



FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PAMPA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO  
ACADÉMICO DE LICENCIADO EN QUIMICA

“DETERMINACIÓN DE DUREZA EN EFLUENTES AMBIENTALES. APLICACIÓN EN  
EVALUACIÓN DE TOXICIDAD POR POSIBLE PRESENCIA DE METALES”

VALERIA LIS ALAGIA

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2016

# **PREFACIO**

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta universidad ni en otra institución académica. Se llevó a cabo en las instalaciones del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) Anguil-Santa Rosa, y en las instalaciones del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, durante el período comprendido entre 22 de Mayo del 2015 y la presente fecha, bajo la dirección de la Dra. Laura C. Bartel y la codirección de la Ing. Ingrid Violeta Poggio Herrero.

Fecha\_\_\_\_\_

Alagia, Valeria Lis

## **Agradecimientos**

Este trabajo de tesina pone fin, después de mucho sacrificio y esfuerzo, a una de las etapas más esperadas e importantes de mi vida. Sin la ayuda de mucha gente que me acompañó y estuvo presente, nada de esto hubiera sido posible, a cada uno de ellos hoy les digo gracias.

A mi directora y codirectora, Laura y Violeta, les digo gracias por confiar en mí, por acompañarme, brindarme su apoyo y enseñarme lo que saben. Gracias a ustedes crecí personal y profesionalmente

Gracias a la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al área de Toxicología y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por formarme académicamente y concederme el espacio para realizar este trabajo.

Agradezco fundamentalmente y de todo corazón, a mi mamá y mi papá, porque si estoy donde estoy, es por ellos y para ellos. A mis hermanos que fueron durante estos años grandes compañeros y amigos y a mi novio que fue un pilar fundamental en esta etapa. ¡Los amo!

Finalmente le digo gracias a mis amigos; a mis amigos de la facultad por ser parte de esto y estar al lado mío durante estos años y al resto de mis amigos, aquellos que están desde siempre, aquellos amigos que me dio la vida les agradezco el apoyo incondicional y sobre todo el afecto y cariño que me brindan día a día.

Gracias a cada uno de ustedes hoy soy Feliz!!!

Departamento de Química

Alagia, Valeria Lis

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## RESUMEN

Los residuos urbanos líquidos (RULEs) contienen sustancias tóxicas en cantidades variables, entre ellas metales. Para evaluar la toxicidad de los RULEs se pueden aplicar ensayos biológicos estandarizados, e incorporando un agente complejante (EDTA) es posible diferenciar la toxicidad causada por metales de la generada por otros tóxicos. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad potencial de los RULEs de Santa Rosa y evaluar si ésta se debe, en parte, a la presencia de metales. Se analizaron seis muestras de RULEs tomadas de forma bimensual entre noviembre de 2013 y octubre de 2014. Se evaluó toxicidad aguda determinando concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) mediante bioensayos con *Daphnia magna*. Inicialmente se determinó la dureza y la toxicidad basal de cada muestra. Posteriormente se repitió el ensayo incorporando tres cantidades crecientes de una solución de EDTA, cuya concentración se definió en función de la dureza de cada muestra. Los RULEs evaluados presentaron toxicidad basal media, con valores de CL<sub>50</sub> en el rango de 45 a 71%. La adición de EDTA modificó la toxicidad de cada uno de los efluentes. La adición del nivel más bajo de EDTA disminuyó la toxicidad en todas las muestras. El mayor descenso de la toxicidad se observó con la adición del nivel intermedio de EDTA. La incorporación del nivel más alto de EDTA generó un incremento de la toxicidad, debido posiblemente al compuesto en sí mismo. Los resultados obtenidos indican una contribución leve de la presencia potencial de metales pesados en la toxicidad de los RULEs.

## **Abstract**

The urban liquid wastes (RULes, from the Spanish acronym) contain toxic substances in variable amounts, and metals among them. In order to evaluate the toxicity of the RULes, different standard bioassays can be used, and by adding a complexing agent as EDTA it is possible to differentiate the toxicity that metals generate from other toxicants. The objective of this work was to determinate the potential toxicity of the RULes from Santa Rosa and if the presence of metals generate a part of it. Six samples of RULes were taken bimonthly between November 2013 and October 2014. Acute toxicity was evaluated by measuring the lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) through bioassays with *Daphnia magna*. Water hardness and basal toxicity of each sample were measured before any bioassays were conducted. Then, it was repeated by adding three different increasing levels of EDTA solution, whose concentration was defined as a function of the hardness of each sample. Based on the obtained LC<sub>50</sub>, the RULes presented a basal toxicity in the mean range, between 45 and 71%. The addition of EDTA modified the toxicity of each sample. The lowest EDTA level diminished the toxicity in all the samples. The highest decrease of toxicity was obtained with the intermediate level of EDTA. By last, the addition of the highest level of EDTA increased the toxicity, possibly due to its intrinsic effect. The obtained results indicate that the potential presence of heavy metals contributes to a lesser extent the observed toxicity.

# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Toxicología .....	1
1.1.1 Definición .....	1
1.1.2 Ecotoxicología .....	2
1.2 Efluentes líquidos.....	3
1.2.1 Composición de las aguas residuales urbanas .....	4
1.2.2 Toxicidad de las aguas residuales asociada a la presencia de metales pesados .....	6
1.3 Bioensayos .....	10
1.3.1 Marco conceptual.....	10
1.3.2 Bioensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> .....	11
1.4 Dureza del agua.....	12
1.4.1 Complejación con EDTA.....	12
1.5 Área de estudio .....	13
<b>2. Objetivos e Hipótesis .....</b>	<b>16</b>
2.1. Objetivos .....	16
2.1.1. Objetivo.....	16
2.1.2 Objetivos específicos .....	16
2.2 Hipótesis.....	16
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>17</b>
3.1 Materiales, Reactivos y equipos utilizados.....	17
3.1.1 Reactivos y Materiales .....	17
3.1.2 Equipos de Laboratorio.....	17
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Muestreo.....	18

3.2.2 Preparación de soluciones para la titulación volumétrica .....	18
3.2.3 Determinación de dureza por titulación volumétrica .....	19
3.2.4 Obtención de la solución de EDTA para bioensayos .....	20
3.2.5 Bioensayos .....	20
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>24</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>30</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>31</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Planta de tratamiento de la ciudad de Santa Rosa .....	14
Figura 2. Piletos de la planta Norte y Sur.....	13
Figura 3. Procedimiento seguido para la preparación de las diluciones. ....	22
Figura 4. Procedimiento seguido para la preparación del bioensayo .....	22
Figura 5. Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del protocolo de prueba de <i>Daphnia magna</i> .....	23
Figura 6. Resultados obtenidos para el efluente cloacal A. ....	24
Figura 7. Resultados obtenidos para el efluente cloacal B.....	25
Figura 8. Resultados obtenidos para el efluente cloacal C.....	25
Figura 9. Resultados obtenidos para el efluente cloacal D. ....	26
Figura 10. Resultados obtenidos para el efluente cloacal E.....	27
Figura 11. Resultados obtenidos para el efluente cloacal F. ....	27

## Índice de Tablas

Tabla 1. Valores de $CL_{50}$ calculadas para cada uno de los efluentes. ....	28
---	----

# 1. Introducción

## 1.1 Toxicología

### 1.1.1 Definición

La toxicología es la ciencia que estudia las interacciones nocivas que se pueden producir cuando un ser vivo entra en contacto con sustancias químicas o agentes físicos, y establece las probabilidades de que estas interacciones hayan ocurrido o puedan ocurrir. No sólo permite identificar, sino cuantificar los efectos adversos asociados a la exposición a estos agentes [1].

A través de la toxicología podemos:

- determinar las propiedades tóxicas de los agentes
- estudiar los mecanismos por los cuales los agentes ejercen su acción
- brindar información a otras disciplinas, como la medicina, para que puedan comprender la etiología de ciertas enfermedades y si existe relación entre éstas y las exposiciones [1,2].

Cuando un agente o una sustancia ejerce efectos nocivos sobre un ser vivo, estamos ante la presencia de un tóxico. Cualquier sustancia puede actuar como tal, incluso los propios constituyentes del organismo cuando se encuentran en él en proporciones excesivas [1,3].

Existen diferentes factores que determinan la toxicidad de una sustancia:

- Características propias de los seres vivos
- Características físicas y químicas de las sustancias
- Las vías de ingreso de las sustancias en el organismo
- La exposición, que se relaciona con la dosis y la frecuencia de administración [1].

En toxicología suele utilizarse el término dosis que hace referencia a la cantidad absoluta de tóxico que ingresa en un organismo (mg, g, ml), y de ella dependerá que una sustancia ejerza efectos benéficos o dañinos sobre un ser vivo [1]. Muchas veces la cantidad de tóxico que ingresa en el organismo suele expresarse en función de su peso y del tiempo que dura la exposición, en ese caso, ya no se habla de dosis sino de dosaje y se expresa como los mg de sustancia por kilogramo de peso corporal por unidad de tiempo (mg/kg de peso/día) [1].

Otro concepto importante en toxicología es el de dosis umbral, que hace referencia a la cantidad más pequeña de una sustancia que es capaz de ejercer un efecto nocivo en un organismo [1].

Cuando un organismo entra en contacto con una sustancia tóxica se dice que está expuesto. Así, la exposición será *aguda* cuando el contacto se produzca por períodos cortos o por exposiciones sucesivas que no duren más de un día; mientras que si el contacto permanece por períodos más largos, como días, meses o años, hablamos de *exposiciones crónicas* [1].

### **1.1.2 Ecotoxicología**

La ecotoxicología se ocupa de estudiar los efectos nocivos ocasionados por sustancias o agentes (sustancias químicas de origen antropogénico, mezclas químicas o sustratos de origen natural) sobre las distintas estructuras que forman parte del ecosistema, sea un organismo, poblaciones o comunidades. A diferencia de las pruebas toxicológicas estándares, que tienen por objeto definir la relación causa-efecto con ciertas concentraciones de exposición tóxica en un receptor sensible, las pruebas ecotoxicológicas intentan evaluar la causa y los efectos a mayores niveles de organización, pero sobre todo en las poblaciones [4].

La ecotoxicología es una ciencia multidisciplinaria, ya que para llevar a cabo su función requiere información y conocimiento que aportan otras disciplinas como la toxicología, la biología, la geología y la química, entre otras [5].

La contaminación ambiental se ha incrementado a partir del desarrollo económico e industrial y con la implementación de nuevas tecnologías se ha generado una amplia variedad de productos y sustancias que se liberan al medio ambiente ya sea de manera accidental o intencional. Como consecuencia de este manejo industrial y la puesta en marcha de nuevos procesos, muchas veces se agotan los recursos naturales, que difícilmente alcanzan a renovarse en un tiempo razonable [5].

Al momento de llevar a cabo ensayos ecotoxicológicos, es importante hacer una integración entre la investigación de laboratorio y de campo. Los bioensayos realizados en el laboratorio definen el impacto tóxico en un determinado organismo (en su bioquímica y fisiología). Ese conocimiento adquirido en el laboratorio se debe integrar con lo que ocurre a campo y es fundamental para comprender el complejo conjunto de parámetros con los que un organismo debe tratar para lograr reproducirse o sobrevivir bajo las exposiciones a sustancias tóxicas [4].

