

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**Tesina presentada para obtener grado de  
LICENCIADA EN QUIMICA**

**USO DE BIOINDICADORES PARA EL CONTROL DE CORRIENTES DE  
DESECHOS**

Presentado por  
**MARIA SILVIA ROSANE**

Director  
**DR. CARLOS HECTOR COLANGELO**

Co-director  
**DR. JOSE MANUEL CAMIÑA**

**SANTA ROSA-LA PAMPA**

**ARGENTINA**

**2009**



## **PREFACIO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciada en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevo a cabo en INTA Castelar Provincia de Buenos Aires, conjuntamente con la Universidad Nacional de La Pampa, bajo la dirección del Dr. Carlos COLANGELO y bajo la codirección del Dr. José Manuel CAMIÑA.

Se agradece la colaboración al Dr. Carlos Colangelo, Dr. José Camiña, Msc. Susana Boeris, integrantes de laboratorio de Mosca domestica de INTA Castelar, Ing. Diana Crespo, Lic. En Cs. Ambientales Eugenia Beily, Lic. En Análisis Ambiental Patricia Bres, Microbióloga Fabiana Bressan, Ing. Nicolás Riera, Ingeniero Pedro Rizzo, Braian Young INTA General Pico, Asilo de ancianos Don Bosco General Pico, Huerta comunitaria General Pico, familiares y amigos.

**03 de Agosto de 2009**

**María Silvia Rosane**

**INTA Castelar -Departamento de Química**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Universidad Nacional de La Pampa**



## RESUMEN

Con el desarrollo del mundo actual se ha incrementado considerablemente la utilización de productos químicos de distintas características que provocan efectos nocivos en el hombre y en el medio ambiente cuando se encuentran en concentraciones elevadas. La determinación de estos elementos y la evaluación del riesgo son importantes debido a que son aspectos a tener en cuenta en las reglamentaciones correspondientes a usos de estos elementos, niveles de vertidos, caracterización de contaminación, impacto ecológico, etc.

El tratamiento de los efluentes es un tema de mucha importancia debido a que se producen corrientes de desechos con altos niveles de productos químicos que muchas veces son vertidos directamente a cursos de agua, provocando contaminación que afecta no solo a especies cuyo hábitat es el agua sino que se extiende a organismos terrestres y al hombre. El monitoreo de los niveles de contaminación de estas corrientes de desecho requiere de análisis periódicos.

Se han desarrollado distintos métodos físico-químicos para determinación de metales pesados, los cuales requieren gastos elevados de instrumental, capacitación, tiempo, etc. y a su vez la caracterización del impacto se realiza de manera predictiva, en cambio con la utilización de indicadores biológicos de exposición muchos de estos inconvenientes pueden evitarse debido a las características que presentan estos bioensayos.

El objetivo del presente trabajo es la caracterización del comportamiento de tres indicadores biológicos de exposición para análisis de corrientes de desechos y a su vez destacar la importancia de la selección del indicador correcto para el elemento que se desea analizar.

## SUMMARY

With the development of the world today has increased the use of chemicals of different features that cause harmful effects in humans and the environment when they are in high concentrations.

The determination of these factors and risk assessment are important because they are aspects to consider in the regulations for these uses, levels of discharge, characterization of pollution, environmental impact, etc.

The effluent treatment is an issue of great importance because they produce debris flows with high levels of chemicals that are often discharged directly into waterways, causing pollution that affects not only species whose habitat is water, but which extends to terrestrial organisms and humans.

The monitoring of pollution levels of this waste requires periodic analysis.

Have developed different physico-chemical methods for determining heavy metals, which require expensive instrumentation, training, time, etc... And in turn impact the characterization is so predictive, in contrast to the use of biological indicators of exposure many of these drawbacks can be avoided due to the characteristics presented by these bioassays.

The objective of this paper is the characterization of the behavior of three biological indicators of exposure for analysis of debris flows and in turn highlight the importance of choosing the correct indicator for the item you wish to analyze.

## CAPITULO 1. INTRODUCCION

### 1.1. TOXICOLOGIA

#### 1.1.1. DEFINICION

Es una rama de la ciencia que se dedica al estudio de las sustancias químicas y los agentes físicos que son capaces de provocar alteraciones a los seres vivos, estudiando a su vez, los efectos nocivos que estas pueden ocasionar, teniendo en cuenta además de las características intrínsecas de cada sustancia, las vías de exposición, mecanismos de biotransformación, dosis, etc. Su campo de estudio abarca desde la clasificación de las sustancias en cuanto a su toxicidad, la determinación de dosis, la reglamentación de las sustancias, la determinación de efectos, mecanismos de acción, tratamiento, prevención, etc. [1]

Se denomina tóxico a toda sustancia capaz de provocar efectos nocivos sobre algún ser vivo. Cualquier sustancia puede actuar como tóxica dependiendo de las condiciones del sujeto, el tiempo de exposición, de la dosis y del ambiente. [1]

#### 1.1.2. DESARROLLO Y EVOLUCION

Las referencias históricas permiten verificar la utilización de diferentes sustancias, ya sea con fines terapéuticos, criminales, para exterminio de plagas, etc. El hombre maneja desde tiempos muy remotos sustancias con propiedades tóxicas muy diferentes, las cuales a medida que pasan los años van aumentando en cantidad. En un principio, según cuenta la historia, las sustancias utilizadas como tóxicos eran de origen vegetal o mineral, luego a medida que avanzaron los años, empezaron a sintetizarse otro tipo de compuestos.

Según data en la época del paleolítico, se impregnaban las puntas de flechas con sustancias tóxicas, y de allí es de donde deriva la palabra tóxico –del griego *toxicon*-veneno en punta de flecha. Ya alrededor del siglo XVII a.C. había escritos que hacen referencia a medicamentos y venenos a partir de plomo, opio, cobre, etc. Además, según se puede observar en algunos hechos o personajes históricos, como el de rey de Nápoles, los venenos o sustancias tóxicas han sido utilizadas desde tiempos muy remotos, obviamente produciéndose avances con el paso de los años que permitieron otras formas de administración, nuevas sustancias, nuevos antídotos, etc. Las publicaciones más

importantes de la antigüedad datan del siglo I d.C., donde el médico Dioscórides escribe sobre plantas medicinales y venenos. [1]

El concepto de dosis fue enunciado por primera vez por Paracelso quien señalaba que ciertos venenos administrados a dosis bajas podían actuar como medicamentos.

En 1564 se publicó una trilogía donde se establecen los primeros pensamientos toxicológicos, remarcándose el concepto de que solamente la dosis determina que una cosa sea o no veneno: dosis sola o *facit venenum* (cita textual de la trilogía). Luego se fueron relacionando las distintas ciencias como la biología, medicina, la química etc., obteniéndose a partir de la integración de conceptos comunes avances importantes que luego fueron utilizados en esta nueva ciencia que se llamó posteriormente toxicología y que como se puede observar, incluye conceptos de ciencias relacionadas como las mencionadas anteriormente. [1]

A partir del siglo XVIII comenzaron a incrementarse las publicaciones acerca de la toxicología, comenzándose a divisar las diferentes ramas que pueden encontrarse dentro de ella y produciéndose muchos avances en el área debido al progreso relacionado con la química, que permitió tanto el análisis, detección y síntesis de nuevas sustancias.

A medida que las sustancias tóxicas iban ganando importancia o produciendo efectos tóxicos en distintos sectores, esto determinó que fueran surgiendo las distintas ramas de la toxicología, por ejemplo el aumento en los riesgos de trabajo determinó el desarrollo de la toxicología ocupacional, etc. [2]

### **1.1.3. RAMAS DE LA TOXICOLOGIA**

A medida que pasaron los años, la creciente utilización de sustancias tóxicas para diferentes fines o en diferentes sectores hizo que se fueran formando lentamente ramas dentro de la toxicología cuyo fin u objeto de estudio variaba en cada una de ellas. En tal sentido, la creciente utilización de tóxicos en los envenenamientos en tiempos remotos llevo a la necesidad de la creación de la toxicología judicial o forense, con objeto de poder identificar estos compuestos en los cadáveres y poder así poner al descubierto casos de envenenamientos que intentaban ser ocultados con causas de muertes referidas a supuestas enfermedades. De esta manera se fueron desarrollando nuevas técnicas de aislamiento, determinación y también síntesis de sustancias que luego dieron origen a otra rama de la toxicología llamada toxicología analítica. [2]

Por otro lado, se puso de manifiesto los riesgos que tenían los trabajadores de ciertas profesiones al estar en contacto con productos tóxicos, surgiendo así por ejemplo la toxicología ocupacional y luego con los avances industriales y todo lo que ello provoca hizo que fueran surgiendo ramas como la toxicología ambiental o ecotoxicología, la toxicología reguladora, bromatológica, farmacéutica, clínica, etc. [2]

## **1.2. ECOTOXICOLOGIA**

### **1.2.1. DEFINICION Y OBJETIVOS**

Es una rama de la toxicología que se dedica al estudio de procesos, el destino y los efectos tóxicos originados por contaminantes químicos, naturales o sintéticos sobre los ecosistemas. [4-5]

Los componentes de los ecosistemas son afectados por los distintos tipos de contaminantes que llegan a ellos; muchas veces estos efectos se observan a corto plazo, pero en otras ocasiones es necesario que pase mucho tiempo, a veces hasta varios años, para que puedan observarse los efectos. Cuando esto sucede, hasta que no se observan los efectos, no se tiene conciencia del daño ocasionado.

Las acción tóxica sobre los ecosistemas puede clasificarse en aguda, crónica o subcrónica, luego de transcurrido su correspondiente tiempo de latencia. En el caso de que se determine un efecto agudo generalmente se hace uso del concepto de dosis letal media (DL50). [4]

La ecotoxicología observa el comportamiento de determinados organismos a distintos niveles tróficos, con la base de que tanto los contaminantes que llegan directamente a ellos, como los contaminantes ambientales, finalmente terminan afectando el normal desarrollo de estos organismos. Los contaminantes ambientales, de acuerdo a las características propias de cada uno, terminan depositándose en los cursos de agua, tierra, superficies, etc., permitiendo que luego estos sean absorbidos por distintos tipos de organismos por diferentes medios. Su interés se centra en curvas dosis-respuesta, utilizando generalmente unidades probits, que son significativas del efecto sobre las poblaciones y no sobre individuos particulares. También se encarga de evaluar la toxicidad de las sustancias antes de su producción, empleo y disposición final, previniendo efectos adversos sobre los distintos componentes del ecosistema. [3-4-6]

El principal objetivo es predecir las alteraciones que se pueden producir en un ecosistema por agentes físicos o químicos. Esto lo pueden realizar por medio de dos procedimientos:

- Recopilación e interpretación, desde la óptica ecotoxicológica, de los conocimientos sobre las propiedades físicas, químicas, y toxicológicas de los contaminantes, teniendo en cuenta además reacciones de biotransformación, etc.
- Experimentación con modelos que pueden ser matemáticos, compartimentales o experimentales de laboratorio. [3]

Los biomarcadores representan una medida de la respuesta biológica que experimenta un organismo a nivel sub-individual frente a la presencia de una sustancia tóxica, y se cuantifican mediante cambios que se producen dentro del organismo o en alguno de sus productos, por ejemplo, modificaciones en actividad enzimática, orina, sangre, etc. [5]

Los bioindicadores son organismos que se utilizan para evidenciar las condiciones del hábitat en el que se encuentran, debido a que cuando se producen cambios en estas condiciones manifiestan comportamientos o cambios que pueden relacionarse con las condiciones externas. Se pueden utilizar para determinar: la calidad del hábitat, para detectar presencia o efecto de contaminación o para detectar cambios o alteraciones en el medio. Se utilizan como indicadores de exposición a sustancias tóxicas, manifestando cambios de comportamiento, presencia, ausencia, etc. Es importante que se realicen en condiciones previamente establecidas y controladas, de modo que las condiciones se mantengan constantes durante el periodo que dura el bioensayo, para evitar modificaciones en algunos factores relacionados, por ejemplo con las condiciones de operación, temperatura, etc., que influyan en los resultados obtenidos, y de este modo se permita una comparación entre diferentes resultados. [8- 9-12]

