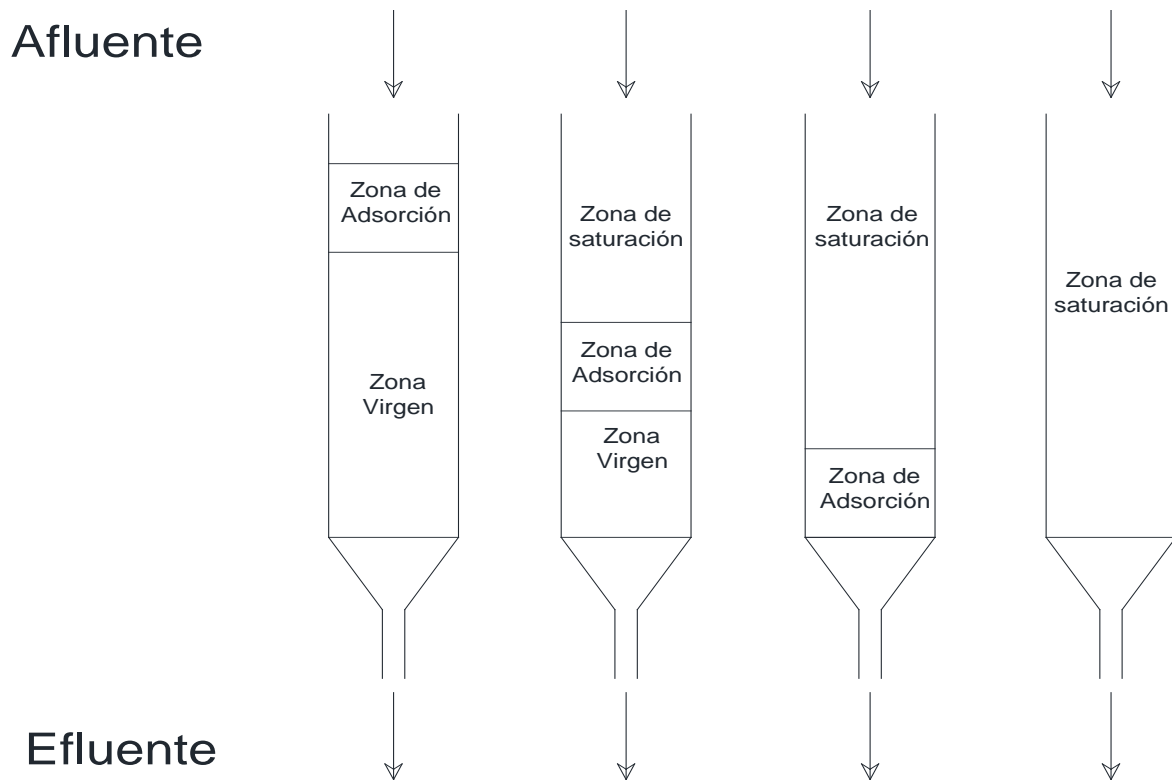
La mayoría de estos adsorbentes tienen una buena capacidad de adsorción en comparación con los carbonos activados e intercambiadores de iones comerciales, pero su uso en su forma original es limitado debido a la filtración de sustancias orgánicas en las soluciones. Por lo tanto, se debe realizar investigaciones dirigidas a prevenir la filtración de sustancias orgánicas durante el proceso de adsorción sin afectar la capacidad de adsorción.

En la adsorción en columnas de lecho fijo las concentraciones en la fase fluida y en la fase sólida varían con el tiempo y con la posición en el lecho. Cuando el agua fluye a través de la columna el contaminante, en este caso el metal pesado, se separa gradualmente a medida que el agua desciende a través de la columna

## **6.6 Fundamentación**

Las experiencias realizadas bajo sistemas batch entregan información importante respecto a las características de equilibrio y a la cinética de adsorción, este tipo de operación no es económica ni viable de llevar a la práctica a escala industrial. Es por esta razón que los datos obtenidos en sistemas de columnas son considerados como esenciales para el diseño de adsorbentes industriales.

La figura 6.1 muestra el proceso de adsorción; al inicio de la operación la mayor parte de la transferencia de materia tiene lugar cerca de la entrada de la columna, donde el fluido se pone en contacto con el adsorbente fresco. A medida que transcurre el tiempo, el sólido próximo a la entrada se encuentra prácticamente saturado y la mayor parte de la transferencia de materia tiene lugar lejos de la entrada. La región donde ocurre la mayor parte del cambio de concentración es la llamada zona de transferencia de materia, esta zona separa la zona virgen del adsorbente de la zona de saturación. A medida que transcurre el tiempo de operación de la columna, la zona de transferencia de materia se traslada en el lecho hasta alcanzar su extremo inferior.



**Figura 6.1 Evolución de la concentración del contaminante en una columna de adsorción**

**Elaborado por:** Ricardo Garcés

### 6.7 Metodología

**Tabla 6.1 Modelo operativo.**

<b>Fases</b>	<b>Metas</b>	<b>Actividades</b>	<b>Responsables</b>	<b>Recursos</b>	<b>Tiempo</b>
1. Formulación	Adquirir los elementos necesarios para el proceso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recolección de materia prima</li> <li>- Revisión Bibliográfica</li> <li>- Definir capacidades</li> </ul>	Investigador	Humanos Económicos	1 mes

2. Desarrollo	Incorporar y estabilizar el proceso de filtrado	- Armado e implementación del filtro	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	3 meses
3. Evaluación	Comprobación del proceso	- Control de calidad del agua de salida	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	15 días

**Elaborado por:** Ricardo Garcés

## 6.8 Administración

**Tabla 6.2 Administración del proyecto.**

<b>Indicadores a mejorar</b>	<b>Situación actual</b>	<b>Resultados esperados</b>	<b>Actividades</b>	<b>Responsables</b>
<b>Técnica de propagación in vitro.</b>	Uso de técnicas químicas de análisis de calidad del agua	Uso de técnicas biológicas para determinar la calidad del agua	Determinar el costo de los análisis de metales pesados en el agua	- Investigador Ricardo Garcés - Ing. Gladys Navas

**Elaborado por:** Ricardo Garcés

## 6.9 Previsión De La Evaluación

**Tabla 6.3 Previsión de la evaluación.**

Preguntas Básicas	Explicación
<b>¿Quiénes solicitan evaluar?</b>	Empresa municipal de agua potable de Ambato (EMAPA).
<b>¿Por qué evaluar?</b>	Provee información técnica de importancia para la verificación periódica de los parámetros permitidos para el agua potable.
<b>¿Para qué evaluar?</b>	Mejorar la calidad del agua potable.
<b>¿Qué evaluar?</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Parámetros fisicoquímicos.</li><li>- Maquinaria.</li><li>- Calidad del agua</li></ul>
<b>¿Quién evalúa?</b>	EMAPA

**Elaborado por:** Ricardo Garcés

## BIBLIOGRAFÍA

Altindag A. 2008. The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus [versión electrónica] African Journal of Biotechnology, 7 (23), 4298-4300. Disponible en:

<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/59572/47862>

Baird DJ, Barber I, Bradley M, Soares AMVM, Calow P (1991) A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stresses using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox Environ Safe 21:257-265. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1868782>

Barrios A., Calderón C., Ortega A., XVIII Congreso de Investigación. *Daphnia magna*, El canario de las aguas. Centro Universitario Anglo Mexicano, Morelos. Disponible en:

<http://www.acmor.org.mx/cuam/biol/217daphnia.pdf>

Castillo Gabriela M 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados Y Aplicaciones. 1era edición, Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. México DF. ISBN 968-5536-33-3

Cultura ecológica, 1996. Norma Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI Análisis de Agua-Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustacea Cladocera)-Método de Prueba. WaterAnalysis-Acute Toxicity Evaluation with *Daphnia magna* Straus. Disponible en:

<http://148.206.53.231/bdcrom/GAM06/GAMV15/root/docs/NMX-059.PDF>

Díaz Consuelo M., Bustos Martha C., Espinosa Adriana J. 2004. Pruebas de Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos. 1era edición. Unibiblos Bogotá-Colombia. ISBN 958-701-385-9

EPA USA 2011. Drinking Water Contaminants. National Primary Drinking Water Regulations. Disponible en:

<http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#Inorganic>

Escobar, J. 2002. Recursos Naturales e Infraestructura. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. Disponible en:

<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aidis-ar/lcl1799e.pdf> (14/11/2011)

Espíndola, A., Naranjo, B., Kosch, A. (2010). Remoción de arsénico de un medio líquido a nivel de laboratorio mediante la utilización de un consorcio y una cepa axénica de cianobacterias en suspensión aisladas a partir de las hojas de *Polylepis pauta* de bosques nativos del páramo de Papallacta. Revista Ciencia, 13 (2), 151-160. Disponible en:

[http://biblioteca.espe.edu.ec/upload/Art\\_04\\_remocion\\_arsenico.pdf](http://biblioteca.espe.edu.ec/upload/Art_04_remocion_arsenico.pdf) (20/11/2011)

Gaete, H., Chávez, C. (2008). Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladóceras, Crustácea). [Versión electrónica]. Limnetica, 27 (1): 1-10. Disponible en:

[http://www.limnetica.com/Limnetica/limne27a/L27a001\\_Toxicidad\\_mezclas\\_cobre\\_cinc\\_Daphnia.pdf](http://www.limnetica.com/Limnetica/limne27a/L27a001_Toxicidad_mezclas_cobre_cinc_Daphnia.pdf)

Iannacone, José A.; Alvaríño, L; Paredes, Christian, 2011. Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Acta Toxicológica Argentina 19 (1): 19-31. Disponible en:

<http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v19n1/v19n1a03.pdf>

Instituto Ecuatoriano De Normalización, 2006. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 108:2006. Disponible en:

<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10608/8/Norma%20Inen%20Agua1108-2.pdf>

Lewis PA, Horning WB (1991) Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. Environ Toxicol Chem 10: 1351-1357. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620101014/pdf>

Lilius H, Isomaa B, Holmström T (1994). A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna* . *Aquat. Tóxicol.* 30: 47-60. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166445X94900051>

Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez Estrada J., Martínez-Jerónimo, L. 2008. *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (crustacea: cladocera). Una Especie Zooplanctónica Potencialmente Utilizable Como Organismo de Prueba en Bioensayos de Toxicidad Aguda en Ambientes Tropicales y Subtropicales. [versión electrónica] *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 24 (4) 153-159. disponible en:

<http://www.journals.unam.mx/index.php/rica/article/download/21617/21608>

Martínez, R., López, E. Valoración de las alteraciones provocadas por diferentes agentes sobre *Daphnia magna* a través de un ensayo “on line” [versión electrónica] *revista toxicología* 23. 113-117. Disponible en:

<http://www.uv.es/aetoxweb/revista/revtox.23.2.3/revtox.23.2.3.Daphnia.pdf>

Movahedian, H., Bina B., Asghari, GH. (2005). Toxicity Evaluation of Wastewater Treatment Plant Effluents Using *Daphnia magna* [Versión electrónica]. *Iranian J Environmental Health Science*, 2(2), 1-4. Disponible en:

[http://journals.tums.ac.ir/upload\\_files/pdf/2015.pdf](http://journals.tums.ac.ir/upload_files/pdf/2015.pdf) (20/11/2011)

NASC 120. Introduction to Environmental Science (2008). Environmental Science Lab Exercise Toxicity testing using *Daphnia*. Disponible en:

<http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap7.pdf> (20/11/2011)

Norma Mexicana, (1995). NMX-AA-087-1995-SCFI Análisis de Agua-Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustácea Cladóceras) - Método de Prueba. Water Analysis-Acute Toxicity Evaluation with *Daphnia magna* Straus (Crustacea-Cladocera)-Test Method. Disponible en:

<http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa087.pdf>

Núñez, M., Hurtado, J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladóceras, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. [Versión electrónica]. Revista Peruana de Biología, 12 (1), 165-170. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v12n1/v12n1a18.pdf> (20/11/2011)

Ortega, A., Reyes, H. 2003. Crecimiento poblacional de *Daphnia magna* Strauss bajo condiciones de cultivo disponible en:  
<http://www.umar.mx/revistas/6/Daphnia.pdf>

Persoone, G., Baudo, R. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test-Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs [versión electrónica] 1 (2) 393. Disponible en:  
[http://www.kmae-journal.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/kmae/pdf/2009/02/kmae09009.pdf](http://www.kmae-journal.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/kmae/pdf/2009/02/kmae09009.pdf)

Ramírez P., Mendoza A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, La experiencia en México. 1era edición 2008. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de ecología. México DF. ISBN 978-868-817-882-9

Rawash IA, Gaaboub IA, El-Gayar EM, El-Shazli AY (1975) Standard curves for nuvacron, malathion, sevin, DDT and kelthane tested against the mosquito *Culex pipiens* L. and the microcrustacean *Daphnia magna* Straus. *Tóxicology*, 4(2): 133-144. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X7590092X>

Silvestry C. NORMAS ISO 24500. 2009 II Foro Iberoamericano de Regulación. Lima-peru. Disponible en:  
<http://www.sunass.gob.pe/aderasa/presentaciones/norma%20iso%2024500.pdf>



Theegala CS, Suleiman AA, Carriere PA (2007). Toxicity and biouptake of lead and arsenic by *Daphnia pulex*. J. Environ. Sci. Health. 42(1): 27-31. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129944>

USEPA, 1988. Ambient water quality criteria for aluminum. EPA-440/5-5-86-008. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. Disponible en:  
<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=2000M5FC.txt>

Whitman L., Miller R. 2008. The Phototactic Behavior of *Daphnia magna* as an Indicator of Chronic Toxicity. Disponible en:  
[http://digital.library.okstate.edu/oas/oas\\_pdf/v62/p22\\_33.pdf](http://digital.library.okstate.edu/oas/oas_pdf/v62/p22_33.pdf)