Los conceptos toxicológicos que explican cómo las sustancias químicas intervienen en las funciones fisiológicas de células, órganos e individuos también se pueden aplicar para comprender los efectos nocivos causados sobre los ecosistemas. Sin embargo, existen eventos que son específicos de los ecosistemas y no pueden reconocerse utilizando métodos clásicos para probar la toxicidad de los productos químicos. Entre los factores que se deben tener en cuenta al momento de evaluar los efectos tóxicos de ciertas sustancias sobre los ecosistemas, se encuentran la cantidad total de sustancia liberada al medio, el mecanismo de acción, y el destino de los compuestos extraños en todo el ecosistema, que a su vez involucra su distribución, retención y descomposición [5].

La actividad humana genera productos químicos persistentes que se depositan en la biosfera y que permanecerán allí por largos periodos. A través de los distintos fenómenos climáticos muchos productos químicos han logrado migrar y afectar regiones alejadas de las zonas industriales. Detectar los efectos nocivos causados por un agente sobre el ambiente, no resulta una tarea sencilla. Por un lado esto se debe a que la remediación de la contaminación ambiental es un proceso complejo y por el otro lado esa contaminación se debe a un cúmulo de sustancias químicas (naturales o antropogénicas), por lo que determinar cuál es el agente relevante en esa mezcla tan heterogénea resulta complejo [5].

El riesgo de toxicidad ambiental está dado principalmente por aquellos productos que tienen una gran actividad biológica, que son persistentes y que se pueden bioconcentrar debido a su lipofilicidad y estabilidad contra la inactivación metabólica, por lo cual pueden depositarse en los tejidos grasos de los consumidores y ser biomagnificados a lo largo de la cadena trófica [5].

En conclusión, los contaminantes persistentes se distribuyen por toda la biosfera y sus componentes pero no de manera uniforme y algunos de éstos, debido a su actividad biológica específica, se consideran de gran importancia ecotoxicológica [5].

## **1.2 Efluentes líquidos**

El agua constituye un recurso indispensable para la supervivencia de todo ser vivo, y por ello durante los últimos años el hombre ha tenido la necesidad de buscar métodos y alternativas para cuidar y conservarlo, convirtiéndose en objeto de estudio [6]. El agua es también un recurso necesario para las actividades industriales, agrícolas y ganaderas que en su conjunto

participan del desarrollo económico de una sociedad. Sin embargo, estas actividades generan aguas residuales modificando la composición y características originales de las aguas de partida contaminándolas y, en muchas ocasiones haciendo imposible su aplicación para otros usos [7]. Las aguas residuales generadas por la actividad humana requieren un tratamiento que modifique sus características y composición, previo a su descarga en los cursos receptores, ya que, según sus características, éstos no siempre son capaces de neutralizar los contaminantes presentes [8]. El hecho de verter al medio ambiente las aguas residuales sin ningún tratamiento previo, no solo produce daños en el ecosistema, sino que supone riesgos para la salud pública [7]. Por estos motivos, en muchos países se destina gran cantidad de dinero al tratamiento de aguas residuales para detener el deterioro de la calidad de las aguas superficiales [9].

Las plantas de tratamiento de aguas residuales reciben mezclas complejas de nutrientes y contaminantes (orgánicos e inorgánicos), que se tratan para reducir estas concentraciones elevadas de sustancias tóxicas para que no afecten el medio ambiente. La mayoría de las plantas de tratamiento de todo el mundo están diseñadas y equipadas para eliminar grandes cantidades de elementos potencialmente tóxicos, como metales, que pudieran estar presentes en las aguas residuales. [10].

Las aguas residuales urbanas involucran:

- Aguas residuales domésticas: provienen de las zonas de viviendas (casas, edificios comerciales y establecimientos) y son generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas. Dentro de los contaminantes presentes se pueden mencionar detergentes, grasas, jabones, materia orgánica, sales, entre otros.
- Aguas residuales industriales: generadas por las actividades industriales y vertidas al alcantarillado municipal. Presentan una composición muy variable dependiendo del tipo de industria.
- Aguas pluviales o de tormenta: son las que se generan con las lluvias y tormentas y que arrastran partículas contaminantes presentes tanto en la atmosfera como en la superficie [7, 9, 11,12].

### **1.2.1 Composición de las aguas residuales urbanas**

En términos generales, las aguas residuales contienen aproximadamente un 99,9% de agua, siendo el resto materia sólida. Ésta incluye materia mineral, producto de actividades cotidianas

y de la calidad de las aguas de abastecimiento y materia orgánica proveniente exclusivamente de la actividad humana y que está compuesta por hidratos de carbono, proteínas y grasas [8].

Las proteínas constituyen del 40 al 50% de la materia orgánica y están representadas por los complejos de aminoácidos y proporcionan la mayor parte de los nutrientes bacterianos. Aproximadamente un 50-60% de las proteínas se encuentran diluidas en las aguas residuales y un 20-30% en la fracción sedimentable. Los porcentajes de hidratos de carbono (almidones, azúcares y celulosa) que se encuentran en forma disuelta y sedimentables son semejantes a las proteínas. En cuanto a los ácidos grasos que forman parte de las grasas no suelen ser solubles y se degradan más lentamente [8].

La componente gaseosa de las aguas residuales urbanas contiene diversos gases en diferente concentración, entre los que destacan:

- Oxígeno disuelto: fundamental para la respiración de los organismos aerobios presentes. Su control a lo largo del tiempo arroja datos relevantes para conocer el estado del agua residual.
- Ácido sulfhídrico: se genera por descomposición anaeróbica de sustancias orgánicas e inorgánicas azufradas.
- Anhídrido carbónico: se produce por fermentación de compuestos orgánicos.
- Metano: se forma en condiciones de anaerobiosis por descomposición de la materia orgánica. Aparece en cierto tipo de estaciones depuradoras, donde se llevan a cabo procesos de estabilización anaeróbica de barros, ofreciendo la posibilidad de aprovechamiento como combustible.
- Otros gases: Se trata principalmente de gases malolientes, como ácidos grasos volátiles, indol, escatol y otros derivados del nitrógeno [11].

Además de los compuestos ya mencionados, las aguas residuales contienen elementos contaminantes que pueden causar impacto ambiental y poner en riesgo la salud del hombre, [8] entre ellos podemos mencionar:

1. Microorganismos patógenos: en algunos países en vía de desarrollo estos microorganismos producen enfermedades y se convierten en uno de los motivos más importantes de muerte prematura. Ej. *Salmonella thypimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, etc.

2. Desechos orgánicos: producidos por los seres humanos, el ganado y procesos industriales relacionados con el procesamiento de alimentos. Favorecen el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias.
3. Sustancias químicas inorgánicas: incluyen ácidos, sales y metales tóxicos (mercurio, plomo, cadmio, etc.). En concentraciones altas pueden causar graves daños a los seres vivos.
4. Nutrientes: sustancias solubles en agua que las plantas necesitan para su desarrollo, pero en altas concentraciones favorecen el desarrollo de algas provocando la eutrofización de las aguas (por ej. nitratos y fosfatos).
5. Compuestos orgánicos sintéticos: productos que permanecen largos periodos por ser difíciles de degradar (petróleo, combustibles, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes, etc.).
6. Material en suspensión: provocan turbidez y sedimentos en el agua que dificultan la vida de algunos organismos, destruyen sitios de alimentación de los peces y obstruyen canales y puertos.
7. Sustancias radiactivas: isotopos radiactivos solubles que pueden estar presentes en el agua y a veces, pueden acumularse a lo largo de las cadenas tróficas. Ej. Radón, cesio, estroncio, uranio 238 [9].

### **1.2.2 Toxicidad de las aguas residuales asociada a la presencia de metales pesados**

En el mundo entero la contaminación del agua ocupa un lugar primordial y su tratamiento es sumamente importante para preservar la salud del hombre y mantener el equilibrio del ecosistema [13].

Los metales pesados son un constituyente importante de muchas aguas residuales y debido a su toxicidad afectan no sólo al medio ambiente sino también a la salud humana y animal. Desde principios de los setenta ha habido una preocupación creciente sobre los diversos efectos de los metales pesados sobre los ecosistemas acuáticos [14]. Es por esto, que conocer los niveles de contaminación por metales pesados permite tomar decisiones adecuadas que afecten no solo al campo de la salud, sino también al medio ambiente y al plano social en general [15].

Los metales son, quizás, las toxinas más antiguas conocidas por el hombre. Su uso se remonta a 2.000 años a.C y difieren de otras sustancias tóxicas en el hecho de que los humanos no pueden crearlos ni destruirlos. Sin embargo, su utilización influye en los potenciales efectos sobre la salud, en primer lugar, debido a que la actividad antropogénica transporta estas sustancias y hace que lleguen al aire, suelo, agua y alimentos, y en segundo lugar, mediante la alteración de la especiación o forma bioquímica del elemento [4].

Los metales se redistribuyen de forma natural en el medio ambiente por medio de ciclos geológicos y biológicos. El agua de lluvia disuelve rocas y transporta físicamente los minerales hacia los arroyos y ríos, al mismo tiempo deposita en el suelo y extrae materiales y finalmente, estas sustancias son transportadas hacia el océano. Los ciclos biológicos incluyen bioconcentración por plantas y animales y la incorporación a los alimentos [4].

En particular, debido al hecho de que los metales pesados generan graves daños en la población infantil, en ocasiones ausentes de síntomas, se busca disminuir o minimizar al máximo la exposición de la población a estos elementos tóxicos [16].

El término “metal pesado” se usa para designar a aquellos elementos que presentan como característica en común una elevada densidad. Un metal pesado es aquel elemento que tiene una densidad igual o mayor a  $5 \text{ g.cm}^{-3}$  cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos-térreos) que en concentraciones bajas pueden dañar a los seres vivos y tienden a acumularse en la cadena alimentaria [17].

Estos metales pueden originarse de fuentes naturales (corteza terrestre, emisiones volcánicas) y/o antropogénicas que se pueden clasificar en puntuales o fijas (industrias) y no puntuales o móviles (fertilizantes, plaguicidas, cenizas, humos, etc.) [18, 19].

Los metales pesados se pueden dividir en dos grupos. Por un lado aquellos que constituyen micronutrientes esenciales para animales y plantas (cobre, hierro, manganeso y cinc) y que se requieren en cantidades traza. Éstos juegan un papel relevante en diversos procesos bioquímicos, aunque en concentraciones elevadas se vuelven tóxicos.

Por otro lado los metales no esenciales (cadmio, mercurio, plomo, antimonio y bismuto) que no poseen efectos beneficiosos en humanos y no se conocen mecanismos homeostáticos para ellos. Los metales no esenciales resultan tóxicos a muy bajas concentraciones y además se acumulan en los organismos vivos [17, 18, 20].

El impacto ambiental asociado a la presencia de metales pesados estaba mayormente conectado a fuentes industriales, aunque en los últimos años, las emisiones han disminuido en muchos países debido a la legislación, al mejoramiento de la tecnología aplicada en la limpieza, y a la modificación de las actividades industriales [14].