Las condiciones que debe cumplir un organismo para poder ser utilizado como bioindicador son las siguientes:

- Es necesario conocer el ciclo de vida del organismo, sus variaciones estacionales, características fisiológicas y anatómicas, tolerancia ecológica, requerimientos de la especie, adaptaciones a contaminantes agudos y crónicos, etc.
- El organismo debe encontrarse ampliamente distribuido en la naturaleza, para que sea de fácil adquisición o se lo pueda producir sin demasiados inconvenientes.
- Deben ser sensibles a la sustancia que se desea analizar, respuesta relevante.
- Sensibilidad a una amplia variedad de compuestos



- Es necesario que presente un comportamiento uniforme, de modo que los cambios que se observen puedan relacionarse con el efecto causado por el tóxico de análisis.
- De bajo costo, motivo por el cual se los puede utilizar para monitoreo, evitando gastos elevados como los que requieren los análisis fisicoquímicos instrumentales.
- Procedimiento de prueba simple
- Fácil mantenimiento del organismo
- Representatividad ecológica [8]

Los ensayos generalmente son simples y es importante que se mantengan las condiciones necesarias para cada uno. Es una buena medida acompañar este tipo de ensayos con análisis fisicoquímicos debido a que permite tener una mirada mas completa de los distintos efectos que se producen sobre los componentes del ecosistema, proporcionando medidas integrales más adecuadas para su protección. [7-8]

Hay organismos que son más sensibles a determinadas sustancias o a determinados medios por lo cual, se puede clasificar a los bioindicadores de acuerdo al medio en el cual van a utilizarse, habiendo indicadores que responden mejor para el análisis de aguas, suelos, aire, etc., dependiendo obviamente de las características del organismo, su hábitat natural y de las características de la sustancia de análisis. [9]

Bioindicadores de agua:

- Bacterias
- Fitoplancton
- Microinvertebrados bentónicos
- Peces
- Protozoos
- Macrófitas

Bioindicadores de suelos:

- Aves
- Plantas
- Lombrices
- Nemátodos
- Termitas
- Artrópodos
- Microorganismos

Bioindicadores del aire:



- Tabaco Bel W3
- Tradescantia
- Ray Grass (*lolium multiflorum italicum*)
- Col rizada (*brassica oleracea*) [9-11]

### **1.2.2. HISTORIA Y DESARROLLO**

A partir de la revolución industrial, se produjeron en el mundo cambios importantes que llevaron a un aumento considerable en el nivel de contaminación, situación que luego se vio agravada por la llamada revolución química, quien propició la utilización de miles de productos químicos, exentos de estudios que pusieran de manifiesto el posible efecto que pudiera provocar su utilización.

Fue a partir de la década de los años 30 que se comenzó a realizar estudios que determinaran la relación causa-efecto entre los niveles de contaminación de las aguas y los efectos biológicos que se producían en los peces. Luego entre 1940-1960, debido a la gran utilización de fertilizantes, se fue dando mayor importancia a la toxicología ambiental, desarrollándose pruebas que median además de mortalidad otros parámetros que ponían de manifiesto efectos tóxicos sobre los organismos; reconociéndose que para este tipo de ensayos seria importante la participación de ecólogos, toxicólogos, biólogos, etc. empezando de este modo a surgir lo que hoy llamamos ecotoxicología. Este término fue establecido en 1968 por Thuhaut. [8]

A pesar de que esta rama de la toxicología surgió en los años 70, se encuentran referencias que ponen de manifiesto que el interés por la contaminación del ambiente estaba presente desde tiempos remotos. Por ejemplo, en las disposiciones promulgadas en Gran Bretaña por Eduardo I (1272-1307) se hablaba que el uso del carbón hacia pestilente el aire. También en 1961 uno de los fundadores de la Royal Society publicó un folleto que se refería a la inconveniencia del aire y del humo en Londres.

Otra muestra del interés por los efectos de los contaminantes sobre el medio ambiente se pone de manifiesto en la preocupación por la preservación de la pureza del agua, cuya legislación es anterior a la atmosférica.

Un hecho histórico fue en 1968 la Conferencia de Estocolmo, donde se redactaron recomendaciones a los gobiernos para apoyar programas de investigación. Luego en 1968 se constituyó el Comité Científico para Problemas Ambientales (SCOPE).



En 1972 se realizó en París el primer debate institucional sobre medio ambiente. Con el paso de los años, alrededor del mundo se han desarrollado ejercicios en búsqueda de estandarizar las pruebas de toxicidad y además seleccionar grupos de especies que integran lo que se llama baterías de pruebas. [8]

### **1.2.3. ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS**

#### **1.2.3.1. LACTUCA SATIVA**

Este es el nombre científico de la lechuga. Es una hortaliza hermafrodita, anual y autógena, pertenece a la familia Compositae. Las diferentes partes que componen la planta son:

- raíz: pivotante, con ramificaciones, no sobrepasa los 25 cm de profundidad
- hojas: colocadas en roseta, en algunos casos se acogollan a medida que maduran
- tallo: cilíndrico y ramificado
- inflorescencia: son los capítulos florales amarillos
- semillas: provistas de un vilano plumoso.

Existen diferentes variedades de lechuga. Es una hortaliza de climas templados, siendo su temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 18 °C. Favorece su crecimiento que haya una alternancia de temperaturas entre la noche y el día, prefiriéndose que las noches sean frescas. Las temperaturas elevadas tienden a favorecer la espigación de la planta y a inhibirse la germinación. Soporta temperaturas de hasta -6 °C aunque esto ocurre solamente en algunas variedades. Se deterioran rápidamente por las temperaturas elevadas y el exceso de lluvias. La humedad relativa ideal ronda entre el 60-80 %. De acuerdo a la época de siembra, existe una preferencia por determinados tipos de suelos, favoreciendo el cultivo de primavera los suelos arenosos que elevan su temperatura rápidamente, mientras que para cultivo en verano se prefieren suelos ricos en materia orgánica.

Los suelos para su cultivo deben ser fértiles y ricos en nitrógeno, con un pH ideal entre 6,5-7,5. Si bien es un cultivo que se daña fácilmente por el exceso de lluvias, también se ve afectado por la sequía, siendo importante controlar el grado de humedad del suelo para evitar el deterioro del vegetal. Previo al sembrado es importante realizar una buena preparación del terreno adicionando materia orgánica, estiércol, compost, etc.



Es un cultivo que exige aporte de potasio y magnesio, debiéndose tener en cuenta no exceder el abonado con productos nitrogenados para evitar fitotoxicidad por exceso de sales. En las primeras fases de desarrollo requiere también aporte de molibdeno. Es una hortaliza pobre en calorías pero que aporta vitamina C, fósforo, carbohidratos, hierro, vitamina A, etc. Con las semillas de esta hortaliza se efectúan ensayos de toxicidad aguda, que permiten determinar efectos fitotóxicos de un compuesto o de una mezcla a partir de las variaciones en el proceso de germinación y desarrollo del crecimiento. Se evalúa como punto final de este bioensayo, la inhibición en la germinación y en la prolongación de la radícula e hipocótilo. Es un ensayo muy sensible debido a que permite determinar la toxicidad de aquellas sustancias que no son lo suficientemente tóxicas como para inhibir la germinación pero si como para modificar el crecimiento del hipocótilo y/o radícula, dependiendo además de la concentración de la sustancia, del modo y sitio de acción del contaminante. [7-8-13-14]

#### 1.2.3.2. EISENIA FOETIDA

También llamada comúnmente lombriz roja californiana. Es un organismo hermafrodita incompleto, tienen ambos sexos completos y pueden reproducirse a partir de los 3 meses de vida, siendo la fertilización recíproca y cruzada. Los huevos son depositados en cocones. La formación del cocón ocurre luego de 4 días del acoplamiento, desarrollándose un cocón y rara vez dos. Cada cocón contiene entre 3 y 20 lombrices, de las cuales sobreviven alrededor de 5 ó 6. [15]

Viven alrededor de 16 años, en un ambiente generalmente de no más de 30 cm de sustrato, no cava galerías verticales sino circulares, tiene buena velocidad reproductiva y sus deyecciones son un excelente abono orgánico. No presentan estadios larvales. Son organismos saprófagos y micrófagos. Comen diariamente su peso en alimento. Su cuerpo es cilíndrico y alargado dividido en pequeños segmentos a su vez se subdividen en pequeños anillos. Su cuerpo está cubierto de una cutícula segregada por la epidermis que contiene glándulas secretoras de mucus, que utiliza para su protección. Tienen setas que favorecen su locomoción. La parte interna de su cuerpo esta tapizada por un peritoneo, no tienen esqueleto. Entre la pared del cuerpo y el aparato digestivo hay un espacio denominado celoma. Este líquido celómico es el que mantiene la humedad de la lombriz. Se alimentan de restos orgánicos que humedecen con secreciones de saliva y que luego son introducidos en la faringe donde las fibras musculares desplazan el bolo alimenticio hacia



un estrecho esófago. En el tracto digestivo se segregan enzimas que degradan tripsina, grasa, celulosa, etc. Su sistema circulatorio está formado por un sistema vascular unido al intestino. Posee 5 pares de corazones y 5 grandes vasos sanguíneos. Su sangre contiene el pigmento rojo hemoglobina y transporta corpúsculos incoloros o amebocitos. No tienen un aparato respiratorio organizado, el intercambio de gases se realiza en los capilares próximos a la cutícula del cuerpo. Es un organismo que puede vivir varias horas en ausencia de oxígeno. Su sistema nervioso está integrado por ganglios cerebrales, nervios y fibras que transmiten impulsos sensoriales y motores. Contiene además células fotorreceptoras que se encuentran en la epidermis. [16-17]

Con estos organismos se han diseñado ensayos de toxicidad donde pueden utilizarse distintos puntos finales para la valoración del efecto tóxico, siendo la determinación más comúnmente calculada la dosis letal media (DL50). [8]

#### 1.2.3.3. *ALLIUM CEPA L.*

Nombre científico de las cebollas. La planta de cebolla esta formada por un bulbo formado por capas gruesas y carnosas al interior y recubierto por unas membranas secas y delgadas por el exterior. El aspecto del bulbo puede variar de tamaño, forma y de color pasando desde el blanco al rojizo.

Las distintas capas de la cebolla actúan como órganos de reserva para las hojas que son quienes realizan la fotosíntesis y permiten que la planta crezca. Es una hortaliza que proporciona potasio, fósforo, vitamina C, hidratos de carbono, etc., siendo la mayor parte de su constitución agua. Es una planta que se puede cultivar en días templados, creciendo óptimamente entre 15 y 23 °C y en suelos sueltos, no calcáreos, profundos, ricos en materia orgánica y con pH ligeramente ácido.

En suelos poco fértiles pueden obtenerse cebollas de menor desarrollo pero de mejor conservación. Pueden reproducirse por semillas, o en el caso de algunas variedades, se generan pequeños bulbos junto al bulbo principal que luego se utilizan para otras plantaciones. De acuerdo a la variedad es la época de siembra donde se obtienen mejores productos.

Es una planta sensible a la humedad, pudiendo ocasionar la falta de agua el agrietamiento de los bulbos. A su vez la falta de agua en la última etapa de desarrollo puede provocar cebollas que se conservan mejor pero con un sabor acre.