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Requisitos específicos establecidos por la Norma INEN para el agua potable

PARAMETRO	UNIDAD	Límite máximo permitido
<b>Características físicas</b>		
Color	Unidades de color aparente (Pt-Co)	15
Turbiedad	NTU	5
Olor	---	no objetable
Sabor	---	no objetable
<b>Inorgánicos</b>		
Antimonio, Sb	mg/l	0,02
Arsénico, As	mg/l	0,01
Bario, Ba	mg/l	0,7
Boro, B	mg/l	0,5
Cadmio, Cd	mg/l	0,003
Cianuros, CN <sup>-</sup>	mg/l	0,07
Cloro libre residual*	mg/l	0,3 a 1,5 <sup>1)</sup>
Cobre, Cu	mg/l	2,0
Cromo, Cr (cromo total)	mg/l	0,05
Fluoruros	mg/l	1,5
Manganeso, Mn	mg/l	0,4
Mercurio, Hg	mg/l	0,006
Níquel, Ni	mg/l	0,07
Nitratos, NO <sub>3</sub>	mg/l	50
Nitritos, NO <sub>2</sub>	mg/l	0,2
Plomo, Pb	mg/l	0,01
Radiación total α *	Bq/l	0,1
Radiación total β **	Bq/l	1,0
Selenio, Se	mg/l	0,01
<sup>1)</sup> Es el rango en el que debe estar el cloro libre residual luego de un tiempo mínimo de contacto de 30 minutos. * Corresponde a la radiación emitida por los siguientes radionucleidos: <sup>210</sup> Po, <sup>224</sup> Ra, <sup>226</sup> Ra, <sup>232</sup> Th, <sup>234</sup> U, <sup>238</sup> U, <sup>239</sup> Pu ** Corresponde a la radiación emitida por los siguientes radionucleidos: <sup>60</sup> Co, <sup>89</sup> Sr, <sup>90</sup> Sr, <sup>129</sup> I, <sup>131</sup> I, <sup>134</sup> Cs, <sup>137</sup> Cs, <sup>210</sup> Pb, <sup>228</sup> Ra		

### Sustancias orgánicas

	UNIDAD	Límite máximo permitido
☿ Hidrocarburos policíclicos aromáticos HAP		
Benzo [a]pireno	mg/l	0,0007
<b>Hidrocarburos:</b>		
Benceno	mg/l	0,01
Tolueno	mg/l	0,7
Xileno	mg/l	0,5
Estireno	mg/l	0,02
1,2dicloroetano	mg/l	0,03
Cloruro de vinilo	mg/l	0,0003
Tricloroetano	mg/l	0,02
Tetracloroetano	mg/l	0,04
Di(2-etilhexil) ftalato	mg/l	0,008
Acrylamida	mg/l	0,0005
Epiclorohidrina	mg/l	0,0004
Hexaclorobutadieno	mg/l	0,0006
1,2Dibromoetano	mg/l	0,0004
1,4- Dioxano	mg/l	0,05
Acido Nitritotriacético	mg/l	0,2

### Plaguicidas

	UNIDAD	Límite máximo permitido
Isoproturón	mg/l	0,009
Lindano	mg/l	0,002
Pendimetalina	mg/l	0,02
Pentaclorofenol	mg/l	0,009
Dicloroprop	mg/l	0,1
Alacloro	mg/l	0,02
Aldicarb	mg/l	0,01
Aldrin y Dieldrin	mg/l	0,00003
Carbofuran	mg/l	0,007
Clorpirifós	mg/l	0,03
DDT y metabolitos	mg/l	0,001
1,2-Dibromo-3-cloropropano	mg/l	0,001
1,3-Dicloropropeno	mg/l	0,02
Dimetoato	mg/l	0,006
Endrin	mg/l	0,0006
Terbutilazina	mg/l	0,007
Clordano	mg/l	0,0002

**Residuos de desinfectantes**

	<b>UNIDAD</b>	<b>Límite máximo permitido</b>
Monocloramina,	mg/l	3

**Subproductos de desinfección**

	<b>UNIDAD</b>	<b>Límite máximo permitido</b>
2,4,6-triclorofenol	mg/l	0,2
<b>Trihalometanos totales</b>	mg/l	0,5
Si pasa de 0,5 mg/l investigar:		
• Bromodichlorometano	mg/l	0,06
• Cloroformo	mg/l	0,3
Acido tricloroacético	mg/l	0,2