Una parte significativa de las emisiones antrópicas de metales pesados termina en aguas residuales. Los principales aportes urbanos a las aguas residuales son el agua residual doméstica, efluentes comerciales (por ejemplo, lavados de automóviles, usos dentales, otras empresas, etc.), deposición atmosférica y emisiones producidas por el tráfico (escape de vehículos, revestimientos de frenos, neumáticos, desgaste de asfalto, fugas de gasolina / aceite, etc.) [14].

La presencia de metales en aguas residuales urbanas procede principalmente de actividades domésticas, actividades industriales y escurrimiento de aguas pluviales y es una de las principales causas de la contaminación del agua y del suelo [10]. La acumulación de estos elementos en aguas residuales depende de una serie de factores locales, entre ellos el tipo de industria, el modo de vida de los pueblos y su conciencia de los impactos ambientales por la eliminación descuidada de los desechos [10].

En base a un estudio realizado por Sorme y Lagerkvistb (2002) se establecieron las principales fuentes emisoras para algunos metales pesados tales como Cu, Zn, Ni y Hg [21]. Las principales fuentes de Cu eran los sistemas de agua corriente, alimentos y materiales usados en la construcción de techos. Para Zn, las fuentes más grandes fueron materiales galvanizados utilizados en la construcción y lavado de coches. En el caso de Ni, las fuentes más grandes eran los productos químicos usados en las plantas de tratamiento de efluentes, así como también de agua potable. Finalmente, para el Hg la fuente de emisión más dominante fueron las amalgamas dentales. Para Pb, Cr y Cd los mayores contribuyentes resultaron ser el lavado de autos [21]. Las descargas de metales al medio ambiente causan toxicidad aguda a organismos acuáticos, microorganismos y plantas, y también reducen el número de microorganismos usados en las actividades biológicas de las plantas de tratamiento [10], afectando la calidad de los sistemas de tratamiento.

En un trabajo realizado en la ciudad de Bursa (Turquía), se determinó la concentración de diferentes metales presentes en las aguas residuales no tratadas [10]. El trabajo se llevó a cabo durante 23 meses en el periodo comprendido entre 2002 y 2007. Como resultado de dicho trabajo se determinaron las siguientes concentraciones medias (en  $\mu\text{g/l}$ ) para diferentes

metales. En el año 2002 las concentraciones medias encontradas fueron Al 1302; Cd 2; Cr 1009; Cu 64; Fe 1499; Mn 104; Ni 84; Pb 16 y Zn 387; y para el año 2007 Al 1891; Cd 19; Cr 1086; Cu 60; Fe 1975; Mn 126; Ni 100; Pb 84 y Zn 533. Los resultados muestran que la presencia de metales en las aguas residuales es bastante compleja y variable. Las concentraciones de metal Cd, Fe, Pb y Zn aumentaron en más de 20% en comparación con el año 2002. La variación en el contenido de metales de aguas residuales se atribuyó a la diversidad de actividades económicas de la región (80 empresas textiles, 90 de cuero, 26 de procesamiento de metales, 160 de mantenimiento de automóviles, 16 de caucho y plástico, 8 de alimentos, 13 de lavandería, 7 de concreto) [10]. En general, las concentraciones detectadas son lo suficientemente bajas como para no esperar efectos tóxicos individuales, pero al considerar toxicidad de mezclas se suele ver que los componentes presentan toxicidad en concentraciones en las que individualmente no se esperarían efectos agudos [22].

Los daños ocasionados por metales pesados, a bajas dosis, incluyen efectos potencialmente carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos [19] por medio del bloqueo de ciertas actividades biológicas, lo que causa daños irreversibles en los diferentes organismos [17]. Para ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, deben estar biodisponibles; y esto depende de las condiciones fisicoquímicas del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil [17].

Para la toxicología, uno de los desafíos relacionados a la toxicidad de metales pesados consiste en obtener información cuantitativa respecto a los niveles de dosis, los tejidos afectados, cómo estas toxinas afectan a esos tejidos, así como también comprender los procesos metabólicos que los afectan. Dependiendo de la dosis, la mayoría de los metales afectan a múltiples sistemas de órganos; pero a dosis muy bajas, en donde se producen efectos, cada metal tiende a afectar primero un órgano o tejido específico [4].

En síntesis, la rápida expansión de la industria y el incremento de las actividades domésticas han dado lugar a un aumento considerable de la cantidad de residuos emitidos al medio ambiente. Las principales fuentes de contaminación ambiental con metales pesados son los residuos procedentes de los vertidos industriales, actividades mineras, aplicación de plaguicidas y del tráfico automotor [17]. Es importante resaltar que el mayor riesgo de los metales pesados está dado por su persistencia a largo plazo en el medio ambiente y su capacidad de bioacumularse [18].

## **1.3 Bioensayos**

### **1.3.1 Marco conceptual**

Los ensayos biológicos se llevan a cabo para determinar los efectos causados sobre organismos de prueba, cuando estos se exponen a diversos agentes físicos y químicos en condiciones específicas y controladas [23]. A través de estos bioensayos se puede evaluar la toxicidad aguda o crónica de distintos tóxicos. Para determinar la toxicidad aguda se somete a un organismo a una única dosis del tóxico, generalmente elevada, y donde el resultado final suele ser la muerte del organismo. En base a los resultados se puede obtener el valor de la  $CL_{50}$ , que es la concentración de sustancia que produce la muerte del cincuenta por ciento de los individuos expuestos [23].

La toxicidad crónica se evalúa exponiendo a los organismos de prueba durante tiempo prolongado al tóxico (puede durar varios meses) [23].

Como se describió anteriormente, el efecto tóxico dependerá de las propiedades químicas del compuesto así como de su concentración, su mecanismo de acción, tipo y duración de la exposición, etc. Los efectos que produzca una sustancia dada se deberán a modificaciones en estructuras subcelulares (proteínas, lípidos de membrana, material genético), enzimas o sobre organismos completos, poblaciones o comunidades [23].

La toxicidad evaluada durante las pruebas biológicas es el resultado de la interacción de la sustancia con el sistema biológico, ya que éste cuenta con una serie de mecanismos metabólicos que contrarrestan los efectos producidos por el tóxico (detoxificación, excreción, etc.). Muchas veces el efecto tóxico sobre los sistemas biológicos se debe a la acción combinada de todas las sustancias nocivas presentes en el medio, incluso las que no son tóxicas en sí, pero que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema, y por lo tanto las condiciones de vida de los organismos [23]. También se deben tener en cuenta aquellos efectos indirectamente relacionados con sustancias, tales como el deterioro producido por acción de la temperatura o radiación [23].

Al momento de llevar a cabo los bioensayos es importante tener en cuenta ciertas limitaciones. Primero, no existe un organismo que pueda usarse y que nos permita evaluar todos los efectos que un tóxico pueda ejercer sobre un ecosistema. Por otro lado, el resultado que se obtiene dependerá de los organismos usados, de las condiciones de ensayo planteadas y que se llevan a

cabo con un número reducido de organismos que representan funciones ecológicas relevantes [23].

En el caso de las aguas residuales, debido a su composición compleja y heterogénea, se generan una variedad de problemas experimentales relacionados con la inestabilidad de la muestra debido a diferentes reacciones y procesos, como separación de fases, sedimentación, volatilización, hidrólisis, fotodegradación, precipitación, biodegradación, biotransformación e incorporación por los organismos [23].

De manera general, los ensayos o pruebas de toxicidad, se pueden definir según:

- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etc. [23].

### **1.3.2 Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna***

El género *Daphnia* corresponde al grupo de los cladóceros que a su vez pertenecen a la clase crustácea. Son los organismos de prueba más utilizados universalmente en los ensayos de toxicidad debido a su amplia distribución geográfica, a la facilidad de cultivo en el laboratorio, a que poseen una reproducción partenogenética (asegura uniformidad de respuesta) y que presentan un ciclo de vida corto junto con la producción de un alto número de crías [23].

Muchas especies dentro del género *Daphnia* son utilizadas extensamente en pruebas de toxicidad entre ella *D. magna*, *D. pulex* y *D. similis*, por lo cual existe amplia información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *D. magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros [23].

Las pruebas de toxicidad con *D. magna* consisten en exponer a neonatos menores de 24 h de edad a la muestra o compuesto a probar, por un periodo de 48 h. Una vez transcurrido ese tiempo se cuantifica el número de organismos inmóviles, lo que permite establecer la proporción o porcentaje de mortalidad producida [23].

## **1.4 Dureza del agua**

Se define como dureza del agua, a la capacidad que tienen los cationes presentes en la muestra para desplazar a los iones sodio o potasio de los jabones y formar productos insolubles, que son los que causan la formación de “costras” en los sanitarios utilizados en la higiene personal [24, 25]. Debido a que en el agua los iones calcio y magnesio son superiores a cualquier otro ión metálico que pudiera estar presente, la dureza se expresa como la concentración de carbonato de calcio que equivale a la concentración total de todos los cationes multivalentes presentes en la muestra. La determinación de la dureza es una prueba analítica de gran importancia que nos proporciona una medida de la calidad del agua potable para uso doméstico e industrial [24].

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), “Con las denominaciones de Agua potable de suministro público y Agua potable de uso domiciliario, se entiende la que es apta para la alimentación y uso doméstico: no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Deberá presentar sabor agradable y ser prácticamente incolora, inodora, límpida y transparente. El agua potable de uso domiciliario es el agua proveniente de un suministro público, de un pozo o de otra fuente, ubicada en los reservorios o depósitos domiciliarios.” Esta debe tener un valor de dureza ( $\text{CaCO}_3$ ) máximo de 400 mg/l [26].

### **1.4.1 Complejación con EDTA**

Haciendo uso durante los bioensayos de ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA), un agente complejante, se puede determinar si la toxicidad de una muestra se debe a la presencia de metales pesados. Para esto se añade a alícuotas de la muestra cantidades crecientes de este compuesto [24, 27]. Como el EDTA es un agente quelante fuerte, su adición a las soluciones de agua produce complejos relativamente no tóxicos con muchos metales. El hecho de que el EDTA elimine la toxicidad producida por metales se debe a que al formar complejos estables, estos metales dejan de estar en estado libre, disponibles y no pueden ejercer su acción tóxica. El éxito del EDTA depende del pH de la solución, del tipo y la especiación del metal, de la presencia de otros ligandos, y que la afinidad de unión que tenga el EDTA con el metal sea mayor que la afinidad del metal para con los tejidos del organismo. En el caso de aquellos

metales con los que forma complejos relativamente fuertes, la toxicidad del metal para los organismos acuáticos es frecuentemente baja [24].

Ya que el EDTA quela el calcio y el magnesio, la elección del nivel de EDTA a añadir se basaba originalmente en la premisa de que primero debía ser quelado todo el calcio y el magnesio presentes en la muestra antes que lo fueran los metales tóxicos. La cantidad de agente complejante que se requiere para quelar los metales debe ser adecuada, ya que el EDTA por encima de una cierta concentración se vuelve tóxico. La concentración tóxica de EDTA para un determinado efluente probablemente no sea la misma concentración que va a producir la toxicidad en un efluente. La toxicidad producida por metales no va a ser eliminada con aquellos niveles de EDTA que se encuentren por debajo de un determinado valor, en el rango medio de adiciones la toxicidad por metales va a ser eliminada por acción del EDTA y por encima de ese rango el EDTA sin reaccionar puede resultar tóxico por sí mismo [27].