Para favorecer el crecimiento se puede adicionar al suelo abono nitrogenado mineral, teniendo en cuenta que un exceso del mismo puede dar lugar a bulbos oscuros y de mala conservación. Otro elemento necesario para el crecimiento es el potasio y en menor medida el fósforo. [18-21]

Esta hortaliza se utiliza para la realización de bioensayos de toxicidad aguda, semiestáticos. Permite la cuantificación de un efecto fitotóxico a partir de la valoración de la inhibición en la prolongación de las raíces. [8]

### **1.3. CONTAMINACION**

#### **1.3.1. DEFINICION**

Se entiende por contaminación, a la introducción de una sustancia o forma de energía en un medio en el cual provoca un desequilibrio; es un tema de mucha importancia en estos tiempos debido a que a pesar de que es de constante preocupación, los niveles continúan aumentando. Se puede hablar de distintos tipos de contaminación de acuerdo al recurso que afecten: agua, aire, suelo, etc., siendo en cada caso diferentes las causas que la provocan y las medidas a aplicar para evitar que avance. [3]

#### **1.3.2. TIPOS DE CONTAMINACION**

##### **1.3.2.1. CONTAMINACION DEL AGUA**

El agua es un recurso natural que se encuentra en constante uso para la mayoría de las actividades que realiza el hombre, es un recurso en peligro debido a que si bien las cantidades de agua que hay el mundo son elevadas, solo una pequeña parte esta disponible para su uso (aguas dulces continentales) mientras que el resto del agua total no se encuentra disponible o tiene características que la hacen inaceptable para el uso que se pretende.

Como recurso natural que es, el agua se va renovando mediante ciclos que permiten que el nivel de esta se mantenga prácticamente constante en el mundo, aunque se vaya modificando su distribución y su capacidad de utilización. [22]

El agua puede ser contaminada por elementos tóxicos que se encuentran naturalmente en la tierra y que luego pasan al agua como ciertos metales tóxicos, o puede



ser contaminada por diferentes fuentes antropogénicas como la actividad industrial, los vertidos urbanos, la actividad agrícola-ganadera, etc.

Particularmente en Argentina, el mayor causante de contaminación del agua son los desechos domésticos e industriales que generalmente se vierten a los cursos de agua sin tratamiento previo alguno. La distribución de los agentes causantes varía de acuerdo a la región donde nos encontramos, debido a que por ejemplo en La Pampa, el problema de la contaminación del agua por arsénico se debe a fenómenos naturales, en cambio en la zona de Gran Buenos Aires las causas más importantes son la debida a los vertidos domésticos e industriales.

Son muchos los factores que influyen en la disponibilidad de un determinado contaminante en el agua, debido a que hay que tener en cuenta cuales son las formas en que se puede encontrar a dicha sustancia, la toxicidad de las distintas formas, la presencia de otras sustancias que puedan afectar el estado del elemento, la presencia de materia orgánica, el nivel de oxígeno, la temperatura, etc.

Con el desarrollo y consiguiente aumento de la población en el mundo, se tiende a aumentar las fuentes antropogénicas de contaminación, y a su vez, se aumentan las necesidades de consumo diario, utilizándose en muchas situaciones en cantidades excesivas, sin tener en cuenta el peligro real que se tiene de agotar este importante recurso.

Como se expuso anteriormente, con el crecimiento demográfico que se ha producido en todo el mundo, se aumentan las necesidades de todas las ramas de las industrias, obteniéndose además de elevados niveles de desechos, mayor producción de elementos que originan contaminación como es el caso de automóviles, industrias, demandas de alimentos y bebidas, etc., lo que ocasiona mayores usos de fertilizantes, productos químicos, consumo de hidrocarburos, mayor producción de residuos, etc. Otro factor que influye en los niveles de contaminación es el asentamiento de la gente en lugares cercanos a cursos de agua donde no cuentan con servicios básicos de higiene y seguridad y donde la mayoría de las industrias ubicadas a los alrededores vuelcan sus desechos sin tratamiento previo alguno, favoreciendo una situación de peligro donde juegan factores ecológicos, sociales, económicos, etc., lo cual redundando en un aspecto de gran importancia debido al nivel de contaminación que ocasionan. La situación que se vive en Argentina es típica de un país subdesarrollado donde si bien se tiene cierta conciencia de la gravedad del vuelco de los efluentes a cursos de agua, debido a que el tratamiento requiere una inversión económica importante, es una etapa del proceso donde se minimizan las inversiones debido, entre otros factores, a la falta de control por parte de las

organismos que regulan este tema, lo que permite que las industrias se administren arbitrariamente, de manera incorrecta y realizando descargas con productos altamente tóxicos sin tratamiento previo alguno. [3-22-23]

### 1.3.2.2. CONTAMINACION DEL AIRE

El aire es una mezcla equilibrada de gases que, cuando se modifica por introducción en el medio de agentes contaminantes, ocasiona efectos a corto y largo plazo sobre el medio ambiente y los seres vivos, incluido el hombre, donde pueden observarse problemas de salud generalmente asociados al sistema pulmonar y cardiovascular.

Las causas de la contaminación son variadas e incluyen desde la utilización de combustibles fósiles y de productos químicos, la deforestación, la quema de residuos y las emisiones gaseosas generadas por distintos tipos de industrias.

De acuerdo al tamaño de las partículas y a las características se pueden clasificar en polvos, vapores, nieblas, humos, etc. [24]

Con respecto a las industrias, la descarga de gases es una de las fuentes de contaminación más importantes, que muchas veces se realizan sin tratamiento alguno, y sumado a esto el crecimiento demográfico que ocasiona aumento de consumo de muchos productos que a la larga terminan siendo fuente de contaminación. Las consecuencias más graves, además de los problemas de salud que se ocasionan las emisiones de gases, son la lluvia ácida, el efecto invernadero y las severas consecuencias que abarcan a todo el planeta.

Con respecto al camino que sigue un determinado contaminante en la atmósfera, va a depender de las características físico-químicas de la sustancia, de los vientos, lluvias, temperatura, otras partículas en suspensión, reacciones químicas espontáneas, etc.

Si bien se tiene cierta conciencia de los daños que se pueden producir si seguimos contaminando el aire, ésta no es total debido a que se lo considera un recurso aislado cuando en realidad, si pensamos integradamente, podremos deducir que si el aire está contaminado, esas partículas pueden depositarse sobre superficies, aguas, etc., contaminando también otros recursos importantes. [3-23-25]



### 1.3.2.3. CONTAMINACION DEL SUELO

El suelo es uno de los recursos que se encuentran más contaminados en el mundo, debido a que las consecuencias de la contaminación tardan mucho tiempo en observarse, es un tema que siempre se encuentra presente pero que no se le da la importancia adecuada, debido a que hasta que no se observan los efectos de la contaminación, no se tiene realmente conciencia de la problemática.

El suelo como tal, tiene una capacidad de renovación y degradación que le permite, siempre que no se sobrepasen ciertos límites, mantener un equilibrio de modo de que no se afecten sus características y con esto el desarrollo normal de los seres vivos y el medio ambiente. [22]

Las sustancias que pueden contaminar los suelos son muy variadas, pudiendo incluirse desde sustancias naturales hasta productos exógenos. La mayor cantidad de la contaminación se produce por fuentes antropogénicas, estando la actividad humana relacionada estrechamente con este desequilibrio.

Ejemplos de actividades que llevan a la contaminación cuando no se realizan correctamente son: el uso de productos químicos, detergentes, el vertido de residuos domiciliarios en lugares no preparados para el tratamiento de los mismos, los accidentes que provocan derrames de productos químicos, el riego con agua contaminada, etc.

En el caso de los metales pesados son muchos los factores que influyen en la disponibilidad en el suelo, como el pH, la mineralogía de las arcillas, el contenido en materia orgánica, potencial redox, etc. [26]

Cuando una sustancia llega al suelo en cantidades superiores a las que este puede transformar, la sustancia se transforma en un contaminante, ocasionando modificaciones tanto de la composición del suelo, como de las características del mismo, lo que a su vez ocasiona cambios en los organismos que viven en él, en la economía del lugar, en las aguas, etc. Son varias las rutas que puede tomar una sustancia una vez en el suelo, bien puede ser transformada fotoquímicamente, puede ser trasladada como sólido debido a la erosión o al agua y puede también solubilizarse y pasar a formar parte de las aguas subterráneas. Las características particulares de cada suelo influyen en la disponibilidad que tendremos de este contaminante, siendo necesario tener en cuenta factores como pH, solubilidad, estado de oxidación del elemento, formas químicas en las que existe ese elemento y toxicidad relativa de cada una de las formas, presencia de materia orgánica, estructura del suelo, etc.

El suelo, una vez contaminado, se puede remediar a partir de distintas medidas, que requieren una inversión económica de importancia, que en la mayoría de las situaciones no se está dispuesto a realizar, en parte debido a la falta de conciencia sobre las consecuencias del desequilibrio este recurso, ya que tardará muchos años en manifestar los verdaderos daños que se le han ocasionado y muchos mas requerirá para alcanzar su recuperación. [3-22-26-27]

## **1.4. EFLUENTES**

### **1.4.1. GENERALIDADES**

Son las descargas residuales derivadas de un proceso industrial, también los vertidos de aguas utilizadas en actividades relacionadas y las provenientes de residuos domiciliarios y cloacales. Generalmente presentan una composición que varía de acuerdo a la industria de la cual provengan y es muy importante que se realice un tratamiento de los mismos debido que, de este modo, se evita la contaminación del lugar donde se realiza la descarga. Estos tratamientos depuradores o descontaminantes requieren una inversión económica importante. Las principales fuentes productoras de efluentes son: los procesos de producción, servicios auxiliares, baños y áreas de servicio, etc. [28]

Se han establecido leyes y reglamentaciones cuyo fin es evitar la descarga de efluentes contaminantes a los cursos de agua, suelos, etc., mediante la determinación de límites que deben poseer los efluentes antes de ser vertidos, siendo necesario en el caso de que se superen éstos límites, la aplicación de tratamientos previos al vertido. [29]

En el caso de La Pampa las leyes que rigen la legislación ambiental se encuentran sancionadas según la ley 1508 desde el año 1993. [30]

Es importante cuando se intenta realizar la caracterización del nivel de contaminación que provoca un efluente, tener en cuenta no solamente las concentraciones de parámetros individuales, sino que debe realizarse el análisis de la potencialidad tóxica total del efluente a partir de ensayos o test de toxicidad, debido a que pueden ocurrir interacciones, sinergismo, antagonismo, etc.

Algunos de los parámetros mas frecuentes para determinar la calidad el efluente son:



- DBO: demanda biológica de oxígeno
- DQO: demanda química de oxígeno
- pH
- Residuos sólidos en suspensión
- etc. [29-31]

#### **1.4.2. TIPOS DE EFLUENTES**

Los efluentes se pueden clasificar de acuerdo al estado en sólidos, líquidos o gaseosos. De acuerdo a la proveniencia en industriales o domiciliarios y a su vez también se pueden dividir de acuerdo al tipo de industria de la cual provengan.

#### **1.4.3. IMPACTO AMBIENTAL**

La contaminación producida por los efluentes, ya sean industriales o domésticos, son la consecuencia del desarrollo industrial, económico y de las demandas de una civilización que cada vez pretende un estándar de vida más alto. [31]

A mediados de los años 70 se comenzó a evidenciar las consecuencias de los vertidos de los efluentes a los cursos de agua sin control alguno, originándose como consecuencia de esto la sanción de las primeras leyes que regulan estos temas. [32]

El problema que ocasionan los vertidos de efluentes a los cursos de aguas se debe principalmente a la presencia de sustancia de alta toxicidad, a consumidores de oxígeno que desequilibran el balance de oxígeno en el agua, nutrientes que provocan eutrofización de las aguas y sustancias que provocan olor, sabor o colores desagradables. Además con las nuevas tecnologías industriales se obtienen efluentes con niveles de toxicidad cada vez más elevados y que requieren tratamientos complejos de descontaminación.

Otro factor que favorece la contaminación de las aguas relacionadas con los efluentes, es la distribución de las industrias en parques industriales, lo que provoca vertidos en concentraciones elevadas y además se producen mezclas de diferentes efluentes que pueden provocar efectos perjudiciales mayores que los esperados a partir de la toxicidad individual de cada efluente.