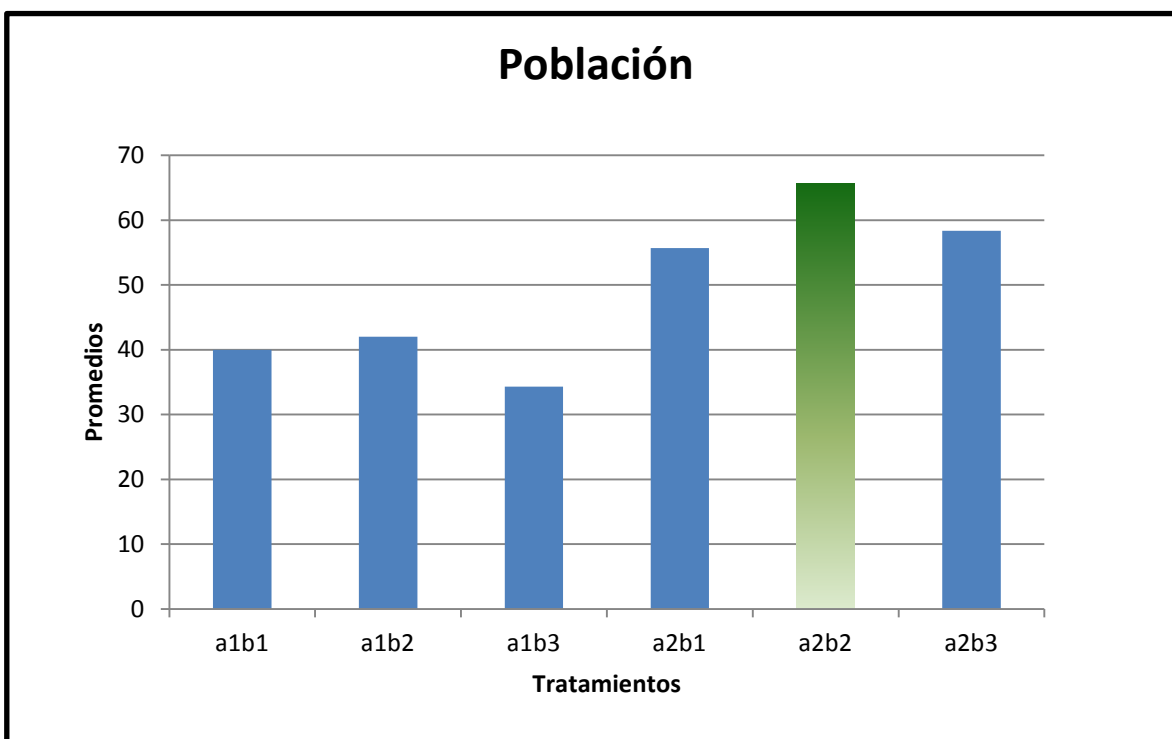
**Cianotoxinas**

	<b>UNIDAD</b>	<b>Límite máximo permitido</b>
Microcistina-LR	mg/l	0,001

## ANEXO B

**Datos obtenidos con respecto al desarrollo de *Daphnia magna* en el tiempo estimado**

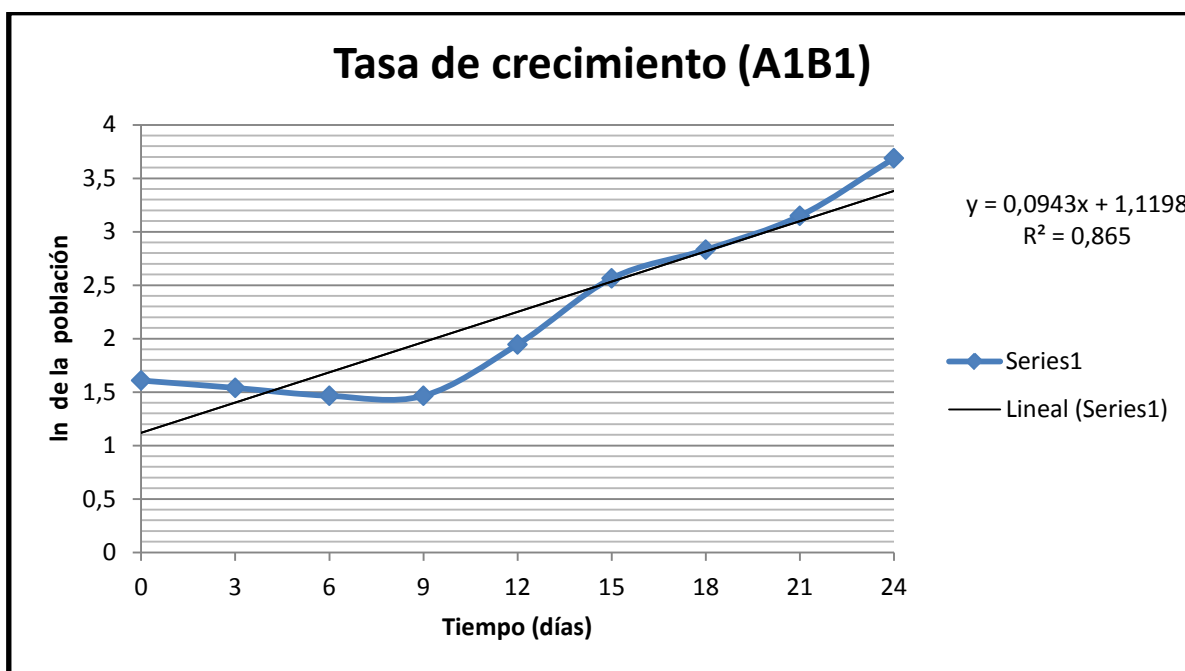
Tratamiento	Periodo de vida de <i>Daphnia magna</i>																													
	día 0			día 3			día 6			día 9			día 12			día 15			día 18			día 21			día 24					
	Réplicas			Réplicas			Réplicas			Réplicas			Réplicas			Réplicas			Réplicas			Réplicas			Réplicas					
a1b1	5	5	5	4	5	5	4	4	5	4	4	5	6	7	8	14	12	13	18	17	16	22	23	25	36	42	42			
a1b2	5	5	5	5	5	5	4	4	5	4	4	5	6	5	4	12	12	14	25	21	19	38	37	29	44	46	36			
a1b3	5	5	5	3	5	4	3	4	4	3	4	4	6	8	7	12	12	13	17	19	21	24	26	26	30	35	38			
a2b1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	6	7	14	14	13	24	30	31	38	41	44	55	52	60			
a2b2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8	8	9	17	14	16	39	34	33	55	51	57	68	64	65			
a2b3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8	8	8	15	15	16	40	35	36	51	48	49	62	59	54			

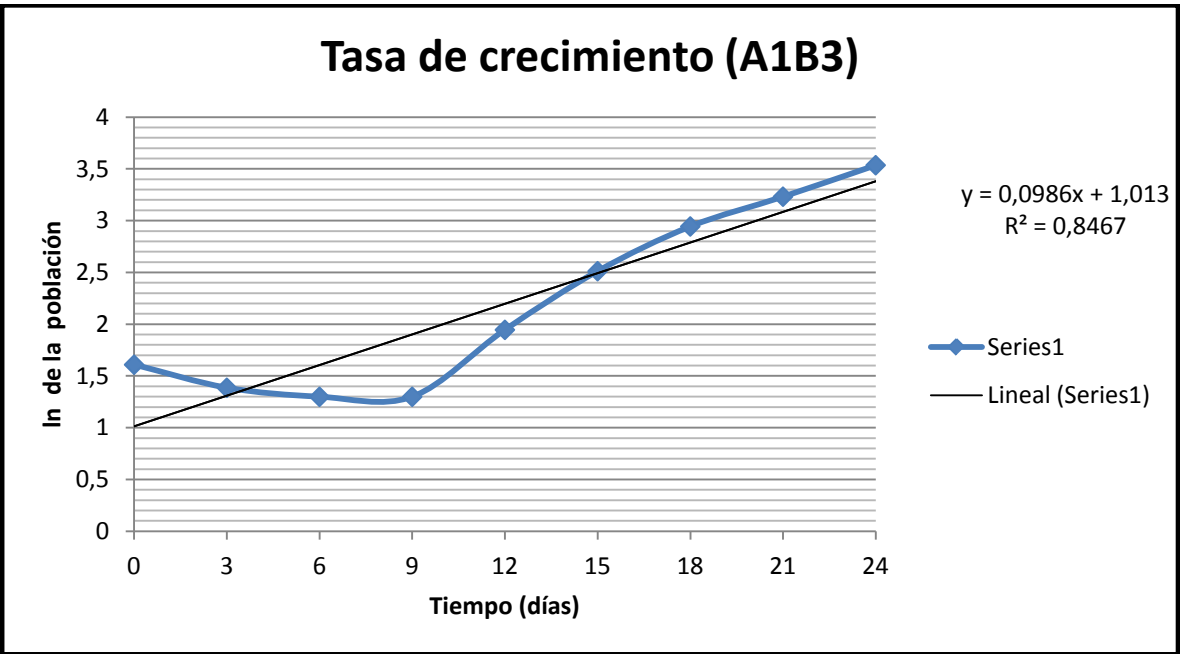
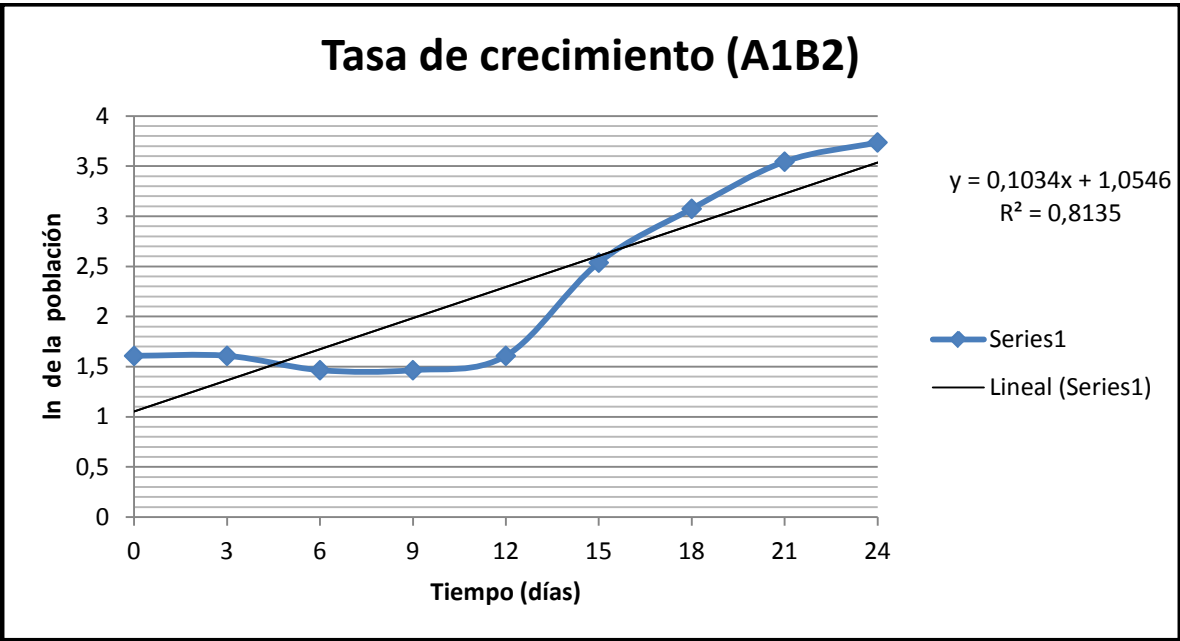