## **1.5 Área de estudio**

La ciudad de Santa Rosa posee 103.241 habitantes, de los cuales el 90% se encuentra conectado al sistema cloacal [28]. El sistema cloacal está dividido en dos zonas: Norte y Sur (Figura 1). La planta Norte cuenta con seis piletones: dos anaeróbicos y cuatro aeróbicos y se encuentran a más de 15 Km de la laguna (Figura 2). La planta Sur cuenta con diez piletones: cinco anaeróbicos y cinco aeróbicos ubicados a unos 1.000 m de la laguna, con la que se encuentran unidas por un canal colector que deriva las aguas tratadas del sistema hacia la laguna. (Figura 2) [29].

La función de las plantas de tratamiento es tratar el líquido crudo para su posterior depósito en la cuenca del Bajo Giuliani. De este modo se asegura la protección epidemiológica, ya que se reducen e inactivan los organismos patógenos presentes en las aguas residuales y al mismo tiempo se disminuye la carga orgánica (DBO o DQO) del líquido residual, que puede afectar el nivel de oxígeno necesario para la vida acuática en el cuerpo receptor, preservando así la ecología del lugar [29].



Figura 1. Planta de tratamiento Norte y Sur de la ciudad de Santa Rosa



Figura 2. Izquierda: piletones de la planta Norte. Derecha: piletones de la planta Sur.

La laguna Bajo Giuliani se encuentra en la provincia de La Pampa, a unos 8 Km de la ciudad de Santa Rosa, en el departamento Capital y se puede acceder a ella a través de la Ruta Nacional N° 35 y de la Ruta Provincial N° 14 [29]. Está dividida en tres cuerpos de distinta extensión, dos están comunicados a través de un sistema de alcantarillas que pasan por debajo de la Ruta Nacional N° 35 en dirección norte-sur y el tercer cuerpo se encuentra separado por la Ruta Provincial N° 14 del segundo cuenco en orientación este-oeste [29].

La laguna se ve influenciada por la actividad antrópica de los pobladores que viven a su alrededor y que desarrollan distintas actividades. A su vez, cuenta con una serie de piletas facultativas en donde se ha establecido parte del tratamiento integral del sistema cloacal de la ciudad de Santa Rosa [29].

El agua que recibe el Bajo Giuliani proviene del escurrimiento de su propia cuenca, del trasvase por bombeo de la laguna Don Tomás (cuando el nivel de ésta se haya desbordado), del sistema de desagües pluviales sudeste de la ciudad, de los líquidos cloacales depurados en las plantas de tratamientos Norte y Sur y además, funciona como una zona de descarga de agua subterránea, captando de esta forma prácticamente la totalidad del escurrimiento. En los últimos años el nivel de la laguna Giuliani ha aumentado debido al incremento de la población, que genera un mayor caudal de líquidos residuales [29].

## **2. Objetivos e Hipótesis**

### **2.1. Objetivos**

#### **2.1.1. Objetivo**

Determinar la toxicidad de los residuos urbanos líquidos de la ciudad de Santa Rosa y la posible relación con la presencia de metales pesados.

#### **2.1.2 Objetivos específicos**

- ❖ Sumar la técnica de quelación con EDTA a la batería de bioensayos de toxicidad aguda ya establecidos en el grupo de trabajo.
- ❖ Poner a punto un método estandarizado de quelación con EDTA para el análisis de toxicidad por metales pesados.

### **2.2 Hipótesis**

Ante una eventual toxicidad de los residuos urbanos líquidos de la ciudad de Santa Rosa, podría esperarse que fracción de ésta se deba a la presencia de metales pesados.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Materiales, Reactivos y equipos utilizados**

##### **3.1.1 Reactivos y Materiales**

- EDTA disódico (ácido etilen-diamino-tetraacético, sal disódica dihidratada) p.a.
- Sulfato de magnesio heptahidratado p.a.
- Negro de eriocromo T, color Index 203
- Cloruro de sodio p.a.
- Amoníaco 25% p.a.
- Cloruro de amonio p.a.
- Hidróxido de sodio p.a.
- Solución patrón de calcio Titrisol Merck, ampolla de 1000 mg.
- Solución patrón de magnesio Titrisol Merck, ampolla de 1000 mg
- Agua destilada
- Material volumétrico de vidrio
- Mortero
- Placas multipocillo
- Recipientes de vidrio para cultivo y mantenimiento de *Daphnia magna*

##### **3.1.2 Equipos de Laboratorio**

- Balanza analítica, Adventurer, Ohaus.
- pHmetro, Denver Instrument
- Agitador magnético
- Cámaras de cría: temperatura  $21 \pm 2$  °C, 16:8 horas luz/oscuridad.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Muestreo**

El muestreo se realizó en el canal a cielo abierto que transporta los líquidos hacia el bajo Giuliani (ver descripción en área de estudio en la introducción) ubicado a 8 Km de la ciudad de Santa Rosa. Las muestras se recogieron en envases de polietileno y se conservaron sin el agregado de ningún tipo de aditivo. Las muestras a utilizar inmediatamente se conservaron a menos de 5 °C y las que se apartaron para la repetición de ensayos a posteriori se conservaron por debajo de -10 °C.

Se analizaron seis muestras correspondientes al periodo de noviembre de 2013 a octubre de 2014 (específicamente: diciembre 2013, febrero, abril, junio, agosto y octubre de 2014).

### **3.2.2 Preparación de soluciones para la titulación volumétrica**

#### **Solución 0,01 M de EDTA**

Se pesaron 3,723 gr de EDTA y se disolvieron en agua en un vaso de precipitado; se agregaron 0,12 gr de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  p.a. y se llevó a 1.000 ml con agua destilada. La solución se almacenó en un envase de vidrio boro silicato.

Valoración de la solución: se tomaron 5 ml de la solución de calcio de 1 gr/l y se tituló con la solución de EDTA.

Se calculó el factor de corrección de la solución de la siguiente forma:

$$F = \frac{12,5}{V_e}$$

Dónde:

- 12,5: volumen teórico de solución de EDTA 0,01 M para la titulación.
- $V_e$ : volumen experimental de la solución de EDTA 0,01 M empleado.

#### **Solución buffer pH 10**

Se pesaron 6,76 gr de cloruro de amonio, se vertieron en un vaso de precipitado y se agregaron 51 ml de amoníaco, se mezcló hasta disolución. Luego la solución se llevó a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado.

#### **Mezcla de indicador Negro de Eriocromo T (NET) y cloruro de sodio**

Utilizando mortero, se mezclaron 0,5 gr de NET con 100 gr de NaCl hasta obtener una mezcla fina.

### **Solución patrón de calcio 1 gr/L: 1 ml = 1,00 mg de CaCO<sub>3</sub>**

Se utilizó una ampolla Titrisol Merck de 1000 mg de Ca siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Solución patrón de magnesio 1 gr/L**

Se utilizó una ampolla Titrisol Merck de 1000 mg de Mg siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Solución control de dureza de 83 mg CaCO<sub>3</sub>**

Se tomaron 25 ml de la solución patrón de calcio y 5 ml de la solución patrón de magnesio con pipetas de doble aforo; se vertieron en un matraz aforado de 1.000 ml y se llevó a volumen con agua destilada; luego se homogenizó perfectamente.

### **3.2.3 Determinación de dureza por titulación volumétrica**

A través de la titulación volumétrica se titula todo el calcio y magnesio existente según el siguiente esquema (25):

$$\text{Dureza (mg CaCO}_3\text{/L)} = [\text{Ca (mg CaCO}_3\text{/L)}] + [\text{Mg (mg CaCO}_3\text{/L)}]$$

- mg Ca/L \* 2,497 = mg CaCO<sub>3</sub>/L
- mg Mg/L \* 4,118 = mg CaCO<sub>3</sub>/L

Reemplazando, es:

$$\text{Dureza (mg CaCO}_3\text{/L)} = 2,497 [\text{Ca (mg/L)}] + 4,118 [\text{Mg (mg/L)}]$$

Se tomaron 50 ml de la muestra de efluente y se colocaron en un Erlenmeyer, luego se agregó:

- 1 ml de la solución buffer pH 10, para elevar el pH a  $10,0 \pm 0,1$
- Una punta de espátula de NET y se agitó hasta lograr un color rojo vinoso uniforme.

Se tituló con una solución de EDTA 0,01 M hasta obtener un color azul.

La titulación se consideró válida si finalizó antes de que transcurran 5 minutos, contando desde la incorporación del buffer (minimiza la precipitación del CaCO<sub>3</sub>) y el volumen gastado fue menor de 15 ml.

### Cálculos y expresión de los resultados

En todos los casos:

- F = factor de corrección de la solución de EDTA 0,01 M.
- 0,01 = molaridad de la solución de EDTA utilizada en la titulación.

Dureza:

- Se expresa siempre en mg de CaCO<sub>3</sub>/L, sin decimales, en todo el rango del ensayo y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Dureza (mg CaCO}_3\text{/l)} = \frac{V1 \text{ (ml)} * 0,01 * F * 100 * 1000}{V3 \text{ (ml)}} = \frac{V1 \text{ (ml)} * F * 1000}{V3 \text{ (ml)}}$$

Dónde:

- V1= volumen en ml de EDTA 0,01M gastados en la titulación de la muestra
- V3= volumen de la muestra (50 ml)
- 100= peso en mol de carbonato de calcio (gr/mol)

### 3.2.4 Obtención de la solución de EDTA para bioensayos

Se midió la dureza del efluente aplicando el método estándar y se determinó de manera indirecta la concentración de la solución de EDTA a usar durante los bioensayos.

La concentración de EDTA correspondiente al punto final de la titulación de dureza en la muestra del efluente es la concentración de EDTA necesaria para 0,2 ml de EDTA agregados durante el ensayo, luego por medio de cálculos, se obtuvo la concentración de la nueva solución de EDTA para llevar a cabo los bioensayos.

Cálculos:

$$\begin{array}{ll} 50 \text{ ml de muestra de efluente} & \text{-----} \quad \text{gasto de EDTA} = 5 \text{ ml} \\ 10 \text{ ml de muestra de efluente} & \text{-----} \quad \text{gasto de EDTA (0,01m)} = 0,5 \text{ ml} \end{array}$$

$$\frac{0,5 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}} = 2,5 * X \quad \text{-----} \quad 2,5 \times 0,01 \text{ M} = 0,025 \text{ M}$$

### 3.2.5 Bioensayos

Los cultivos de *D. magna* se mantuvieron en peceras de 1 a 3 litros para garantizar el crecimiento y desarrollo de los individuos. Los organismos se conservaron en un medio con cantidades adecuadas de MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KCl y CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, óptimo para su crecimiento. El medio se mantuvo con un pH a 7,6-8,0 y aireado permanentemente hasta su uso.