Existen medidas a aplicar además del tratamiento de los efluentes cuyo fin es reducir el impacto ambiental como por ejemplo: modificación de operaciones y procesos

industriales de modo de minimizar el volumen de los efluentes o la concentración de los mismos, aprovechamiento total o parcial de los efluentes por otras industrias.[29-31]

#### 1.4.4. TRATAMIENTO DE EFLUENTES

Existen diferentes formas de clasificación de los tratamiento de efluentes, por ejemplo: según el grado de purificación, según la naturaleza del proceso o según se realicen en presencia o ausencia de oxígeno. [29]

Según el grado de purificación podemos clasificar los tratamientos de efluentes en:

- pretratamiento: elimina la fracción sólida de mayor tamaño de la corriente líquida
- tratamientos primarios: separación de las partículas en suspensión por medios físicos
- tratamientos secundarios: reducción del contenido en materia orgánica
- tratamiento terciario: reducción de nutrientes inorgánicos

Según la naturaleza del proceso podemos dividir los tratamientos en:

- químicos: floculación, coagulación, precipitación química, ósmosis inversa, intercambio iónico
- físicos: sedimentación, flotación, filtración, adsorción, extracción
- biológicos: fangos activados, filtro biológico, biodiscos, lagunaje, digestión anaeróbica

Según se realice en presencia o ausencia de oxígeno en:

- aeróbicos: barros activados, lagunas de aireación, filtros percoladores, discos rotatorios, o piletas de estabilización
- anaeróbicos: procesos de digestión. [29]

#### 1.4.5. LEGISLACION

En La Provincia de Buenos Aires desde 1958 rige la ley 5965 de efluentes donde se establece lo siguiente: *se prohíbe todo tipo de vuelco de efluentes a cursos de agua que*



*puedan afectar las características de los mismos y además establecen los requisitos a cumplir relacionados con la descarga de efluentes necesarias para otorgar la habilitación de nuevos establecimientos industriales.*[33]

En la provincia de La Pampa, la emisión o descarga de efluentes al ambiente rige por la ley 1508 donde se establece que: *como deben manejarse los efluentes producidos y cuales son las responsabilidades de la industria en cuanto a costear análisis, modificaciones estructurales para efluentes, plazos permitidos para modificaciones, etc.* [30]

## **1.5. METALES PESADOS**

### **1.5.1. GENERALIDADES**

Se denomina metales pesados a todos aquellos elementos químicos cuya densidad es mayor a 5gr/cm<sup>3</sup> en la forma elemental o su peso atómico superior a 23. También suelen incluirse dentro de este grupo otros elementos con orígenes y comportamientos semejantes como es el caso del Arsénico, Boro, Bario y Selenio.

Una característica muy importante de estos elementos es su incapacidad para degradarse química y biológicamente, lo que ocasiona una gran persistencia y en muchos casos una bioacumulación que potencia aun más su toxicidad. Estos elementos denominados metales pesados pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a la utilidad o función biológica que le dan los organismos, pudiendo dividirse en:

- oligoelementos: aquellos elementos requeridos por los organismos en pequeñas cantidades que permiten que se desarrollen sus funciones biológicas y sus ciclos de vida. Ejemplos: Níquel, Cobalto, Molibdeno, Manganeso, Cinc, Arsénico, Cromo, etc.
- metales pesados sin función biológica alguna: elementos cuya presencia en determinados seres vivos ocasionan disfunciones en su comportamiento, debido a su toxicidad y capacidad de bioacumulación. Ejemplos: Cadmio, Mercurio, Plomo, Bismuto, etc. [34]

Los metales pesados pueden llegar al suelo, al agua o al aire a partir de dos fuentes principales: una fuente natural como es el material original del suelo que al meteorizarse, hace que se liberen y aparezcan en el suelo componentes metálicos y una fuente antropogénica como es la derivada de la actividad del hombre, obviamente estando esta fuente de

contaminación directamente relacionada con la revolución industrial, química y el desarrollo la sociedad actual. [36]

Cuando la presencia de un metal no puede justificarse por un origen geoquímico, es necesario atribuir la contaminación a una fuente externa. Por ejemplo en el caso de las zonas rurales, cuando la presencia del metal no es natural de sus suelos, la fuente de contaminación generalmente proviene de la utilización de fertilizantes, agroquímicos, etc.

Dentro de las fuentes antropogénicas que mayor contribución realizan de estos elementos son:

- actividad minera
- agricultura intensiva: debido a utilización de fertilizantes y plaguicidas que contienen estos elementos
- residuos domésticos: alrededor del 10 % de la basura son metales y estos pueden ocasionar daño no solo al suelo (en el caso de que estos residuos sean enterrados) sino también a las aguas subterráneas y al aire en el caso de incineración.
- procesos industriales que utilizan estos elementos para la elaboración de sus productos: como en industrias químicas, peletéreas, fertilizantes, refinerías, etc. Esta es la fuente de mayor contaminación, siendo las fabricas de hierro, acero y baterías las mayores productoras de residuos con estos tipos de elementos.
- tráfico automotor: afectando en este caso no solamente al suelo sino también al aire debido a los elementos que se encuentran en las piezas de los vehículos, ruedas, y en los combustibles. [36]

Cada metal tiene usos principales:

- Arsénico: medicina, veterinaria, aleaciones, esmaltes, insecticidas, pinturas, electrónica, etc. [37]
- Cadmio: galvanización, baterías, pigmentos, fotografía, soldaduras, etc. [37-42]
- Níquel: metalurgia, baterías, galvanización, catálisis, etc. [37]

Cuando se desea realizar un análisis de metales pesados es importante tener en cuenta la especiación, debido a que una medida de la cantidad total presente, puede no ser una medida representativa de la toxicidad que ocasiona. De acuerdo a la forma química en la que se encuentre el elemento esto influirá en la disponibilidad y a su vez su toxicidad dependerá de la toxicidad intrínseca que presente el elemento en esa forma química.



La toxicidad de los metales pesados será función de su toxicidad intrínseca, de su carácter acumulativo (siendo superior en elementos que se bioacumulan) y su disponibilidad en el medio en el que se encuentre. [37]

Se describen a continuación las características de los metales con los cuales se realizaron los efluentes artificiales analizados en el presente trabajo.

Características específicas del Cadmio: metal dúctil, de color blanco, cuyo peso atómico es de 112,40 y su densidad de 8,65, es un metal divalente en todos sus compuestos estables y su ión es incoloro. No se encuentra en la naturaleza en forma libre y la greenockita es el único mineral que contiene cadmio. En el caso de los humanos cuando no se está expuesto a contaminación la mayor ingesta se realiza a través de los alimentos y del humo del tabaco. [38-41-43]

Características específicas del Níquel: metal blanco, plateado, dúctil, maleable, su número atómico es 28, se lo encuentra en la naturaleza formando parte de la corteza terrestre y rocas ígneas, siendo liberado con las emisiones volcánicas. También podemos encontrarlo presente en el agua de mar, en el petróleo, y en el carbón. Resiste la corrosión alcalina y en forma metálica es un poderoso agente reductor. La mayor parte de sus compuestos son de color verde o azulado. Al igual que el Cadmio puede ingerirse en pequeñas cantidades a través de los alimentos y del humo del tabaco. [40]

Características específicas del Arsénico: elemento que presenta características tanto propias de los metales como de los no-metales, es un material sólido de color gris acero, su densidad es de 5,72 y su número atómico de 33. En forma inorgánica podemos encontrarlo naturalmente en el suelo y en muchos tipos de rocas, donde se halla generalmente asociado a otros minerales como el cobre. Las erupciones volcánicas son fuente emisoras de Arsénico. El ingreso del Arsénico al organismo se puede producir a través de los alimentos, del agua o del aire. La mayor parte del Arsénico ingerido pasa rápidamente a la corriente sanguínea, dependiendo la cantidad que pasa de la cantidad ingerida y de la forma en la que se encuentra. [44-45]

### **1.5.2. DISTRIBUCION**

Los metales pesados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en forma natural a partir de la materia original del suelo, presentándose los mayores contenidos en las rocas ígneas ultra básicas como peridotitos, seguidos de las ígneas básicas (basaltos), encontrándose en concentraciones menores en las rocas ácidas y las sedimentarias como son las calizas y areniscas. En los suelos los metales que se encuentran en mayores cantidades son

Manganeso, Cromo, Níquel, Plomo y Cinc, siendo función sus concentraciones de la composición del material original y de los procesos edafogénicos que dieron lugar al suelo.

En el caso del suelo los metales pesados pueden seguir diferentes caminos que darán lugar a variaciones en su distribución:

- pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea en disolución o fijados por proceso de adsorción, complejación o precipitación
- pueden ser absorbidos por las plantas, incorporándose a las cadenas tróficas
- pueden pasar a la atmósfera por volatilización
- pueden movilizarse a las aguas subterráneas o superficiales. [37]

En los suelos, además, la distribución de los metales varía considerablemente con la profundidad debido a las variaciones en las características de las distintas capas que lo conforman.

También podemos encontrar estos elementos distribuidos en el agua, ya sea en la superficial, subterránea o de lluvia, siendo el origen fuentes naturales como las emisiones volcánicas, polvos derivados de suelos y rocas, como también de fuentes antropogénicas que pueden depositar directamente metales al agua o al aire. [34-37]

### **1.5.3. DISPONIBILIDAD**

La disponibilidad es un factor que influye en la toxicidad de los metales en determinado medio. En el caso del suelo, la toxicidad de los metales pesados está asociado a la concentración que se encuentra en las fases bioasimilables (en solución) y las que se encuentran retenidas en forma de quelatos.

Existe una relación entre la concentración en la fase bioasimilable y la toxicidad o peligrosidad real, a diferencia de lo que ocurre cuando se realiza una medida de la concentración total presente en un suelo, dándonos en este caso información válida para evaluar peligrosidad potencial y no representando una medida de la toxicidad actual del mismo.

Los factores que afectan la disponibilidad son:

- pH: los metales pesados tienden a estar más disponibles a pH ácidos, excepto algunos como Arsénico, Molibdeno, Selenio, etc. Es un factor que afecta la movilidad del catión, debido a que influye en que se produzca o no la precipitación del elemento a formas complejas, influyendo también en la absorción del elemento al suelo.



- Textura: los suelos arcillosos retienen los metales en sus posiciones de cambio, situación que no se da en los suelos arenosos que carecen de esta capacidad y permiten que los elementos fluyen al subsuelo y luego a las aguas subterráneas.
- Estructura del suelo: favorece la entrada y filtración de los metales
- Mineralogía de las arcillas: la superficie específica y la descompensación eléctrica son factores que influyen en el poder de adsorción de los minerales.
- Materia orgánica: forma complejos de cambio o quelatos con los metales, permitiéndoles migrar con mayor facilidad. A su vez pueden adsorber tan fuertemente al elemento que este quede en una posición no disponible para las plantas. La formación de complejos órgano metálicos facilita su solubilización, disponibilidad y dispersión, siendo a su vez complejos muy estables frente a la degradación lo que potencia su toxicidad debido a la persistencia de los mismos.
- Capacidad de intercambio: es función del contenido de arcilla y materia orgánica, determinando que cuanto mayor sea su capacidad de intercambio, mayor posibilidad de retención del metal. El poder de adsorción es función del radio iónico y estado de oxidación del elemento.
- Condiciones redox: determina que el elemento se encuentre en estado oxidado o reducido, afectando su estabilidad.
- Óxidos e hidróxidos de Hierro y Manganeso: tienen alta capacidad de retención de metales, fijándolos e inmovilizándolos.
- Carbonatos: su presencia determina valores de pH alto, favoreciendo la precipitación de algunos metales.
- Salinidad: el aumento de la misma puede aumentar la movilización debido a dos mecanismos: los cationes asociados a las sales pueden reemplazar a los metales en las posiciones de absorción y los aniones pueden formar complejos solubles con algunos metales pesados. [37]

De acuerdo a la forma en la que se encuentre retenido el metal en el suelo, determinará su disponibilidad real y por lo tanto su capacidad de ser utilizado por los organismos. Con el tiempo a pesar de que algunos elementos se bioacumulan, en el suelo su disponibilidad puede ir decreciendo debido a la fijación en posiciones de adsorción más fuertes y al endurecimiento de los geles. Generalmente los metales presentan poca movilidad quedando retenidos en las primeras capas del suelo, haciendo que el contenido de estos elementos varíe con la profundidad del mismo. [34-37]

#### **1.5.4. EFECTOS EN LA SALUD Y MEDIO AMBIENTE**

La presencia de concentraciones elevadas de los metales pesados ocasiona daños a distintos niveles de acuerdo a los organismos que estemos estudiando y de acuerdo al metal en particular del cual se trate. [41]

Algunas plantas pueden utilizar parte de estos elementos como micronutrientes favoreciendo el correcto desarrollo de sus funciones vitales pero cuando estas concentraciones se sobrepasan los efectos pueden ser opuestos produciendo alteraciones a nivel de inhibir crecimiento, reproducción, etc. [40]

En el caso de los seres humanos, estos elementos resultan altamente tóxicos produciendo alteraciones en distintos órganos y tejidos, afectando no solamente el correcto desenvolvimiento de los mismos sino también en algunos casos originando mutaciones, daños genéticos, cáncer y en casos extremos hasta la muerte. [37]

Se describirán a continuación los efectos en salud y medio ambiente provocados por los metales cuyo comportamiento tóxico se analiza en el presente trabajo.