## ANEXO C

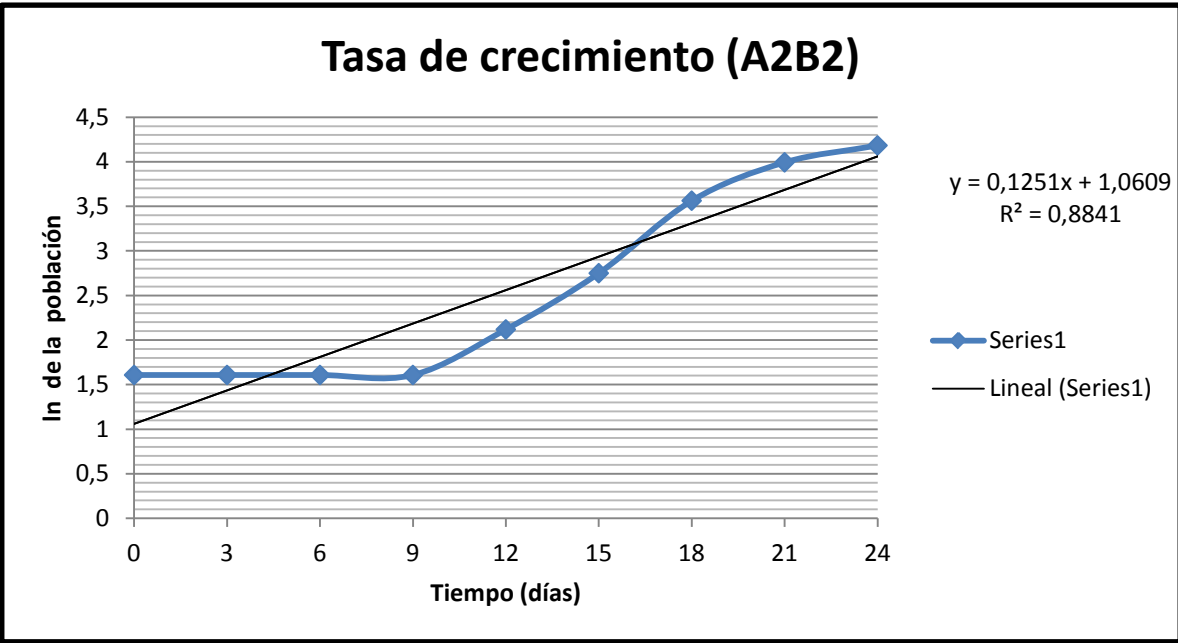
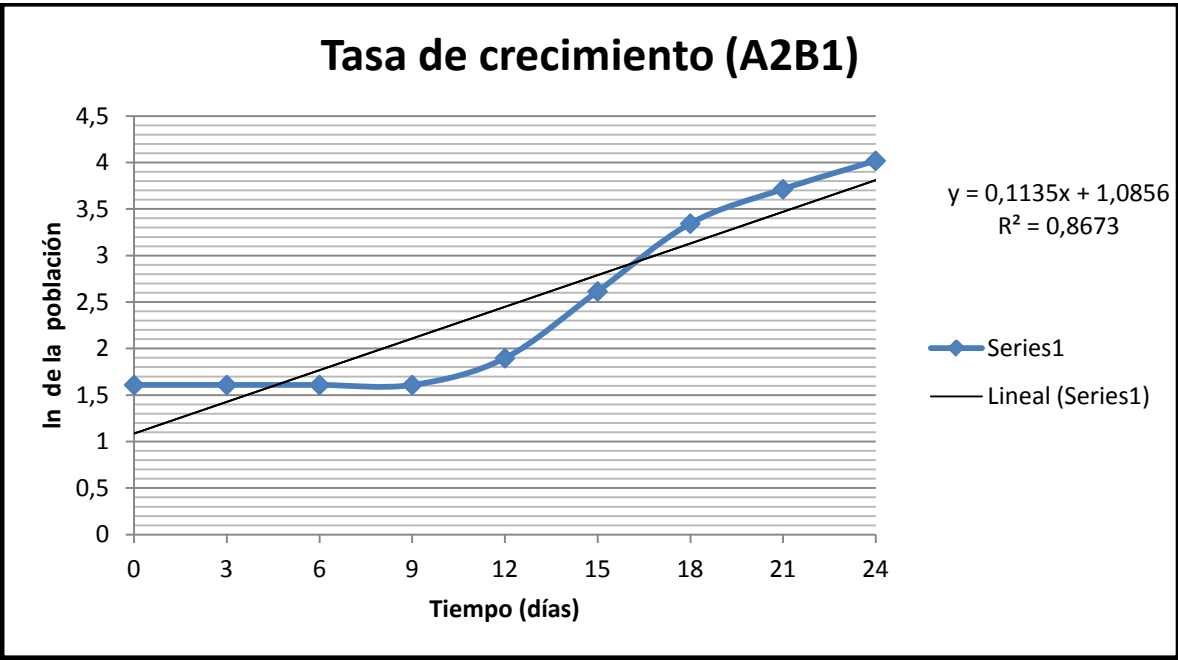
### Determinación de la tasa de reproducción mediante el método exponencial