Para la alimentación de las *daphnias* se usaron suspensiones algales de *Scenedesmus sp.* Las algas se cultivaron en medio Detmer modificado. Los cultivos algales se realizaron siguiendo las recomendaciones de Castillo Morales G, (2004) [23]. La limpieza se realizó con una pipeta plástica despuntada que permitió succionar del fondo del recipiente los restos de alimentos y suciedad presentes. Una vez finalizada la limpieza, se completó al volumen original con medio de cultivo fresco.

Para asegurar que los neonatos de *D. magna* no superasen las 24 h de nacidos, el día previo al ensayo se extraían todas las crías.

## Procedimiento de la prueba

Previamente a la realización del bioensayo, se llevó a cabo un ensayo de referencia o prueba de sensibilidad para evaluar si los organismos se encontraban en condiciones fisiológicas óptimas para realizar las pruebas de toxicidad. La sustancia tóxica de referencia utilizada fue el Cr (Cr VI) a partir del  $K_2Cr_2O_7$ .

Para la realización de la prueba, se prepararon distintas diluciones del tóxico de referencia, de manera de tener entre ellas a la concentración de tóxico que produce la muerte en el 50 % de los individuos expuestos ( $CL_{50}$ ). Este intervalo de concentraciones fue definido previamente, a partir de pruebas preliminares que permitieron generar una carta de control. A partir de los resultados obtenidos se determina la  $CL_{50}$  promedio para esa sustancia con su correspondiente desviación estándar ( $\sigma$ ). El intervalo de concentraciones comprendido entre el límite superior e inferior de la desviación estándar es aquel en el cual varía la respuesta del organismo al tóxico seleccionado.

Para analizar las muestras ambientales, se prepararon diluciones seriadas de la muestra del efluente (Figura 3), se usaron tubos de ensayo como recipientes de la prueba y a cada uno se le colocaron 10 ml de cada una de las diluciones, por duplicado. Las diluciones seriadas se realizaron al 50% y permitieron abarcar un rango de concentración del 100 al 12,5%. En caso de que la toxicidad de la muestra lo requiriera se incorporaron más diluciones. De éste primer ensayo se obtuvo la toxicidad basal de la muestra. Una vez conocida la toxicidad de base y la dureza de la muestra se realizaron los ensayos con adición de EDTA [27]. Para esto se procedió de igual manera en las diluciones pero a una serie de tubos se les agregó 0,1 ml; a otra 0,2 ml, y a la tercera 0,4 ml de la solución de EDTA preparada anteriormente (Figura 4). Los tubos reposaron durante 2 horas para darle tiempo suficiente al EDTA de complejar los posibles metales que estuvieran presentes en la muestra. Antes y después de la introducción del EDTA se controló el pH de cada uno de los tubos para asegurarnos de que no haya habido fluctuaciones.

Al cabo del tiempo de reposo, se introdujeron 5 neonatos a cada tubo, se cubrieron con papel parafilm y se colocaron ambas gradillas en condiciones controladas de iluminación y temperatura por un período de 48 h.

Pasadas las 48 h se revisaron los tubos, registrando el número de organismos muertos (carencia de movilidad). Antes de realizar el recuento, los tubos se agitaron en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo.

Para determinar las  $CL_{50}$  se aplicó el método probit y análisis de regresión lineal. Para esto se transformaron los valores de dilución del efluente (%) a logaritmos y, mediante el uso de tablas probit, se transformaron los porcentajes de mortalidad en unidades probit. Esta transformación linealiza los datos.

Luego, a través de un análisis de regresión lineal, se estimó la  $CL_{50}$ .

Todas las actividades desarrolladas en el laboratorio se resumen y muestran en el diagrama de flujo (Figura 5), en él se pueden observar todas las operaciones llevadas a cabo en forma ordenada

### Diagrama: preparación de las diluciones

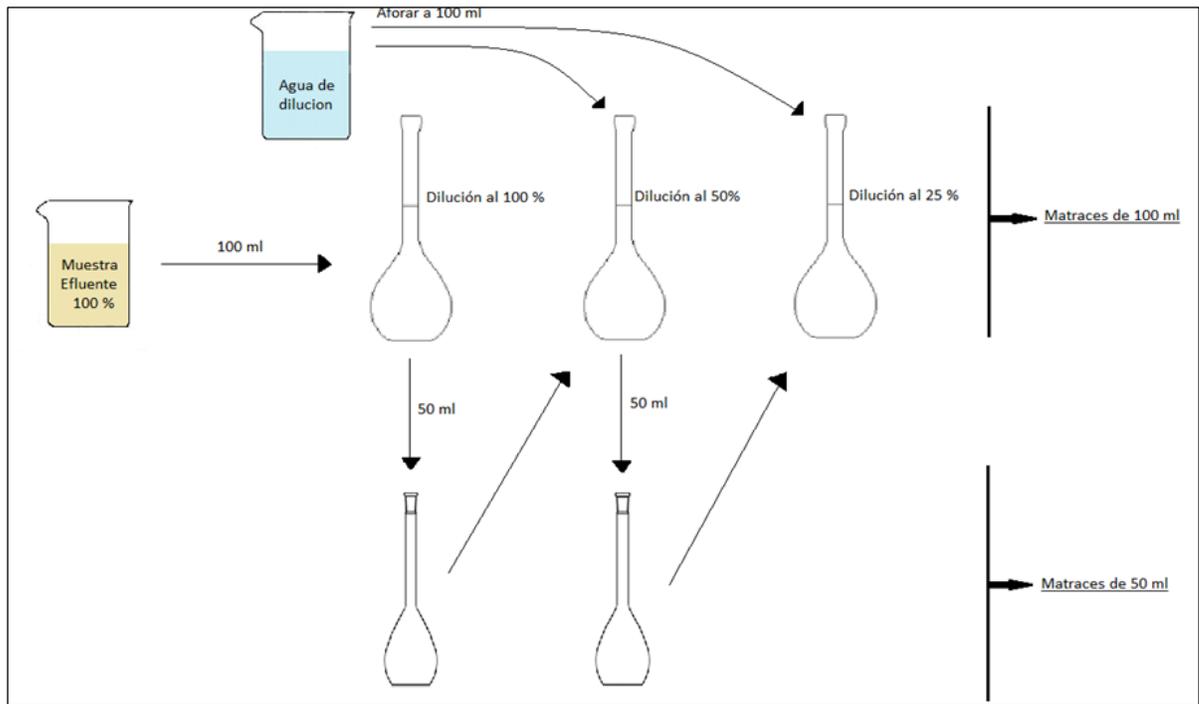


Figura 3. Procedimiento seguido para la preparación de las diluciones de cada una de las muestras. A modo de ejemplo se representa gráficamente hasta la dilución al 25%.

### Diagrama: preparación de la prueba (bioensayo)

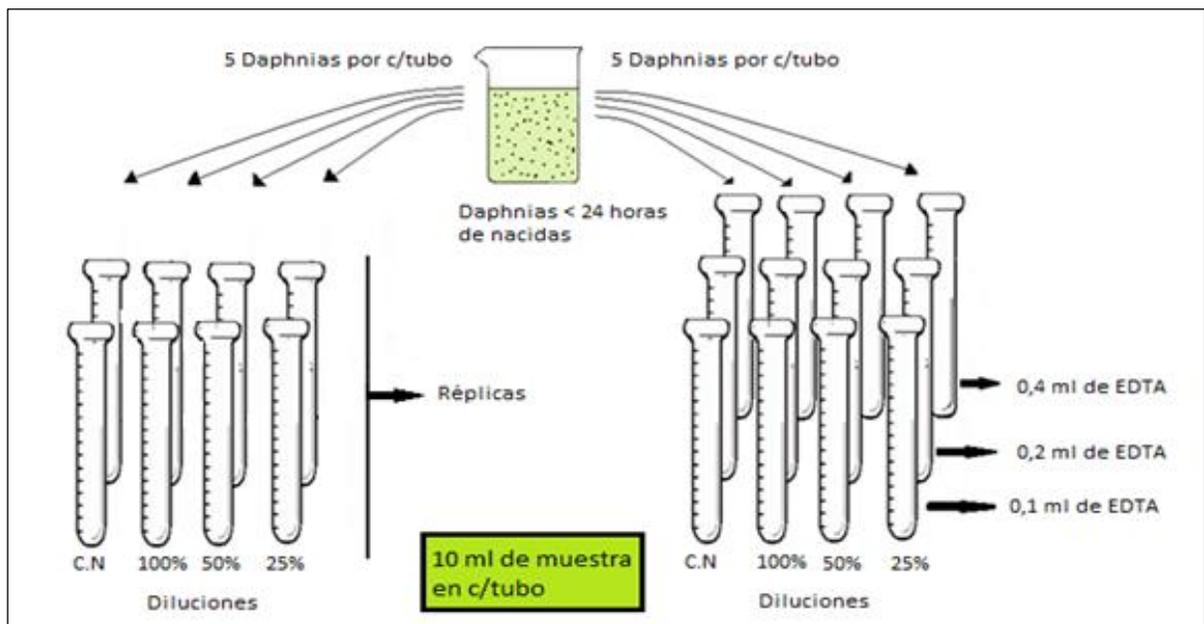
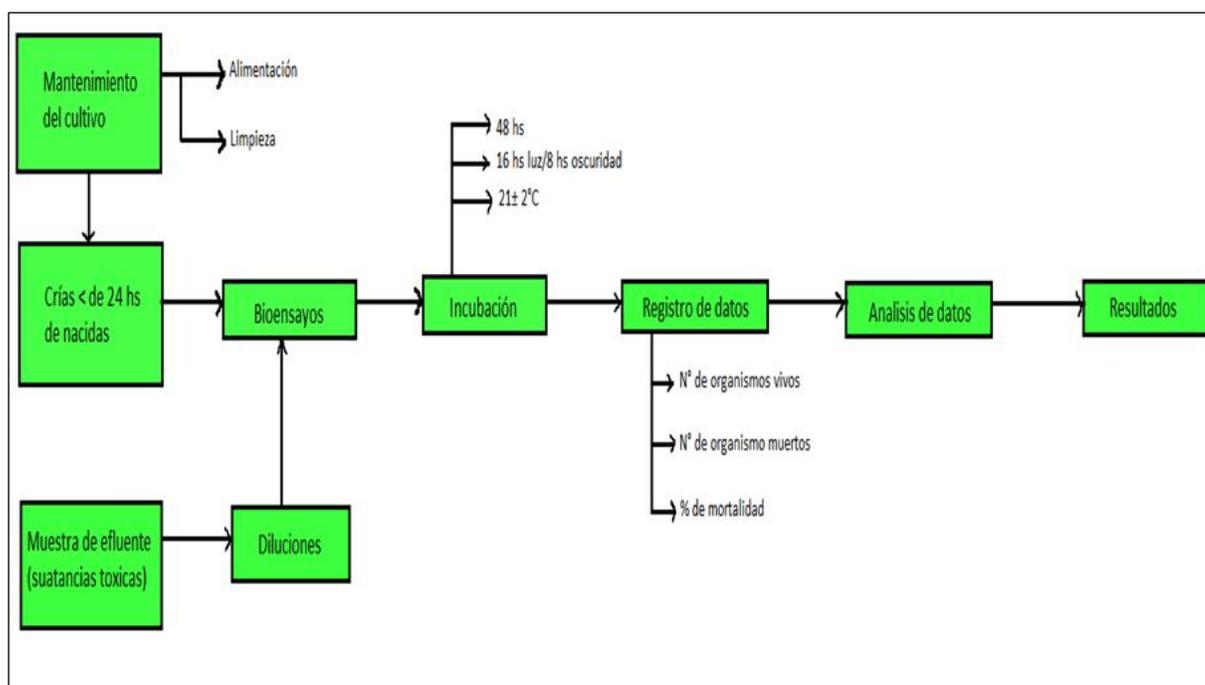


Figura 4. Procedimiento seguido durante la preparación del bioensayo, con y sin el agregado de EDTA. C.N: control negativo

## Diagrama de flujo de las actividades



**Figura 5.** Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del protocolo de prueba de *Daphnia magna*.

Adaptado de Castillo Morales G, et al.; 2004. Ensayos toxicológicos y Métodos de evaluación de calidad de aguas. “Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.”