Particularmente el Cadmio es tóxico para todas las formas de vida pudiendo provocar en el hombre daños a nivel digestivo, en los riñones, en los huesos y en el sistema respiratorio cuando la ingesta se produce por vía inhalatoria. También produce efectos en la presión arterial originando enfermedades cardíacas.

Cuando la ingesta de Cadmio es pequeña, la mayor parte del metal es retenido por la mucosa intestinal y eliminado con la descamación de la piel, pero cuando la dosis oral es elevada, el metal pasa a la corriente sanguínea, almacenándose en hígado y riñón. Afecta proteínas con grupos funcionales SH, por generación de radicales libres.

Los efectos causados por el Cadmio en animales y el hombre pueden ser variados incluyendo desde: irritación estomacal, vómitos, náuseas, diarrea, proteinuria, anemia, cálculos renales, osteoporosis, hipertensión, disminución de la fertilidad, enfisema, fibrosis, edema, desarrollo de cáncer, etc. En el caso de organismos acuáticos la sensibilidad al Cadmio varía ampliamente, siendo más resistentes al envenenamiento los organismos de agua salada. [39-40-42]

En el caso particular del Níquel, las plantas lo utilizan en bajas concentraciones como micronutrientes pero cuando las concentraciones superan estos límites provocan disminución de crecimiento, inhibición de la germinación, etc. A los animales al igual que al hombre, en elevadas, concentraciones provoca cáncer en diferentes órganos como pulmón, laringe, próstata, etc., ocasiona además mareos, náuseas, embolia de pulmón, asma, defectos en el nacimiento, fallos respiratorios, reacciones alérgicas, etc.



En el caso del Arsénico, las plantas pueden absorberlo rápidamente produciendo alteraciones en sus ciclos biológicos cuando se encuentran en concentraciones elevadas. En los animales tiene efectos tóxicos elevados produciendo distintas anomalías que pueden provocar finalmente la muerte del mismo. En los humanos los efectos son variados e importantes: en el caso de los niños puede provocar un retraso en el crecimiento y una disminución del coeficiente intelectual. En los adultos provoca en las intoxicaciones agudas desde gastroenteritis, vómitos, diarrea, etc. En intoxicaciones crónicas se produce inhibición del sistema inmune, aberraciones en linfocitos, leucomelanodermia, estrías, hiperqueratosis, espasmos, parálisis, cirrosis, puede afectar al riñón y promover cáncer pulmonar, pleural y renal. [44]

### **1.5.5. LEGISLACION**

Los metales pesados, al ser altamente tóxicos, deben ser obligatoriamente considerados al momento de fijar los límites de emisiones, debido a que producen alteraciones en los distintos niveles tróficos. Para determinar las concentraciones de estos elementos se pueden utilizar métodos instrumentales como espectroscopía de emisión y absorción atómica. [35]

En la provincia de Buenos Aires, Obras Sanitarias de la Nación establece los límites para vertidos de efluentes según el decreto 336/03, donde además se indican que rubros industriales no pueden realizar vuelcos de efluentes a pozos absorbentes. [46]

Los límites de los efluentes en la provincia de La Pampa se regulan mediante el decreto 2793/06, donde quedan establecidos los valores máximos permitidos. [47]

## **1.6. PILAS Y BATERIAS**

### **1.6.1. GENERALIDADES**

Se denomina FEM. o fuerza electromotriz a la causa de una separación de cargas de distinto signo entre los electrodos y por tanto, la causa de una diferencia de potencial constante entre los mismos. Es lo que produce la corriente eléctrica en una pila, se mide en voltios. [49]

Se denomina pila o celda galvánica a un sistema que transforma en su interior la energía proporcionada por una reacción química en energía eléctrica. Las reacciones involucradas son redox, produciéndose dos hemireacciones, una de oxidación y otra de

reducción, generadas por el transporte de electrones entre los elementos. Las hemirreacciones se producen en compartimientos separados denominados hemiceldas, siendo los electrodos el medio que posibilita el transporte electrónico a lo largo de un conductor. Cuanto mayor sea la tendencia a la cual ocurre la reacción en la pila, mayor será su FEM. La FEM de la pila a su vez depende además de las concentraciones de las sustancias utilizadas para la construcción de la misma. [49-55]

Cuando la concentración de los iones en cada hemipila es  $1 \text{ mol L}^{-1}$  y la temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  el voltaje que se obtiene se denomina potencial normal de la pila, cuyo parámetro de referencia es el potencial normal de hidrógeno cuyo valor, por convención, es cero. [55]

Las primeras relaciones entre la electricidad y los cambios químicos fueron establecidas por Michael Faraday. [53]

Existen diferentes tipos de pilas, de acuerdo a las características de las mismas y al material con el que son construidas. [48]

Según las características podemos clasificarlas en:

- pilas primarias
- pilas secundarias
- pilas de combustible
- pilas solares

Según la composición, las pilas se pueden clasificar en:

- zinc/carbono
- alcalinas
- mercurio
- níquel/cadmio
- litio
- cinc/aire
- níquel/hidruro metálico
- óxido de plata

El funcionamiento de la pila se basa en el traspaso de electrones entre las especies que se encuentran en las distintas hemiceldas, que están en contacto con una solución de electrolito. Si los potenciales redox son adecuados, al conectar los electrodos se produce el transporte de electrones, lo que origina la corriente eléctrica. [51]

### **1.6.2. HISTORIA Y DESARROLLO**

Los primeros avances sobre electricidad fueron obtenidos a partir de las investigaciones realizadas por Alessandro Volta a finales del siglo XVIII. Luego alrededor del año 1860 Gastón Planté presenta la primera batería de plomo-ácido formada por nueve celdas colocadas en paralelo que estaban formadas por hojas de plomo separadas por cintas de goma, que a su vez se encontraban sumergidas en una solución de ácido sulfúrico.

Tudor años después logra transformar lo que hasta ese momento era un producto de laboratorio en un producto industrial.

Con el paso de los años se fueron modificando los materiales de construcción de las pilas y baterías con el objeto de obtener mejores productos, de mayor durabilidad, bajo costo y en las últimas décadas a su vez teniendo en cuenta el impacto ambiental que se produce por la utilización y mal disposición final de las mismas.[52-53]

### **1.6.3. TRATAMIENTO DE EFLUENTES**

En la industria de la galvanoplastia, los efluentes presentan componentes altamente tóxicos que deben ser eliminados o reducidos hasta los límites permitidos por la legislación a través del tratamiento de los mismos. El tratamiento de los efluentes se puede realizar como una parte integrada del proceso de producción o como un proceso separado que se realiza separado al final de la producción.

El tratamiento que se les dará a las aguas residuales puede seleccionarse de acuerdo a la composición de las mismas, pudiendo ser: aguas alcalinas que contienen cianuros, ácidas que contienen cromo, alcalinas exentas de cianuro pero que contienen otros aniones, ácidas que no contienen cromo pero presentan otros metales. [56]

Algunas técnicas utilizadas para la detoxificación de estos efluentes son:

- utilización de resinas de intercambio iónico para remoción y recuperación de metales de aguas de lavado y a su vez para la recuperación y reciclado de aguas de procesos. Permiten a su vez realizar rejuvenecimientos a baños galvánicos
- neutralización: mediante el cambio del pH del efluente se pueden formar compuestos insolubles de los metales a separar de modo que estos pueden eliminarse luego como lodos semisólidos
- precipitación: mediante el agregado de reactivos químicos se favorece la producción de los hidróxidos de los metales a separar que podrán separarse luego debido a la formación de productos insolubles
- separación de sólidos



- electrolisis: permite la complejacion del cianuro mediante el agregado de agentes químicos

Para la eliminación particular de determinados productos químicos se pueden utilizar distintos métodos: por ejemplo:

- Cianuros: biodegradación, intercambio iónico, ozonación, clorinación alcalina, adsorción, descomposición electrolítica, etc.
- Arsénico: precipitación con reactivos químicos, intercambio iónico, ósmosis inversa, etc.
- Metales pesados: sedimentación, intercambio iónico, electrodiálisis, precipitación con reactivos químicos, filtración, ósmosis inversa, etc.
- Sólidos suspendidos: sedimentación, filtración, coagulación, etc.
- Sólidos disueltos: ósmosis inversa, electrodiálisis, intercambio iónico, precipitación química, destilación con membranas, etc.

#### **1.6.4. IMPACTO AMBIENTAL**

En Argentina no se conoce ningún estudio que evalúe el impacto ambiental ocasionado por la utilización y manejo de las pilas; sin embargo, se sabe que las mismas contienen elementos altamente tóxicos tanto para el medio ambiente como para los humanos. [51]

Las pilas generalmente son arrojadas con la basura domiciliaria, modificando drásticamente la composición de la misma, elevando enormemente los niveles de Mercurio, Cadmio, Cinc y Níquel contenidos en ella. Si bien las pilas están diseñadas con una envoltura externa o carcasa que evita el derrame del contenido interno de las mismas, con el tiempo, debido a los componentes internos, a los agentes climáticos, a la fermentación de la basura, especialmente de la materia orgánica, se producen ascensos de temperaturas que hacen que se produzca una especie de reactor químico que termina por deteriorar las carcasas haciendo que se vierta el contenido de las pilas y de esta manera los metales se liberan y puede contaminar el suelo, aguas, etc. Una vez en el suelo, los metales pueden migrar rápidamente debido a que se encuentran generalmente en forma oxidada y a las características del suelo que favorecen la movilidad de los mismos. [50-51]

Respecto al impacto ambiental que ocasionan las pilas, podemos citar por ejemplo los efectos que se producen en la salud como consecuencia de la exposición a mercurio:

- exposición aguda: dermatitis, ceguera, disfunciones del aparato digestivo, insuficiencia renal, etc.
- exposición subaguda: diarreas, hemorragias, trastornos mentales, acrodia infantil, etc.

- exposición crónica: delirio y psicosis maníaco depresiva, debilidad, anorexia, insomnio, pérdida de los dientes, gingivitis, irritabilidad, temblores, problemas cerebrales y en sistema nervioso central, etc. [51]

Actualmente la gestión medioambiental que se realiza para evitar la contaminación con las pilas, se basa en el manejo y disposición adecuada por parte de los consumidores y el tratamiento y disposición de los efluentes de las industrias productoras.

El destino final más utilizado de las pilas, es el almacenamiento en condiciones controladas, debido a la ausencia de tecnologías de reciclado de las mismas. Se aplican tecnologías denominadas de estabilización que consisten en la colocación de las pilas en bolsas plásticas y agregado posterior de un reactivo químico estabilizador que eliminará o disminuirá las características tóxicas de las mismas. Luego las bolsas termoselladas son colocadas en un repositorio que limita la migración de los contaminantes evitando la lixiviación. Otras opciones son la exportación a países que realicen reciclado de las mismas, la disposición final en relleno de seguridad sin realizarse modificación o la utilización de técnicas de reciclado de componentes.[48-49]

En Argentina se utiliza el relleno de seguridad y el reciclado de algunos de los componentes como Cadmio. Para los rellenos de seguridad es necesaria una habilitación que debe renovarse anualmente. [49]

#### **1.6.5. LEGISLACION**

La ley de energía eléctrica portátil: Ley 26.184 establece requisitos para fabricación, rotulación, y emisión de certificados de pilas y baterías, adjuntando además el procedimiento de certificación. [54]

### **1.7. EL AGUA EN LA PAMPA**

#### **1.7.1. CARACTERISTICAS**

En la provincia de La Pampa, las características del agua son variadas en distintas zonas, en general la calidad del agua subterránea no es muy buena debido los altos contenidos de Fluor, Arsénico y oligoelementos. Otra característica particular de las aguas de la provincia es que tienen un contenido elevado de calcio y magnesio, ejerciendo una inhibición de la absorción del Flúor, lo que disminuye sus efectos negativos. [58]

Las variaciones en la calidad de las aguas se producen tanto a nivel horizontal como vertical, observándose cambios tanto en las diferentes capas que conforman el suelo como en las distintas zonas que componen la provincia.