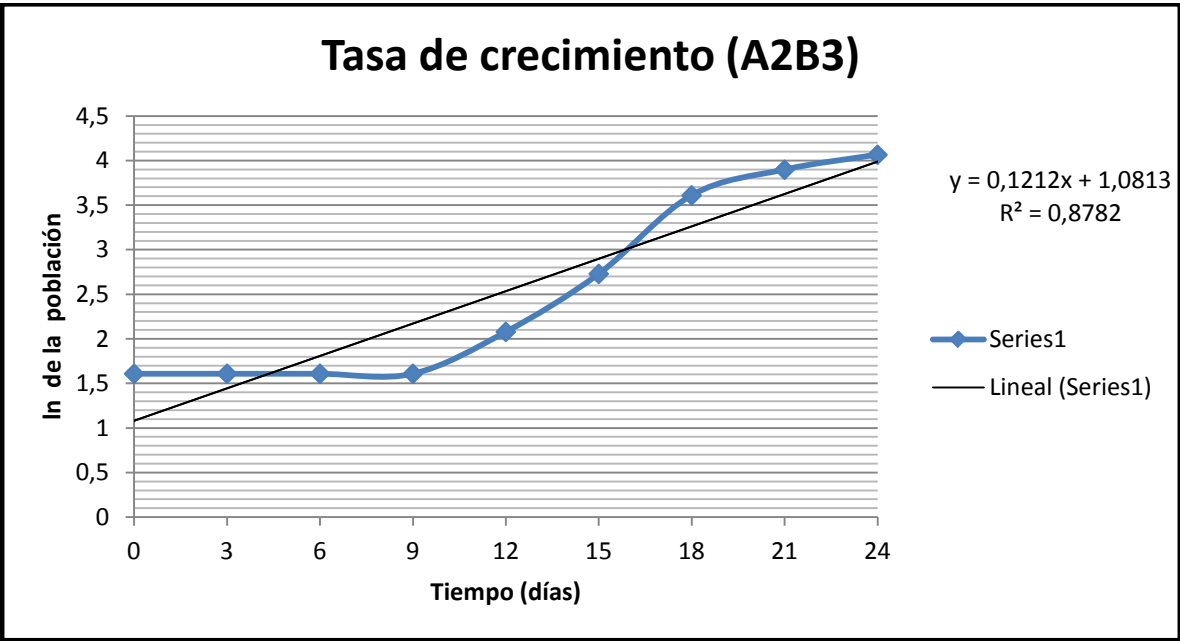
día	A1B1		A1B2		A1B3		A2B1		A2B2		A2B3	
	población promedio	ln	población promedio	ln	población promedio	ln	población promedio	ln	población promedio	ln	población promedio	ln
0	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609
3	4,667	1,540	5,000	1,609	4,000	1,386	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609
6	4,333	1,466	4,333	1,466	3,667	1,299	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609
9	4,333	1,466	4,333	1,466	3,667	1,299	5,000	1,609	5,000	1,609	5,000	1,609
12	7,000	1,946	5,000	1,609	7,000	1,946	6,667	1,897	8,333	2,120	8,000	2,079
15	13,000	2,565	12,667	2,539	12,333	2,512	13,667	2,615	15,667	2,752	15,333	2,730
18	17,000	2,833	21,667	3,076	19,000	2,944	28,333	3,344	35,333	3,565	37,000	3,611
21	23,333	3,150	34,667	3,546	25,333	3,232	41,000	3,714	54,333	3,995	49,333	3,899
24	40,000	3,689	42,000	3,738	34,333	3,536	55,667	4,019	65,667	4,185	58,333	4,066











## ANEXO D

### Análisis estadístico para determinar el mejor tratamiento en el cultivo de *Daphnia magna*

#### Análisis de varianza para la población final

##### Infostat

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	2261,33	6	376,89	22,21	<0,0001	
Tipo de alimento	189,00	2	94,50	5,57	0,0214	
Medio de cultivo	2005,56	1	2005,56	118,18	<0,0001	
Tipo de alimento*Medio de ..	66,78	2	33,39	1,97	0,1860	
Réplicas	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999	0,00
Error	186,67	11	16,97			
Total	2448,00	17				

##### Statgraphics

#### Análisis de la Varianza para Población - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente F	P-Val
<b>COVARIANTES</b>					
replicas	0,0	1	0,0	0,00	1,00
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Medio de cultivo	2005,56	1	2005,56	118,18	0,00
B: Alimento	189,0	2	94,5	5,57	0,02
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	66,7778	2	33,3889	1,97	0,18
<b>RESIDUOS</b>					
	186,667	11	16,9697		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>					
	2448,0	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Población en las contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha elegido la suma de cuadrados Tipo III (valor por defecto), se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de los factores.

Los P-valores comprueban la importancia estadística de cada uno de los factores. Dado que 2 p-valores son inferiores a 0,05, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo en Población para un 95,0%.

## ANEXO E

### Análisis Tukey para determinar el mejor medio de cultivo (Factor A) en el desarrollo de *Daphnia magna*

#### Infostat

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=4,27459

Error: 16,9697 gl: 11

Medio de cultivo Medias n

1	38,78	9	A
2	59,89	9	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Según el análisis Tukey para medio de cultivo se determina que el mejor es el 2; correspondiente al agua reconstituida.

#### Statgraphics

#### Contraste Múltiple de Rangos para Población según Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

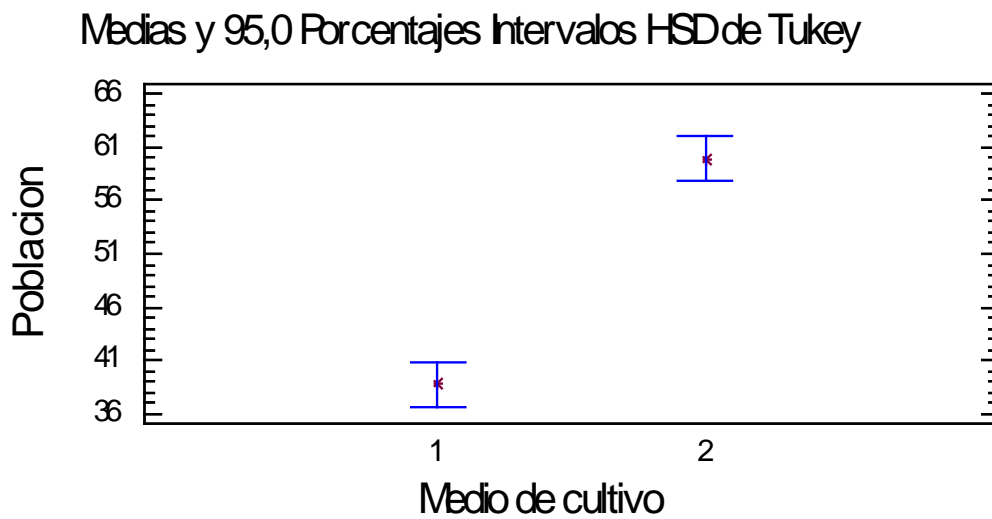
Nivel	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	9	38,7778	1,37314	X
2	9	59,8889	1,37314	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	* - 21,1111	5,23473

\* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de uno

de los pares, indica que éste muestra diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de la diferencia más francamente significativa de Tukey (HSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar uno o más pares como significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.