## 4. Resultados y Discusión

En las figuras 6, 7, 8, 9, 10, y 11 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los efluentes analizados. En base a las ecuaciones de regresión lineal correspondientes a cada una de las curvas, se calcularon las CL<sub>50</sub> que se presentan en la Tabla 1.

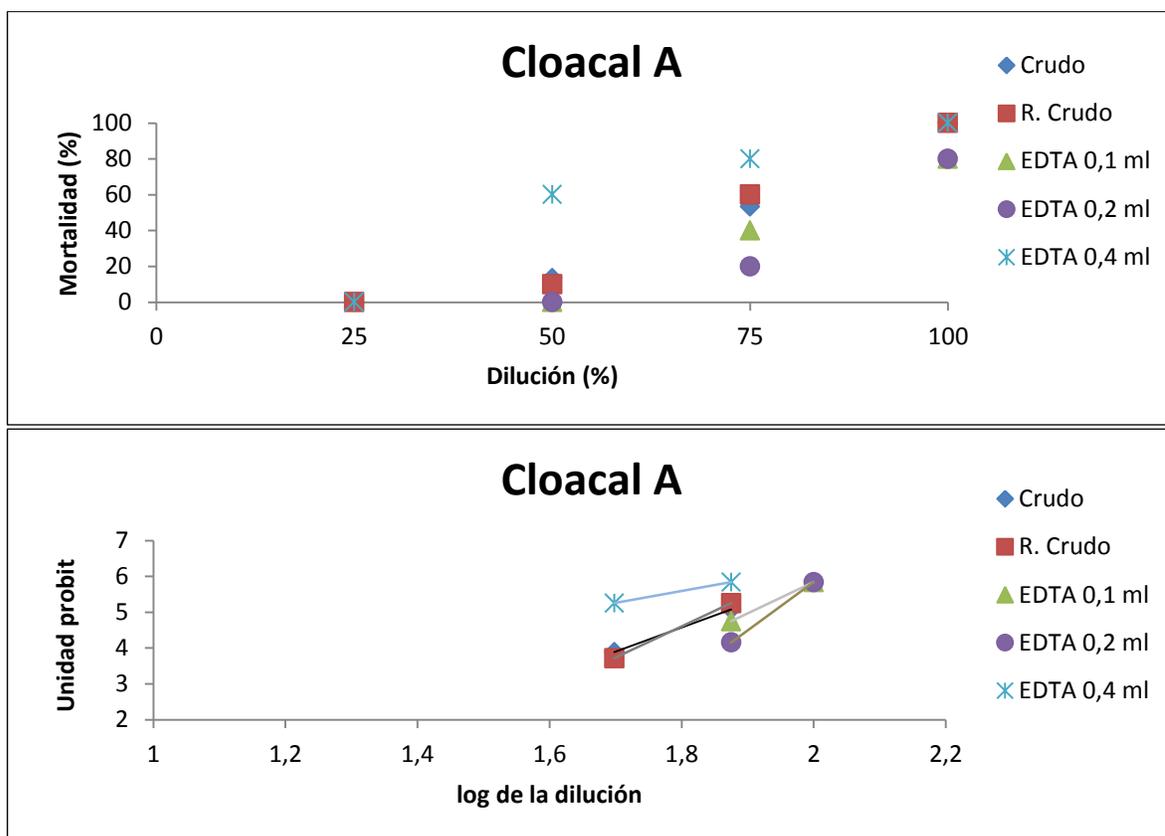
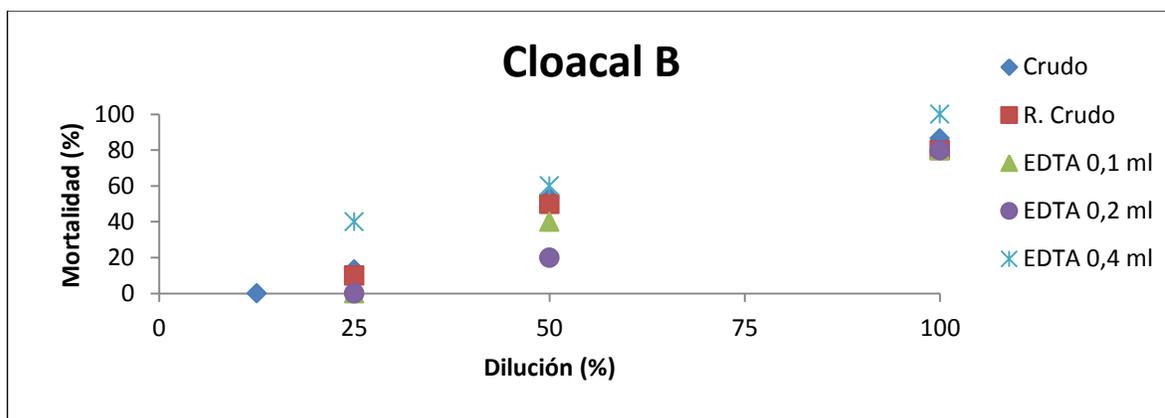


Figura 6. Resultados obtenidos para la exposición de *D. magna* durante 48 h al efluente cloacal A crudo y a tres niveles de agregado de EDTA con control positivo (R. Crudo). Se representa Mortalidad (%) en relación a la dilución ensayada y su transformación a unidades probit.



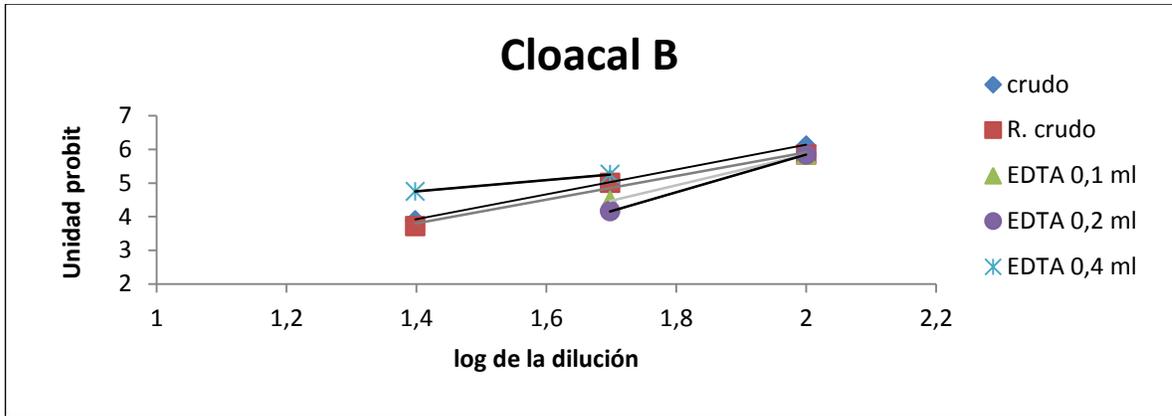


Figura 7. Resultados obtenidos para la exposición de *D. magna* durante 48 h al efluente cloacal B crudo y a tres niveles de agregado de EDTA con control positivo (R. Crudo). Se representa Mortalidad (%) en relación a la dilución ensayada y su transformación a unidades probit.

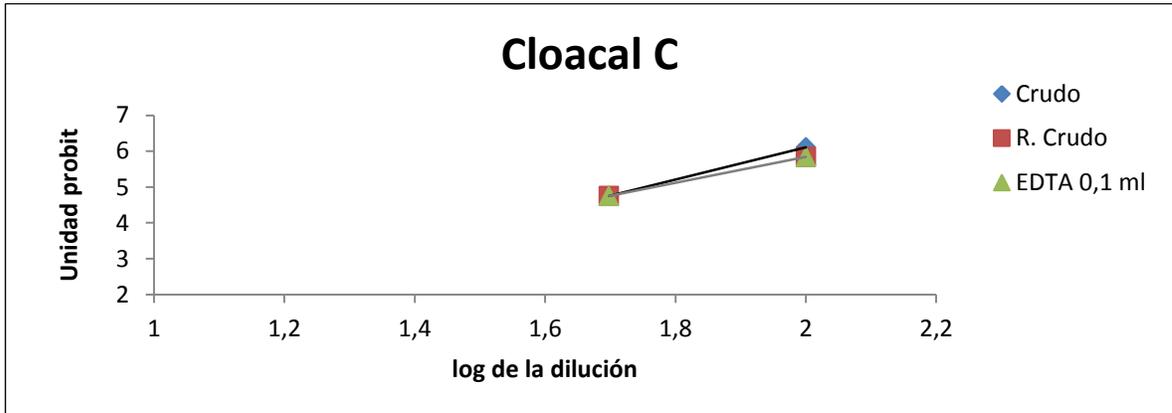
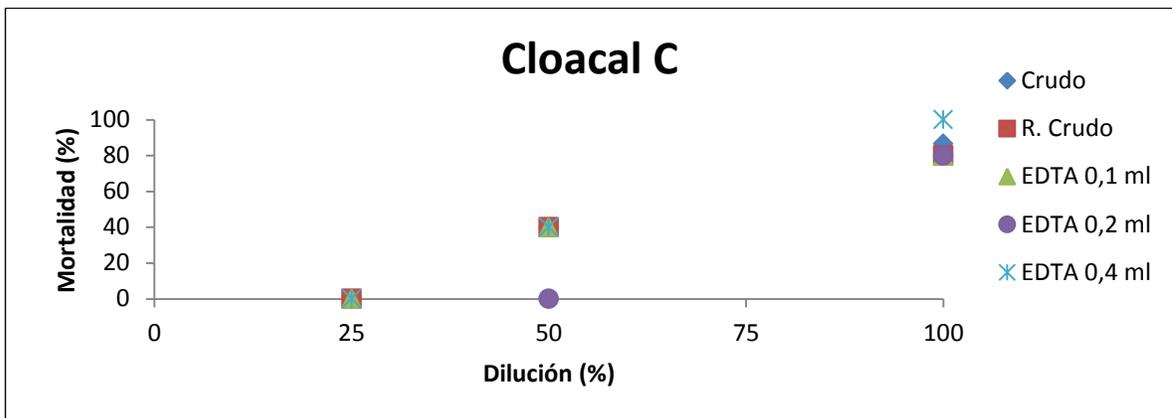


Figura 8. Resultados obtenidos para la exposición de *D. magna* durante 48 h al efluente cloacal C crudo y a tres niveles de agregado de EDTA con control positivo (R. crudo). Se representa Mortalidad (%) en relación a la dilución ensayada y su transformación a unidades probit.