En el zona centro-este de la provincia se registran elevados niveles de arsénico, lo cual esta relacionado directamente con la composición geomorfológica. A medida que aumentamos la profundidad, el contenido de Flúor y Arsénico disminuye, pero aumentan las concentraciones de sulfatos y la dureza. Este comportamiento de cambio de distribución de los elementos de acuerdo a la profundidad no es constante, debido a que en las distintas zonas pueden observarse diferencias. Por ejemplo: en la localidad de Anchorena se observa en los tres primeros niveles del suelo una estratificación hidroquímica normal, aumentando la salinidad en profundidad, acompañado por un ablandamiento del agua y un incremento del nivel de Arsénico. En cambio en la zona de Anguil se observa una disminución de los contenidos de Arsénico hasta los 55 metros, luego de lo cual se observa una concentración homogénea. En cuanto al Calcio y Magnesio se observa un incremento progresivo hasta los 55 metros, a partir de lo cual se manifiesta un elevado ascenso de su concentración.

Los factores que determinan la presencia del Arsénico y otros elementos tóxicos son: clima, características geológicas, geomorfológicas y el tiempo. A su vez los distintos factores que influyen en el grado de interacción del Arsénico con el medio sólido son: pH, solubilidad de minerales portadores de Arsénico y la composición de soluciones percolantes.

También las aguas subterráneas se ven contaminadas por el uso de fertilizantes, plaguicidas, etc. utilizados extensamente en la actividad agrícola ganadera que se desarrolla en forma intensiva en la región, produciendo elevados aumentos de las concentraciones de nitrato, provocando además que estos avancen desde los niveles freáticos hasta prácticamente la superficie.

En algunas zonas de la provincia esto constituye un problema a tener en cuenta debido a que muchas veces el agua subterránea es el único medio de regadío, lo que origina una recirculación de los productos que llegan al suelo. [58-60]

### **1.7.2. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN PARA AGUA DE CONSUMO EN LA PAMPA**



Según datos de Aguas del Colorado SAPEM (Sociedad Anónima con Participación Estatal Mayoritaria) los parámetros determinados son los mostrados en Tabla 1.

Tabla 1. Características físicas y químicas evaluadas en la provincia de La Pampa.

<b>Características Físicas</b>	<b>Turbiedad</b>
	pH
	Amonio
	Aluminio residual
	Cloruro
	Dureza total (calcio-magnesio)
Características Químicas	Hierro
	Manganeso
	Nitrato
	Nitrito
	Sólidos disueltos totales
	Sulfatos
	Cloro Activo residual
	Bacterias Coliformes
Características Microbiológicas	Bacterias Coliformes Fecales
	Pseudomonas Aeruginosa
	Bacterias mesófilas

#### 1.7.2.1. MUESTREO

De acuerdo al parámetro y a su importancia, la frecuencia de análisis de los mismos varía en forma diaria, semanal o quincenal. Dichos análisis son realizados en el laboratorio instalado en la planta potabilizadora donde se realizan controles de calidad desde la captación, tratamiento y poder de distribución. Aquellos controles que por razones de equipamiento y distancia no pueden ser realizados en planta son derivados a laboratorios externos. Semanalmente se envían cuatro muestras al laboratorio de APA (Administración Provincial del Agua) de los extremos del troncal secundario (localidades de Alpachiri y Jacinto Arauz) y de dos localidades seleccionadas al azar para verificar que la calidad de nuestro agua se mantenga a lo largo de toda la cañería.

Semestralmente se realiza un análisis de todos los parámetros que establece el Código Alimentario Argentino en el capítulo XII, Artículo 982 enviando muestras de agua de río, salida de planta y cisterna ubicada en la ciudad de Santa Rosa a un laboratorio externo que posee la certificación del Organismo Argentino de Acreditación. Para el corriente año se espera incrementar esta frecuencia a períodos trimestrales. [62]

#### 1.7.2.2. ARSÉNICO

La presencia de arsénico en las aguas subterráneas de varias localidades de nuestra Provincia ha sido siempre motivo de preocupación y estudio por parte de las autoridades y profesionales relacionados con el servicio de provisión de agua potable para consumo humano. El agua potabilizada que entrega Aguas del Colorado SAPEM tiene como característica especial el bajo contenido de Arsénico comparada con las aguas extraídas de napa freática. Análisis realizados en laboratorios externos certificados indican como resultado valores menores a 10 µg/L cumpliendo con el nuevo límite exigido por el Código Alimentario Argentino modificado en el año 2007 y alineándose a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. [62]

#### 1.7.3. IMPACTO EN SALUD Y MEDIO AMBIENTE

El elevado contenido de Arsénico y Flúor en las aguas de la provincia provoca efectos adversos relacionados directamente con la toxicidad de estos elementos, provocando que la región tenga una elevada tasa de mortalidad relacionada con tumores.

Particularmente, el Flúor en el agua de nuestra provincia se encuentran en un nivel 6 veces superior al límite fijado por la OMS según los datos presentados en el reclamo de una nueva ley de agua potable que adhiera al Código Alimentario Argentino. Este elemento, en dosis elevadas, provoca deterioro de la dentadura, osteoporosis, fluorosis, calcificación de ligamentos vertebrales, etc. [61]

En el caso del Arsénico se producen efectos adversos como: cáncer arsenical, HACRE (hidroarsenicismo crónico regional endémico), náuseas, vómitos, reducción de la producción de glóbulos rojos y blancos, ritmo cardíaco anormal, manchas en la piel y disminución del cociente intelectual, etc., encontrándose en el agua subterránea de la provincia, un nivel 18 veces superior al fijado por la OMS.

Debido a estos elevados niveles se proclama la sanción de una nueva ley de agua potable que se adhiriera mínimamente a los límites establecidos por el Código Alimentario Argentino. [60]

#### **1.7.4. TRATAMIENTO DE AGUA PARA CONSUMO**

Para el tratamiento de aguas con elevados niveles de arsénico y flúor se utiliza el método de coagulación-floculación con cloruro de poli aluminio. Mediante este método se forman hidróxidos sobre los que el  $\text{As}^{5+}$  se adsorbe y coprecipita con otros iones metálicos.

El aluminio que se incorpora al agua luego no se encuentra en concentraciones residuales elevadas por lo que no representa un peligro adicional por la aplicación del método, ya que este valor se encuentra muy por debajo del máximo permitido. El contenido de Aluminio necesario para el tratamiento del agua no es uniforme, dependiendo de la composición fisicoquímica del agua y fundamentalmente sujeto al valor de pH. Se pueden remover además otros elementos como Hierro, Manganeseo, Flúor, fosfatos, sólidos disueltos, etc. En el caso de que se intente remover  $\text{As}^{3+}$  es necesaria una preoxidación.

Otras alternativas para la remoción del Arsénico son: intercambio iónico, alumina activada, ósmosis inversa, nanofiltración y electrodiálisis inversa. Se están desarrollando actualmente técnicas de remoción biológica mediante la utilización de esporas para el filtrado del agua. [63]

- Intercambio iónico: remueven entre el 85 y 100 % de  $\text{As}^{+5}$ , además de otros elementos como cromatos, nitratos, nitritos, etc. Con este método no se remueve  $\text{As}^{+3}$ . Se puede provocar la obstrucción del lecho por la presencia de Hierro y Manganeseo. La remoción es independiente del pH y concentración del efluente. Las resinas pueden ser regeneradas con soluciones salinas concentradas de cloruro de sodio.
- Alúmina activada: se obtiene una remoción del nivel del 95 % aproximadamente, lo cual puede verse modificado por el elevado contenido de Selenio, Flúor, Cloro y sulfato que puede provocar una disminución del porcentaje de remoción. Únicamente remueve  $\text{As}^{5+}$ . En presencia de elevados niveles de Hierro y Manganeseo es necesario un pretratamiento que evite la obstrucción del medio.
- Hierro con filtración: mediante la adición de Hierro se produce la coagulación, luego de la cual se realiza una filtración (microfiltración) directa. Los factores a



tener en cuenta son: dosis de Hierro, potencia de mezclado, tiempo de retención y pH.

- Osmosis inversa: el límite de remoción es del 95 % aproximadamente, es independiente de la presencia de otros solutos y del pH, siendo importante que el agua a tratar no contenga materia orgánica ni materia coloidal
- Nanofiltración: se remueve el 90% del Arsénico, se opera a presiones elevadas, es un método costoso y se necesita que el agua a tratar no contenga sustancias corrosivas.
- Electrodialisis inversa: el porcentaje de remoción es del 80 %, permite una recuperación del 20 % del agua del efluente. [63]

## **CAPITULO 2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS**

Las metodologías de análisis de elementos químicos como los metales en aguas requieren la aplicación de análisis instrumental que resultan de un valor económico importante y a su vez consumen periodos de tiempo prolongados. Esta situación se ve complicada aun más en el caso de que las aguas a analizar provengan de un establecimiento industrial, donde se aumentan el número de compuestos químicos que pueden encontrarse en ella, se incrementa en algunos casos el nivel de materia orgánica, etc., situación que dificulta mucho más el análisis, debido a la necesidad en muchos casos de etapas de extracción, separación, purificación, digestión, etc. de acuerdo a las características particulares de la industria de la cual provengan.

Otro inconveniente que se puede encontrar al momento de realizar un análisis de aguas provenientes de algún establecimiento industrial, es que el elevado número de compuestos químicos encontrados pueden modificar su comportamiento en presencia de determinados elementos, modificando su capacidad de producir un efecto tóxico, o sea que mediante un análisis físico-químico podremos evaluar cual es la concentración de determinado elemento en el efluente pero al momento de predecir cual es el efecto que dicha concentración ocasiona sobre el medio ambiente, los resultados pueden ser no significativos de lo que sucede realmente.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos principales del presente trabajo son:

- Analizar el comportamiento de 3 indicadores biológicos de exposición frente a metales pesados, y determinar cual de ellos exhibe una respuesta constante que permita su utilización para caracterizar el nivel de contaminación de aguas provenientes de establecimientos industriales
- Determinar si existen fenómenos de sinergismo o antagonismo en el efecto toxico ocasionado por la presencia de dos metales en el medio en el que se desarrolla el indicador
- Determinar si es posible la utilización de indicadores biológicos de exposición que sustituyan los análisis físico-químicos para determinar el nivel de contaminación de aguas residuales

## CAPITULO 3- MATERIALES Y METODOS

### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1 REACTIVOS

- 3.1.1.1. Solución madre de Níquel de 80 ppm: se pesan 0,2106 g de sulfato de níquel y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.2. Soluciones diluidas de Níquel de distinta concentración: a partir de la solución madre se realizan las diluciones correspondientes para obtener distintas concentraciones de la solución de níquel. Se toma el volumen correspondiente de la solución madre y se lleva a volumen de 50 mL con agua destilada.  
Se toman 25 mL de la solución madre y se llevan a volumen de 50 mL para obtener una nueva solución con concentración de 40 ppm.  
Se realizaron soluciones de concentración: 40-20-11,6-10-9-5-1,5-0,02 ppm para ensayos de lechuga.
- 3.1.1.3. Solución madre de Cadmio de 90 ppm: se pesan 0,61609 g de sulfato de cadmio octahidratado y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.4. Soluciones diluidas de Cadmio de distinta concentración: a partir de la solución madre se realizan las correspondientes diluciones de modo de obtener distintas concentraciones de solución de níquel: Se realiza el calculo correspondiente al volumen necesario a tomar de la solución madre y se lleva a volumen de 50 mL con agua destilada. se realizan soluciones de concentración: 90-60-30-20-15-10-6-2-1-0,003 ppm para ensayos de lechuga
- 3.1.1.5. Solución madre de Arsénico de 50 ppm: se pesan 0,06602 g de trióxido de arsénico, se adiciona acido nítrico y se calienta para favorecer la disolución y luego se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.6. Soluciones diluidas de Arsénico: a partir de la solución madre se realizan soluciones diluidas de diferente concentración, realizando los cálculos correspondientes al volumen de solución que es necesario tomar para realizar cada una de las diluciones y se lleva luego a volumen de 50 mL con