## ANEXO F

### Análisis Tukey para determinar el mejor tipo de alimento (Factor B) en el desarrollo de *Daphnia magna*

#### Infostat

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=6,42428

Error: 16,9697 gl: 11

Tipo de alimento	Medias	n
3	46,33	6 A
1	47,83	6 A B
2	53,83	6 B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Según el análisis Tukey para el tipo de alimento se determina que el mejor es el 2; correspondiente a la levadura.

#### Statgraphics

#### Contraste Múltiple de Rangos para Población según

```

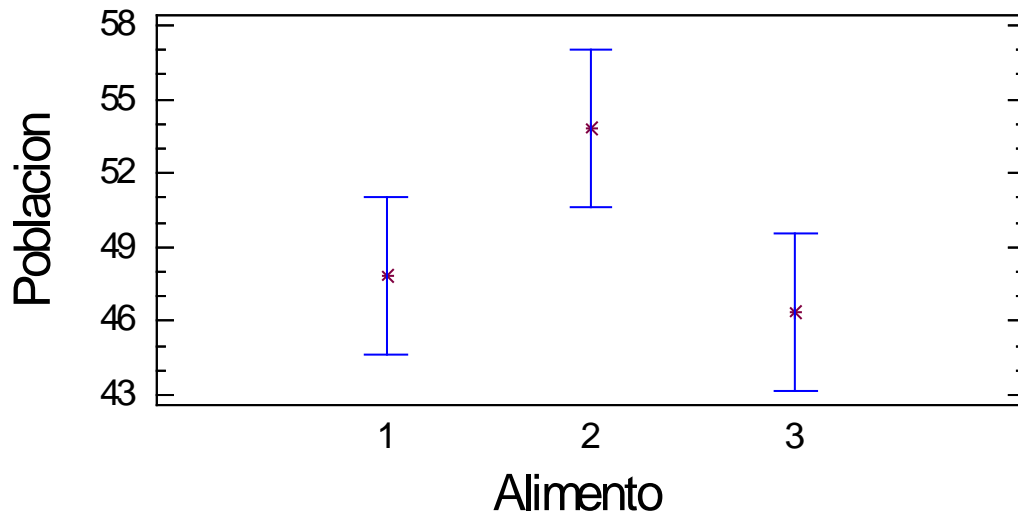
.....
Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey
Alimento      Recuento  Media LS      Sigma LS
.....
3              6          46,3333      1,68175
1              6          47,8333      1,68175
2              6          53,8333      1,68175
.....
Contraste                                Diferenci
.....
1 - 2                                          - 6,0
1 - 3                                          1,5
2 - 3                                          * 7,5
.....
* indica una diferencia significativa.

```

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de uno de los pares, indica que éste muestra diferencia estadísticamente significativa a un nivel de

confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de la diferencia más francamente significativa de Tukey (HSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar uno o más pares como significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

### Medias y 95,0 Porcentajes Intervalos HSD de Tukey



## ANEXO G

Análisis Tukey para determinar la mejor combinación entre el medio de cultivo y el tipo de alimento

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=11,47080

Error: 16,9697 gl: 11

Medio de cultivo	Tipo de alimento	Medias	n	
1	3	34,33	3	A
1	1	40,00	3	A
1	2	42,00	3	A
2	1	55,67	3	B
2	3	58,33	3	B
2	2	65,67	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

En la tabla de análisis de varianza se concluye que no hay diferencias significativas entre las combinaciones. El análisis Tukey permite determinar que la mejor combinación es entre el medio de cultivo 2; correspondiente al agua reconstituida y el alimento 2; correspondiente a la levadura



## ANEXO H

### Calculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>)

**Tabla de valores “Probit”**

Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%
0	0	3,72	10	4,16	20	4,48	30	4,75	40	5,00	50	5,25	60	5,52	70	5,84	80	6,28	90	7,33	99,0
2,67	1	3,77	11	4,19	21	4,50	31	4,77	41	5,03	51	5,28	61	5,55	71	5,88	81	6,34	91	7,37	99,1
2,95	2	3,82	12	4,23	22	4,53	32	4,80	42	5,05	52	5,31	62	5,58	72	5,92	82	6,41	92	7,41	99,2
3,12	3	3,87	13	4,26	23	4,56	33	4,82	43	5,08	53	5,33	63	5,61	73	5,96	83	6,48	93	7,46	99,3
3,25	4	3,92	14	4,29	24	4,59	34	4,85	44	5,10	54	5,36	64	5,64	74	5,99	84	6,55	94	7,51	99,4
3,36	5	3,96	15	4,33	25	4,61	35	4,87	45	5,13	55	5,39	65	5,67	75	6,04	85	6,64	95	7,58	99,5
3,45	6	4,01	16	4,36	26	4,64	36	4,90	46	5,15	56	5,41	66	5,71	76	6,08	86	6,75	96	7,65	99,6
3,52	7	4,05	17	4,39	27	4,67	37	4,92	47	5,18	57	5,44	67	5,74	77	6,13	87	6,88	97	7,75	99,7
3,59	8	4,08	18	4,42	28	4,69	38	4,95	48	5,20	58	5,47	68	5,77	78	6,18	88	7,05	98	7,88	99,8
3,66	9	4,12	19	4,45	29	4,72	39	4,97	49	5,23	59	5,50	69	5,81	79	6,23	89	7,33	99	8,09	99,9

### Ejemplo de cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) con el bioensayo 1

**bioensayo 1**

pruebas	muertes registradas			promedio
	réplica 1	réplica 2	réplica 3	
Control negativo	0	1	0	0,333
1.	1	0	1	0,667
2.	1	1	1	1,000
3.	1	1	0	0,667
4.	1	1	2	1,333
5.	5	4	5	4,667
6.	8	6	7	7,000
7.	8	9	8	8,333
8.	8	8	9	8,333
9.	8	9	9	8,667
Control positivo	10	10	10	10,000

La mortalidad en el blanco de dilución o control negativo no debe superar el 10%,

Porcentaje de efecto de los tóxicos sobre los organismos a prueba:

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

$$p = \left( \frac{0.667}{10} \right) * 100$$

$$p = 6.667$$

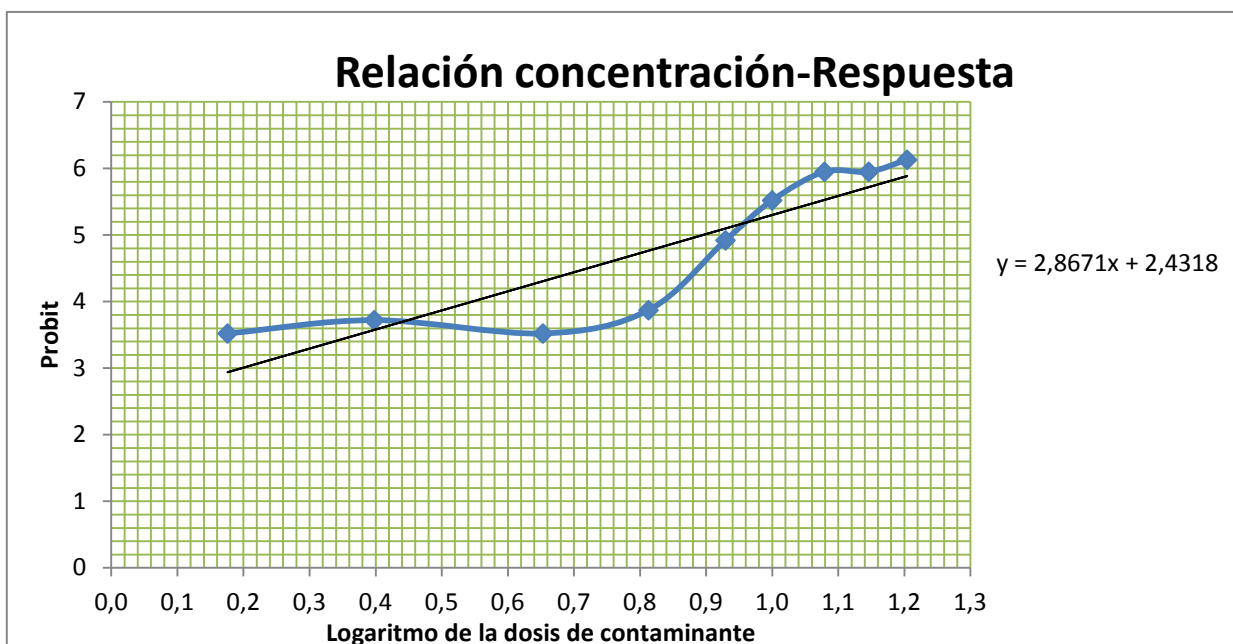
Concentración mg/L	Efecto 1 % de mortalidad
control negativo	3
0,015	6,667
0,025	10,00
0,045	6,67
0,065	13,33
0,085	46,67
0,1	70,00
0,12	83,33
0,14	83,33
0,16	86,67
control positivo	100

**Transformación de las concentraciones de tóxico a escala logarítmica  $X = \log_{10}(d)$  y unidades “Probit”**

<b>logaritmo Dosis</b>	<b>Probit 1</b>
0,176	3,52
0,398	3,72
0,653	3,52
0,813	3,87
0,929	4,92
1	5,52
1,079	5,95
1,146	5,95
1,204	6,13

Si los valores del logaritmo son negativos, se recomienda sumar una unidad (1) o más a todos los valores, sean positivos o negativos, de modo de trabajar solamente con valores positivos.

**Gráfico de la relación concentración (x) con los valores Probit (y)**



**Estimación de la concentración de tóxico o dosis para un 50% de mortalidad, en unidades Probit corresponde a 5. (y = 5)**

$$5 = 2,432 + 2.867x$$

Se despeja la concentración (x)

$$x = \frac{5 - 2,432}{2,867}$$

Se resta las unidades inicialmente sumadas en la transformación logarítmica

$$x = \left( \frac{5 - 2,432}{2,867} \right) - 2$$

Se aplica antilogaritmo y se obtiene la concentración letal media o  $CL_{50}$ .

$$CL_{50} = \frac{\left( \frac{5 - 2,432}{2,867} \right) - 1}{\text{antilog}}$$

$$CL_{50} = 0,0786 \text{ mg/L}$$

## ANEXO I

### Prueba t para medias de dos muestras emparejadas (tóxico de referencia y agua de vertiente)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<i>Comparación</i>
Media	0,08156	0,08257	
Varianza	0,00001	0,00000	
Observaciones	3,00000	3,00000	
Grados de libertad	2,00000	2,00000	
Estadístico t			0,37646
P(T<=t) una cola			0,37138
Valor crítico de t (una cola)			2,91999
P(T<=t) dos colas			0,74276
Valor crítico de t (dos colas)			4,30265

Valor estadístico  $t <$  Valor crítico de  $t$ , no existe significancia estadística entre los promedios obtenidos en la concentración letal con el tóxico de referencia y el agua de vertiente

## ANEXO J

### Clasificación de *Daphnia magna*

<b>Reino:</b> Animalia
<b>Filo:</b> Arthropoda
<b>Subfilo:</b> Crustácea
<b>Clase:</b> Branchiopoda
<b>Orden:</b> Diplostraca
<b>Suborden:</b> Cladóceras
<b>Familia:</b> Daphniidae
<b>Género:</b> Daphnia
<b>Especie:</b> Daphnia Magna

Fig J-1 Efipio de *Daphnia magna* (neonato sexual)



Fig J-2 Neonato asexual de *Daphnia magna*



Fig. J-3 *Daphnia magna* macho



Fig J-4 *Daphnia magna* hembra



Fig J-5 *Daphnia magna* hembra sexual





Fig J-6 *Daphnia magna* hembra partenogénica



## ANEXO K

### Preparación de los medios de cultivo para *Daphnia magna*

Fig. K-1 Reactivos utilizados



Fig. K-2 Preparacion de las sales



Fig. K-3 Preparacion del agua reconstituida



Fig. K-4 Agitacion de las sales



Fig. K-5 Sales en solución



Fig. K-6 Agua potable de clorada



Fig. K-7 Dilución del jugo de alfalfa



Fig. K-8 Jugo de alfalfa



Fig. K-9 Levadura comercial



Fig. K-10 Levadura disuelta



Fig. K-11 Medios de cultivo con alimento



Fig. K-12 Inoculacion de *Daphnia magna*



Fig. K-13 Crecimiento de neonatos de *Daphnia magna*

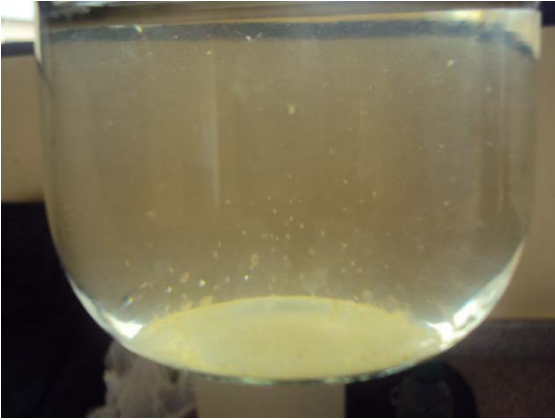


Fig. K-14 Solución de dicromato de potasio



Fig. K-15 Medios de cultivo con dicromato de potasio



Fig. K-16 Dilución del agua de vertiente



## ANEXO L

### Detección de arsénico

Fig L-1 Kit para la detección de arsénico



Fig L-2 Reacción para detectar arsénico



Fig. L-3 Medicion de arsénico en ug/L