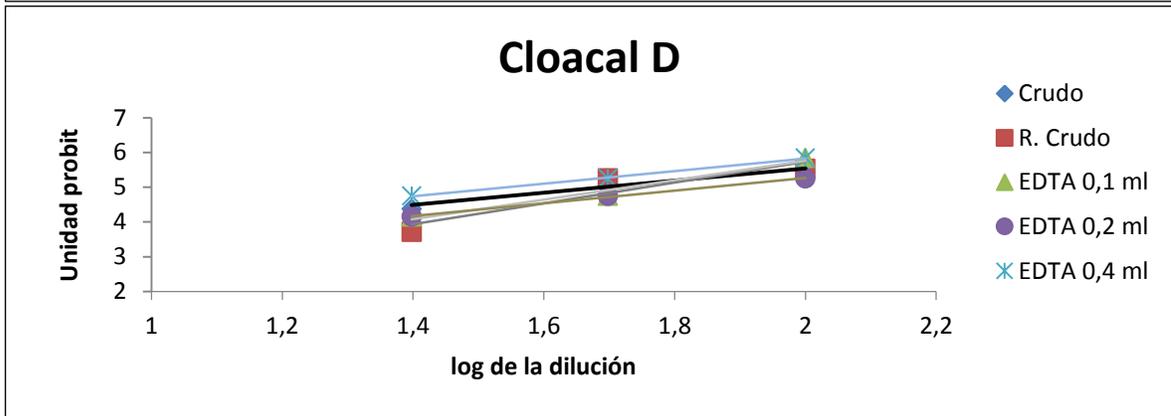
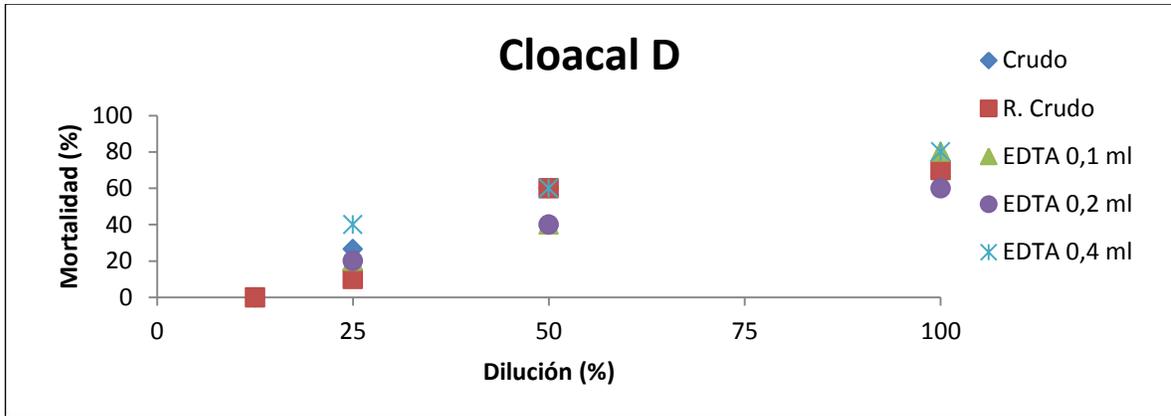
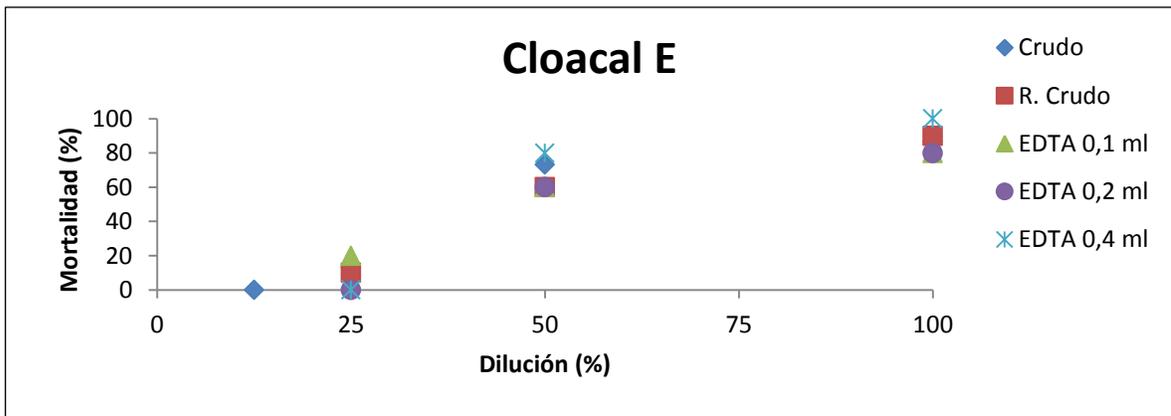
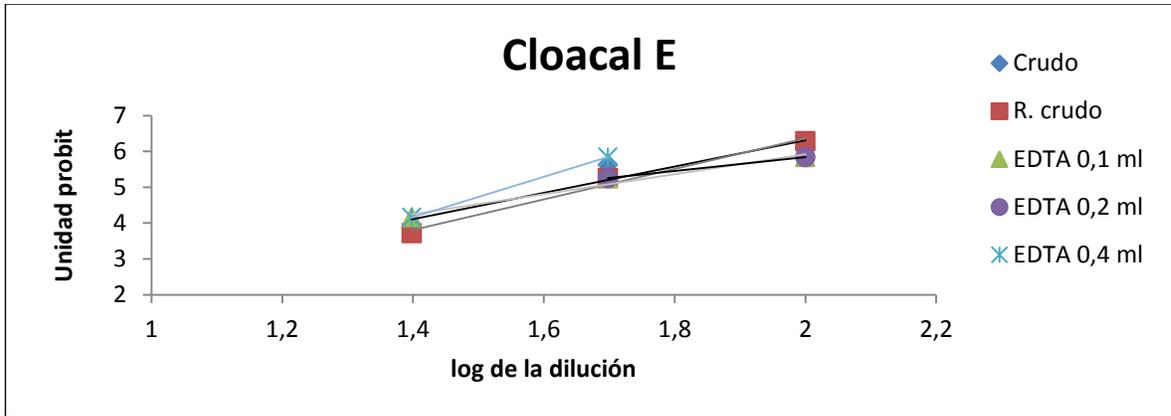
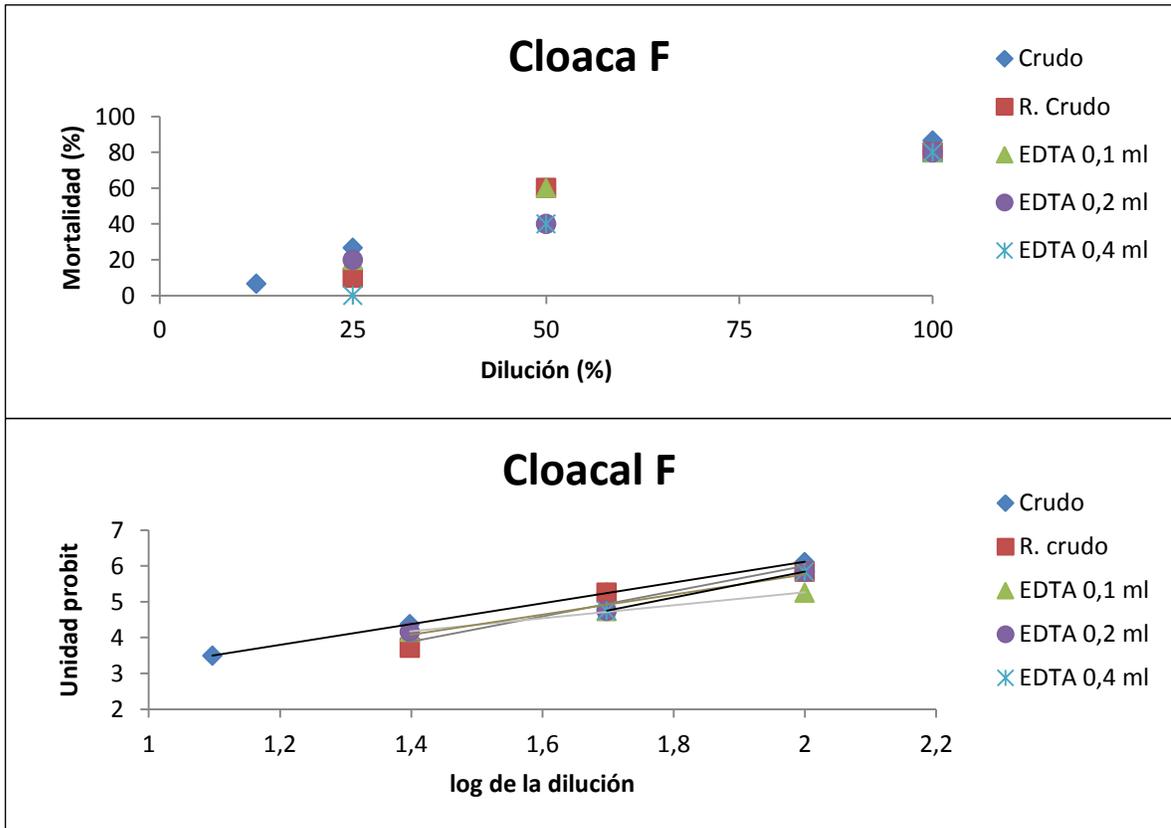


Figura 9. Resultados obtenidos para la exposición de *D. magna* durante 48 h al efluente cloacal D crudo y a tres niveles de agregado de EDTA con control positivo (R. crudo). Se representa Mortalidad (%) en relación a la dilución ensayada y su transformación a unidades probit.





**Figura 10.** Resultados obtenidos para la exposición de *D. magna* durante 48 h al efluente cloacal E crudo y a tres niveles de agregado de EDTA con control positivo (R. crudo). Se representa Mortalidad (%) en relación a la dilución ensayada y su transformación a unidades probit. Las curvas correspondientes al agregado de 0,1 y 0,2ml de EDTA se encuentran superpuestas



**Figura 11.** Resultados obtenidos para la exposición de *D. magna* durante 48 h al efluente cloacal F crudo y a tres niveles de agregado de EDTA con control positivo (R. crudo). Se representa Mortalidad (%) en relación a la dilución ensayada y su transformación a unidades probit.