- agua destilada. Se realizan diluciones para obtener soluciones de concentración: 5-0,5-0,05 ppm de arsénico.
- 3.1.1.7. Solución madre de mezcla de Cadmio y Níquel de 100 ppm: se pesan 0,3423 g de sulfato de cadmio octahidratado y 0,1317 g de sulfato de níquel y se lleva a volumen de 500 mL con agua destilada.
- 3.1.1.8. Soluciones diluidas de la mezcla Cadmio y Níquel: a partir de la solución madre mezcla de cadmio y níquel de 100 ppm se realizan las diluciones tomando el volumen correspondiente para cada dilución y se lleva a volumen de 50 mL con agua destilada. Se preparan soluciones de la mezcla de Cadmio y Níquel de concentración: 50-10-5-0,5 ppm para ensayos con lechugas.
- 3.1.1.9. Solución de Zinc de 100 ppm para control positivo de ensayos de lechuga: se pesan 0,4398 g de sulfato de Zinc heptahidratado y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.10. Solución madre de Cadmio de 1000 ppm: se pesan 6,84609 g de sulfato de cadmio octahidratado y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.11. Soluciones diluidas de Cadmio: a partir de la solución madre de Cadmio de 1000 ppm se realizan los cálculos correspondientes al volumen de solución madre necesario para preparar cada una de las diluciones correspondientes y se lleva a volumen de 100 mL. Se realizan soluciones de concentración: 100-10 ppm para ensayos de lombrices.
- 3.1.1.12. Solución madre de Níquel de 1000 ppm: se pesan 2,63302 g de sulfato de níquel y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.13. Soluciones diluidas de Níquel: a partir de la solución madre de níquel se preparan soluciones diluidas de distinta concentración, calculando el volumen de solución madre que es necesario tomar para cada concentración y se lleva a volumen de 100 mL con agua destilada. Se preparan soluciones de 100-10 ppm para ensayos con lombrices.
- 3.1.1.14. Solución madre de Arsénico de 1000 ppm: se pesan 1,3203 g de trióxido de arsénico, se agrega ácido nítrico y se calienta para favorecer la disolución de la sal y luego se lleva a volumen con agua destilada.
- 3.1.1.15. Soluciones diluidas de Arsénico: a partir de la solución madre de arsénico se preparan las soluciones diluidas, tomando un determinado volumen de solución madre, calculado para cada una de las diluciones que queremos

- obtener y luego llevando a volumen de 100 mL con agua destilada. Se preparan soluciones de arsénico de concentración 100-10-1-0,1 ppm para ensayos de lombrices.
- 3.1.1.16. Solución madre de una mezcla de Cadmio y Níquel de 200 ppm: se pesan 0,6846 g de sulfato de cadmio octahidratado y 0,2635 g de sulfato de níquel y se llevan a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.17. Soluciones diluidas de mezcla de Cadmio y Níquel: a partir de la solución madre de la mezcla cadmio y níquel se preparan las soluciones diluidas, tomando un determinado volumen de solución madre para cada dilución y llevando luego a volumen de 100 mL con agua destilada. Se preparan de este modo soluciones de mezcla de cadmio y níquel de concentración: 100-10-1-0,1 ppm para ensayos con lombrices
- 3.1.1.18. Solución madre de Cadmio de 25 ppm: se pesan 0,0784 g de sulfato de cadmio octahidratado y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.19. Soluciones diluidas de Cadmio: a partir de la solución madre de cadmio se preparan las soluciones diluidas, tomando un volumen determinado de solución madre para cada una de las diluciones que se quiere obtener y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada. Se realizan diluciones para obtener soluciones de concentración: 5-2,5-1-0,5-0,25-0,025-0,0025 ppm para ensayos con bulbos de cebollas.
- 3.1.1.20. Solución madre de Níquel de 20 ppm: se pesan 0,0895 g de sulfato de níquel hexahidratado y se llevan a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.21. Soluciones diluidas de Níquel: se toma determinado volumen de solución madre correspondiente a la dilución que quiero obtener y se lleva a volumen de 1000 mL. Se preparan soluciones diluidas de concentración: 2-0,2-0,1-0,05-0,02-0,002 ppm de níquel para ensayos con bulbos de cebollas.
- 3.1.1.22. Solución madre de Arsénico de 50 ppm: se pesan 0,066 g de trióxido de arsénico, se adiciona ácido nítrico y se calienta para favorecer la disolución de la sal y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.
- 3.1.1.23. Soluciones diluidas de arsénico: se toma determinado volumen de solución madre calculado para la concentración de solución diluida que quiero obtener y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada. Se realizan las soluciones de arsénico de concentración: 5-0,5-0,25-0,1-0,05-0,005 ppm para ensayos con bulbos de cebollas.

- 3.1.1.24. Solución madre de 50 ppm de una mezcla de cadmio y níquel: se pesan 0,1568 g de sulfato de cadmio octahidratado y 0,2237 g de sulfato de níquel hexahidratado y se llevan a volumen de 1000 mL.
- 3.1.1.25. Soluciones diluidas de la mezcla de cadmio y níquel: tomando determinado volumen de la solución madre de la mezcla cadmio y níquel y llevando a volumen de 1000 mL. Se realizan las diluciones para obtener soluciones de mezcla de cadmio y níquel de concentración: 5-0,75-0,5-0,1-0,05-0,005 ppm para ensayos con bulbos de cebollas.
- 3.1.1.26. Solución de Cobre de 50 ppm para control positivo para ensayo con bulbos de cebolla: se pesan 0,1964 g de sulfato de cobre pentahidratado y se lleva a volumen de 1000 mL con agua destilada.

### **3.1.2. INSTRUMENTAL DE LABORATORIO Y MATERIAL DE LABORATORIO**

- 3.2.2.1. Matraces de: 1000-500-250-100-50 mL
- 3.2.2.2. Pipetas 10, 5,1 mL
- 3.2.2.3. Vaso de precipitado de 200 mL
- 3.2.2.4. Cuchara de metal
- 3.2.2.5. Varilla de vidrio
- 3.2.2.6. Placas de Petri descartables
- 3.2.2.7. Recipientes de plástico para ensayos de lombrices
- 3.2.2.8. Tubos Nessler de fondo plano
- 3.2.2.9. Probetas de: 100-50-20 mL
- 3.2.2.10. Propipeta
- 3.2.2.11. Papel de filtro Whatman N° 3
- 3.2.2.12. Gradilla
- 3.2.2.13. Balanza analítica de precisión OHAUS
- 3.2.2.14. Balanza granataria KERN modelo emb- 220-1
- 3.2.2.15. Agitador-calentador: Velp
- 3.2.2.16. Estufa para DBO: SEMEDIC



## 3.2. MÉTODOS

### 3.2-BIOENSAYOS

#### 3.2.1.CONDICIONES DE OPERACIÓN DE BIOENSAYOS

##### 3.2.1.1. LECHUGA *Lactuca sativa*:

- duración del ensayo: 120 horas
- ausencia de luz
- Incubación a temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$

##### 3.2.1.2. LOMBRICES *Eisenia foétida*:

- Duración del ensayo: 14 días
- iluminación natural
- temperatura de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$

##### 3.2.1.3. BULBOS DE CEBOLLA *Allium cepa L.*:

- temperatura ambiente, alrededor de  $20^{\circ}\text{C}$
- iluminación indirecta
- Duración del ensayo: 72 horas
- Período de riego 2 veces al día

### 3.2.2. DESARROLLO DE METODO DE BIOENSAYOS

#### 3.2.2.1. MÉTODO PARA LECHUGA *Lactuca sativa*:

Colocar en las placas de Petri un disco de papel de filtro que cubra la base de la placa. Rotular indicando fecha y hora de inicio del bioensayos, concentración de la solución, etc. Saturar la placa con 4-5 mL de la solución evitando la formación de bolsas de aire. Luego con una pinza se colocan 20 semillas por placa de modo que quede una cierta distancia donde se permita que se elonguen las raíces. Las muestras se realizan por triplicado.

Una vez colocadas las semillas las placas deben guardarse en la oscuridad a una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 120 horas. Cumplido este tiempo se procede a medir las

semillas. En primer lugar se mide cual es el índice de germinación de las semillas: cuantas semillas germinaron, considerándose que han germinado cuando se puede observar el crecimiento de la radícula. Luego se procede a medir la longitud de la radícula e hipocótilo, siendo el hipocótilo desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones y la radícula desde el nudo hasta el ápice radicular. [64]

Una vez realizada las mediciones a las distintas concentraciones y los controles positivos y negativos se procede al análisis de los datos, calculándose el promedio y desviación estándar de las elongaciones de las radículas e hipocótilo de cada una de las muestras y el porcentaje de inhibición del crecimiento de radícula e hipocótilo a partir de la formula:

$$\% IC = \frac{(Prom. Control negativo - Prom. Crec. para cada conc) X 100}{Prom. Control negativo}$$

El porcentaje de inhibición en la germinación: se elabora a través de una curva dosis-respuesta, colocando en ordenadas el índice de germinación y en abscisas la concentración y luego mediante algún programa estadístico se calcula la CI50 o CE50. Es importante tener en cuenta que bajo ciertos resultados es necesario repetir los ensayos y esto se produce cuando:

- en el control negativo el porcentaje de germinación es inferior al 90% y cuando hay alta variabilidad en las elongaciones de las radículas
- en el control positivo el porcentaje de germinación es inferior al 90%

#### 3.2.2.2. MÉTODO PARA LOMBRIZ *Eisenia foétida*:

Retirar las lombrices de donde se encontraban, proceder a lavarlas con agua destilada y secarlas con papel de filtro suavemente. Luego colocar en un vaso de precipitado 300 g de suelo artificial y posteriormente agregar 100 mL de la solución a ensayar. En caso de que se utilicen mayor número de lombrices por muestra se coloca aproximadamente 50 g de suelo por lombriz.

Colocada las soluciones se homogeneiza la mezcla, se rotula cada uno de los recipientes con fecha, hora, dilución, etc. Las muestras se realizan por triplicado.

El control negativo se realiza utilizando agua destilada.

Una vez homogeneizada la mezcla se coloca en el recipiente donde se realizara el ensayo y se procede nuevamente a pesar, registrándose este valor para cada una de las diluciones. Luego se colocan 6 lombrices por recipiente, teniendo en cuenta que estas deben tener un peso entre 300 y 600 mg cada una. Registrar el peso de las lombrices. Una vez finalizado esto, se tapan los recipientes con tul para evitar la salida de las lombrices y se dejan durante 14 días en un ambiente con luz y una temperatura de  $20 \pm 3$  °C.

Cada dos días es necesario realizar el control de humedad de cada una de las muestras, tomando el peso que presentan cada uno de los recipientes y comparándolo con el peso inicial obtenido luego de pesar el suelo, la solución y las lombrices. Por diferencia de peso se puede obtener cual es la pérdida de humedad que se ha producido, adicionándose esa diferencia de peso en mL de agua destilada.

A los 7 días de comenzado el ensayo es necesario vaciar cada uno de los recipientes de modo de constatar cual es el estado de las lombrices, registrándose además el peso de cada una de ellas. Pasados los 14 días se da por terminado el ensayo, determinándose el estado de las lombrices y la evolución de su peso. Luego se realiza el análisis de los datos, graficándose el numero de lombrices muertas en función de la concentración, determinándose de esta forma CL50, utilizando programas estadísticos como Probit o Sperman & Karber. [65]

También puede realizarse un análisis de la evolución de los pesos de las lombrices para otro tipo de conclusiones.