Muestra	Efluente Crudo			EDTA 0,1 ml		EDTA 0,2 ml		EDTA 0,4 ml	
	Crudo	Re. Test crudo	Media $\pm$ SD	CL50	$\Delta\%$	CL50	$\Delta\%$	CL50	$\Delta\%$
A	73	70,22	71,6 $\pm$ 1,96	80,29	12	86,6	21	41,9	41
B	49,16	54,9	52,0 $\pm$ 4,0	65,26	25	70,6	36	35,3	32
C	56,8	58,6	57,7 $\pm$ 1,2	58,6	1	-	-	-	-
D	48,7	56,8	52,7 $\pm$ 5,7	53,5	1	71,3	35	35,02	33
E	43,9	47,7	45,8 $\pm$ 2,6	46,6	2	37	19	35,3	23
F	41,18	52,04	46,6 $\pm$ 7,6	71,65	54	53,6	15	58,6	26

Tabla 1. Valores de CL<sub>50</sub> calculadas para cada uno de los efluentes. La CL<sub>50</sub> media es el promedio calculado entre la CL<sub>50</sub> de la toxicidad base y su control (Re test base). Con un guión (-) se indica las CL<sub>50</sub> que no pudieron ser calculadas debido a que no se registraron valores de mortalidad intermedios necesarios para poder aplicar la metodología probit.  $\Delta\%$  indica la diferencia porcentual entre la CL<sub>50</sub> media y la CL<sub>50</sub> calculada luego de la incorporación de EDTA.

En base a las CL<sub>50</sub> obtenidas podemos observar que los efluentes cloacales líquidos (crudos) analizados presentan toxicidades medias (CL<sub>50</sub>) entre 45 y 71 % (Tabla 1).

La adición de EDTA generó modificaciones de diferentes magnitudes en la toxicidad de base de cada uno de los efluentes.

La incorporación de 0,1 ml de EDTA disminuyó en un 54 % la toxicidad del efluente F, y en un 25 % la del efluente B. Con respecto a los efluentes A, C, D y E, las disminuciones fueron menores con una diferencia respecto del test de base del 12, 1.1 y 2 % respectivamente.

El agregado de 0,2 ml de EDTA disminuyó en un 21, 36, 35 y 15 % la toxicidad de las muestras A, B, D y F y produjo un aumento en la muestra E del 19%.

La incorporación de 0,4 ml de EDTA generó en la mayoría de las muestras, A, B, D y E un incremento de la toxicidad. En la muestra C, no se pudo calcular la CL<sub>50</sub> debido a la escases de datos obtenidos durante el bioensayo y en la muestra F se produjo una disminución de la toxicidad.

Los valores encontrados en el análisis de las muestras, a través de la incorporación de los diferentes niveles de adición de EDTA muestran que tanto la incorporación de 0,1 ml y de 0,2 ml de EDTA generan disminuciones con respecto a la toxicidad de base en la mayoría de las muestras analizadas, lo que indicaría que el nivel agregado de EDTA es suficiente para complejar el calcio y el magnesio, causantes de la dureza de la muestra, como así también los metales presentes, por lo que dejarían de estar en estado libre y no podrían ejercer su acción tóxica. Podemos observar que las disminuciones más importantes se alcanzan con el agregado de 0,2 ml de EDTA.

En el caso de la adición de 0,4 ml de complejante los resultados muestran aumentos de la toxicidad en la mayoría de las muestras analizadas, lo que posiblemente se deba a la propia toxicidad del EDTA, por lo cual, sería importante ajustar el nivel de EDTA requerido para eliminar la toxicidad por metales, ya que el exceso del mismo se vuelve tóxico cuando está presente por encima de una cierta concentración [27]. La  $CL_{50}$  para *Daphnia magna* en condiciones estáticas es 625 mg/L para 24 h [30], un valor mayor a los utilizados en los ensayos de este trabajo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este valor corresponde a la exposición únicamente a EDTA y, en caso de este trabajo, la incorporación de EDTA se realizó a una mezcla compleja, donde la toxicidad del excedente de EDTA también puede resultar incrementada como resultado de la interacción con todos los demás componentes [27].

## 5. Conclusiones

La metodología usada en este trabajo es una herramienta sumamente aplicable para determinar en qué medida los metales inciden en la toxicidad basal de las muestras cloacales sin determinar la concentración, ni el tipo de metales presentes. Debido a que no requiere de gran equipamiento para llevarla a cabo, la técnica es económica y sencilla de aplicar en pequeños laboratorios.

Cabe recordar, que las muestras analizadas son complejas y heterogéneas en cuanto a su composición, por lo que la toxicidad de los metales va a depender de múltiples factores, entre ellos de las interacciones que se produzcan entre éstos y los demás componentes de la muestra. Por ésta razón la toxicidad asociada a la presencia de metales no puede estimarse solo a partir de su concentración ya que se dejarían fuera del análisis la interacción entre componentes (sinergismo, potenciación, antagonismo o neutralización). Muchas veces en las mezclas los efectos tóxicos pueden verse a concentraciones en las cuales los compuestos individuales no generan toxicidad.

A futuro, se espera mejorar la puesta a punto de aspectos técnicos de la metodología que aseguren su reproducibilidad. Asimismo, sería útil complementar estos ensayos con datos cuantitativos del contenido de metales de las muestras para así conocer su poder predictivo.

En base a los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental del presente trabajo y luego del análisis, se concluye que parte de la toxicidad de los residuos urbanos líquidos (RULes) de la ciudad de Santa Rosa puede atribuirse a la presencia de metales pesados. En función de lo dicho anteriormente también se confirma que la metodología empleada (quelación de metales pesados a través de la adición de un agente complejante como el EDTA), sumada a los bioensayos ya estandarizados, es aplicable y útil para evaluar en qué medida la presencia de metales pesados incide en la toxicidad de los RULes.

## 6. Bibliografía

1. Degrossi, M.C. (2013). *Conceptos Básicos de Toxicología: Toxicocinética*. Buenos Aires. Disponible en: <http://repositorio.ub.edu.ar:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3658/4050%20-%20toxicologia%20-%20degrossi.pdf?sequence=1>
2. Silbergeld, E.K. (2001). Toxicología (Cap. 33). En: *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo*. OIT. (Vol. 1). España.
3. Repeto, M. (1997). Conceptos y Definición de Toxicología y Toxicidad (Cap. 2). En: *Toxicología Fundamental*. (3ª. Ed.). España: Díaz de Santos.
4. Casarett, L.J.; Doull, J.; Klaasen, C.D. (2001). *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. (6º Ed.). Mc Graw-Hill.
5. Foth, E. (1999). Ecotoxicology (Cap. 45). En: *Toxicology*. (6º Ed.). Ed: Marquardt H, Schäfer SG, McClellan & Welsch F. Academic Press.
6. Da Camara, L.; Hernández, M.; Paz, L. (2012). *Manual de Diseño para Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Alimenticias*. Buenos Aires. <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Mandisplatraaguresaliar.pdf>
7. “Manual de Depuración de Aguas Residuales Urbanas” (2008). Monográfico. Ed. Ideasmares. Disponible en: <http://alianzaporelagua.org/documentos/MONOGRAFICO3.pdf>
8. Rojas, R. (2002). *Gestión Integral de Tratamiento de Aguas Residuales*. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/OMS. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaar/e/fulltext/gestion/aguaresi.pdf>
9. Contreras, E.M. (2001). *Análisis de Variables que Afectan el Desarrollo de Microorganismos Filamentosos en Sistemas de Barros Activados para el Tratamiento de Efluentes de la Industria Alimenticia*. Tesis Doctoral. Facultad de Cs. Exactas, UNLP.
10. Üstün, G.E. (2009). *Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants*. Faculty of Engineering and Architecture, Dep. Environmental Engineering, Uludag University.

11. Martín García, I., Betancort R, J.R., Salas Rodríguez, J.J., Peñate Suárez, B., Pidre Bocado, J.R., Sardón Martín, R. (2006). *Guía Sobre Tratamientos de Aguas Residuales Urbanas para Pequeños Núcleos de Población. Mejora de la Calidad de los Efluentes*. Ed. ITC.
12. Sorrequieta, A. (2004). *Aguas Residuales: Reúso y Tratamiento. Lagunas de Estabilización: Una Opción para Latinoamérica*. Facultad de Ciencias. UNR.
13. Robledo- Santoyo, E., Maldonado Torres, R., Ojeda Trejo, E., Corlay Chee, L., Hernández Acosta, E., Espinosa Hernández, V., Rubiños Panta, J.E. (2010) *Sales solubles y metales pesados en suelos tratados con biosólidos*. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 16. <http://148.215.1.176/articulo.oa?id=62915867013> ISSN 2007-3828
14. Karvelas, M., Katsoviannis, A., Samara, C. (2003). *Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process*. Chemosphere 53(10):1201-10.
15. Contreras Pérez, J.B, Mendoza, C.L., Gómez, A. (2004). *Determinación de Metales Pesados en Aguas y Sedimentos del Rio Haina*. Ciencia y Sociedad. 29, (1), 38-71.
16. Valdez Perezgasga, F., Cabrera Morelos, V. (1999). *La Contaminación por Metales Pesados en Torreón, Coahuila, México*. Centro de Estudios Políticos de Texas. (1º Ed). <http://www.texascenter.org/publications/torreon.pdf>.
17. Yagnentkovsky, N. (2011). *Aplicación de Técnicas de Biorremediación para el Tratamiento de Residuos Industriales con Alto Contenido de Metales Pesados*. Tesis doctoral. Facultad de Cs. Exactas, UNLP.
18. Casares, M.V. (2012). *Biodisponibilidad y Toxicidad de Metales Pesados en Aguas Naturales con Características Físico-Químicas Extremas. Bases para su Monitoreo y Remediación*. Tesis doctoral. Facultad de Cs. Exactas y Naturales. UBA.
19. Hernández Martínez, E.A; Domínguez Sánchez, L. (2012). *Comportamiento de Metales Pesados en Distintos Tipos de Lechos Porosos*. Sistemas Ambientales, 5, (1), 41-52.
20. Cameán, A.M.; Repetto, M. (2006). *Riesgo Tóxico por Metales Presentes en Alimentos* (Cap. 17). En: *Toxicología Alimentaria*. Madrid-Buenos Aires: Díaz de Santos.

21. Sorme, L; Lagerkvistb, R. (2002). *Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm*. Department of Water and Environmental Studies, Linköping University.
22. Escher, B., Leusch, F. (2011). *Bioanalytical tools in water quality assessment*. Ed. IWA, Londres.
23. Castillo Morales, G. (2004). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. IMTA, Mécvssdzxico.
24. Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, F.J., West, D.M. (2001). *Titulaciones de formación de complejos y precipitados: ventajas de los reactivos que forman complejos y de los agentes precipitantes* (Cap.15). En: *Química analítica*. 7ªEd. McGraw-Hill Interamericana.
25. Franson, M.A.H. (Ed). (1992). Dureza (Cap. 2340). En: *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Díaz de Santos.
26. Código Alimentario Argentino (CAA). Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp)
27. Norberg-King, T.J, Mount, D.I., Durhan, E.J., Ankley, G.T., Burkhard, L.P. (1991). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures*. 2º Ed. EPA/600/6-91/003.
28. Dirección General de Estadísticas y Censos. Gobierno de La Pampa. Disponible en: <http://www.estadistica.lapampa.gov.ar/index.php>
29. Pratts, P. (2011). “*Evaluación del Impacto Antrópico Sobre la Dinámica Hidrológica e Hidroquímica de la Laguna del Bajo Giuliani Santa Rosa La Pampa*”. UNLPam. Secretaría de Investigación y Posgrado.
30. HSDB-TOXNET National Institute of Health. <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>