Para preparación del suelo artificial se deberá colocar: 157,3 g de turba; 525 g de arena (entre 50 a 200 micrones); 150 g de caolinita y 3,5 g de carbonato de calcio

En el orden detallado anteriormente se colocan los materiales en una procesadora, se procesa y luego debe ser llevado a estufa a 90 °C durante toda la noche. Posteriormente pasar por tamiz de 1 mm.

### 3.2.2.3-MÉTODO PARA BULBOS DE CEBOLLA *Allium cepa* l.

Para el desarrollo de este ensayo se utilizan bulbos de cebolla *Allium* de tamaño uniforme, de alrededor de 2 cm de diámetro, estos deben ser pelados para quitar la epidermis seca y restos de tejido y raíces, evitando dañar el anillo radicular. Se lavan y secan para evitar la formación de hongos. Una vez seleccionados los bulbos se procede a rotular cada uno de los tubos con la fecha, hora y dilución correspondiente. Luego se

llenen cada uno de los tubos de modo que cuando se coloquen los bulbos estos queden en contacto en la zona del anillo radicular con la solución a ensayar.

Se utiliza un control positivo que se realiza con una solución de cobre y un control negativo con agua destilada. Para cada una de las muestras se utilizan 10 bulbos.

Luego de llenar los tubos se colocan los bulbos asegurando el contacto con la solución y se dejan a temperatura ambiente en un lugar donde reciban iluminación indirecta durante un periodo de 72 horas. [64]

Es importante que dos veces al día se realice el control del volumen de cada uno de los tubos debido a que al disminuir el volumen de solución por evaporación o absorción, dejan de estar en contacto los bulbos con la solución y se detiene el ensayo, por lo que es necesario volver al volumen inicial con la solución correspondiente a cada dilución.

Finalizado el tiempo de duración del ensayo se procede a medir la elongación de las raíces, tomándose el valor máximo y mínimo donde inciden la mayoría de las raíces y a partir de estos dos datos se obtiene el promedio de elongación. Se descartan los dos valores extremos de los promedios.

Una vez determinados los promedios de elongación para cada una de las muestras y los controles se calcula el porcentaje de inhibición de crecimiento mediante la siguiente expresión:

$$\% IC = \frac{(Longitud\ del\ control - longitud\ de\ la\ muestra) \times 100}{longitud\ del\ control}$$

Luego con estos datos se construye una grafica del porcentaje de inhibición en función de la concentración para obtener la CI50 o CE50, pudiéndose utilizar programas estadísticos como probit, Sperman& Karber, etc.

### **3.2.3. ESTUDIOS PREVIOS RELACIONADOS CON BIOENSAYOS**

En el INTA Castelar, el IMYZA (Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola) fue el lugar físico donde se realizó el presente trabajo se realizan bioensayos de lechuga y de cebolla, que permitieron saber con antelación, en que rangos de concentraciones se observan efectos. De este modo, conocidos estos rangos, se los tomó como referencia para el desarrollo del presente trabajo, ampliándolos a concentraciones superiores e inferiores a la aportada por el INTA de modo de evidenciar el comportamiento de estos indicadores biológicos frente a efluentes artificiales de cadmio, níquel y arsénico.

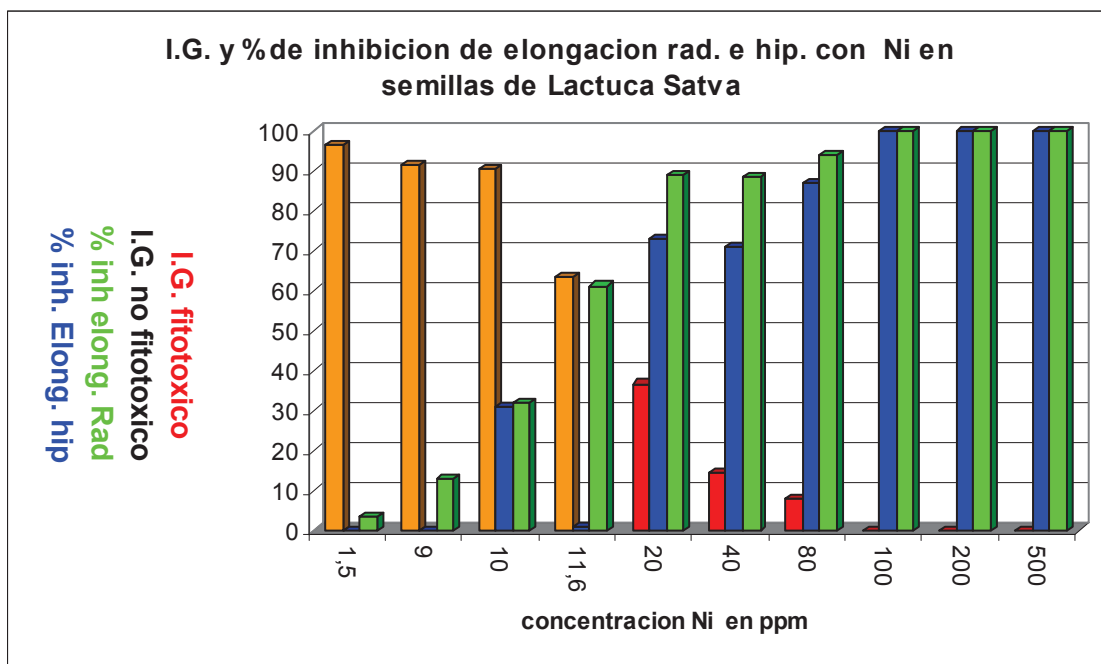


## CAPITULO 4-RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS

#### 4.1.1. ENSAYOS CON LECHUGA *Lactuca sativa*:

A partir de los bioensayos con *Lactuca Sativa* se puede observar como este indicador responde en diferente proporción de acuerdo al metal ensayado, observándose como a medida que aumentamos la concentración de metal-contaminante se incrementan los efectos inhibitorios en la elongación tanto de sus radículas como de sus hipocótilos. Como puede observarse en la figura 1 los efluentes artificiales de Níquel no provocan elevada toxicidad para el indicador *Lactuca* debido a que la presencia de fototoxicidad se observa a partir de las 20 ppm, produciéndose pequeñas inhibiciones a concentraciones bajas.



**Figura 1. Índice de germinación, % de inhibición de elongación de radícula e hipocótilo vs. Concentración de níquel en ppm de semillas de *Lactuca sativa***

En el caso de los efluentes artificiales correspondientes a Cadmio, figura 2, estos provocan efectos de toxicidad mayores a los provocados por el níquel debido a que la fitotoxicidad comienza a concentraciones muy bajas, donde también se pueden observar efectos inhibitorios de una magnitud considerable.

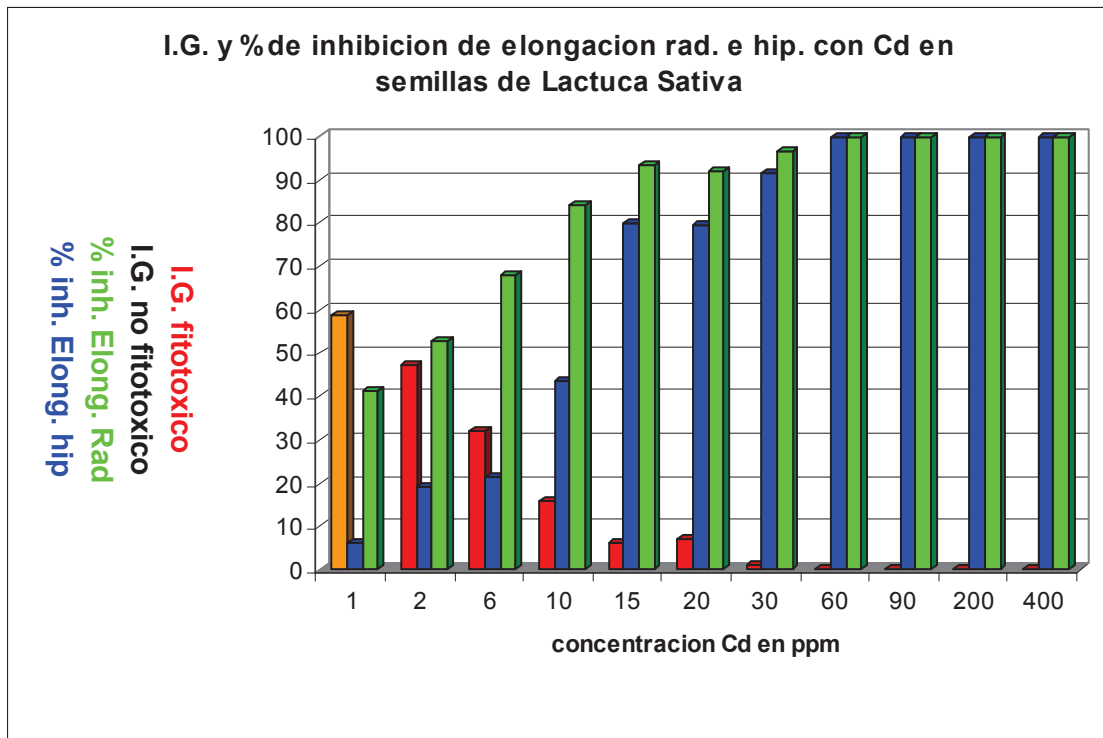


Figura 2. Índice de germinación, % de inhibición de elongación de radícula e hipocótilo vs. Concentración de cadmio en ppm de semillas de *Lactuca sativa*

En el caso particular del Arsénico, figura 3, podemos observar presencia de fototoxicidad a concentraciones muy bajas, indicando alto nivel de toxicidad de este elemento para este indicador en concreto. Los efectos inhibitorios de la radícula presentan una magnitud importante aun a muy bajas concentraciones de efluente.

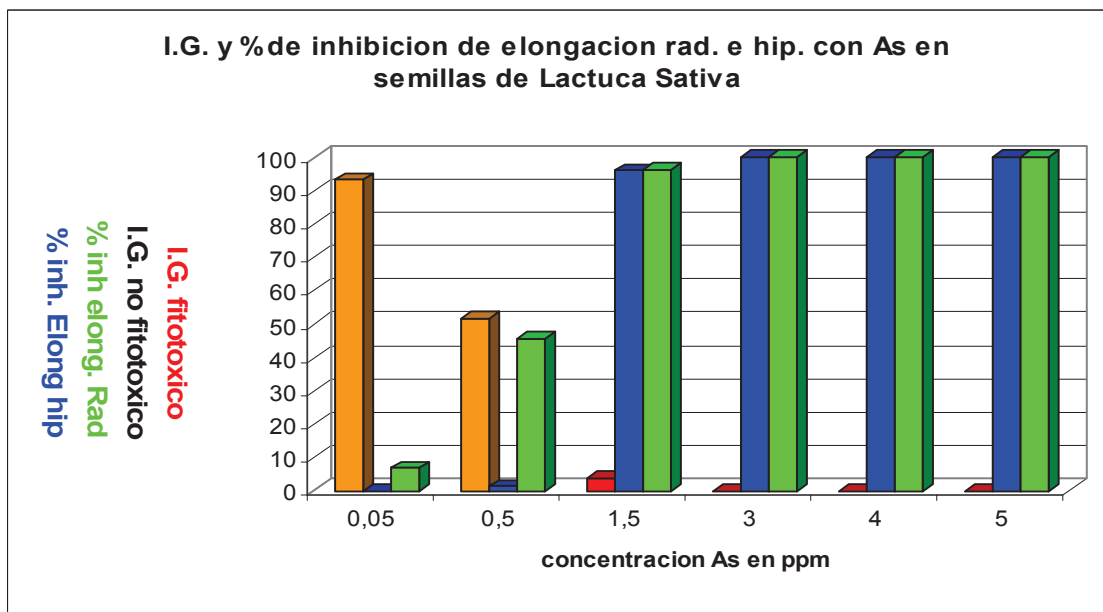
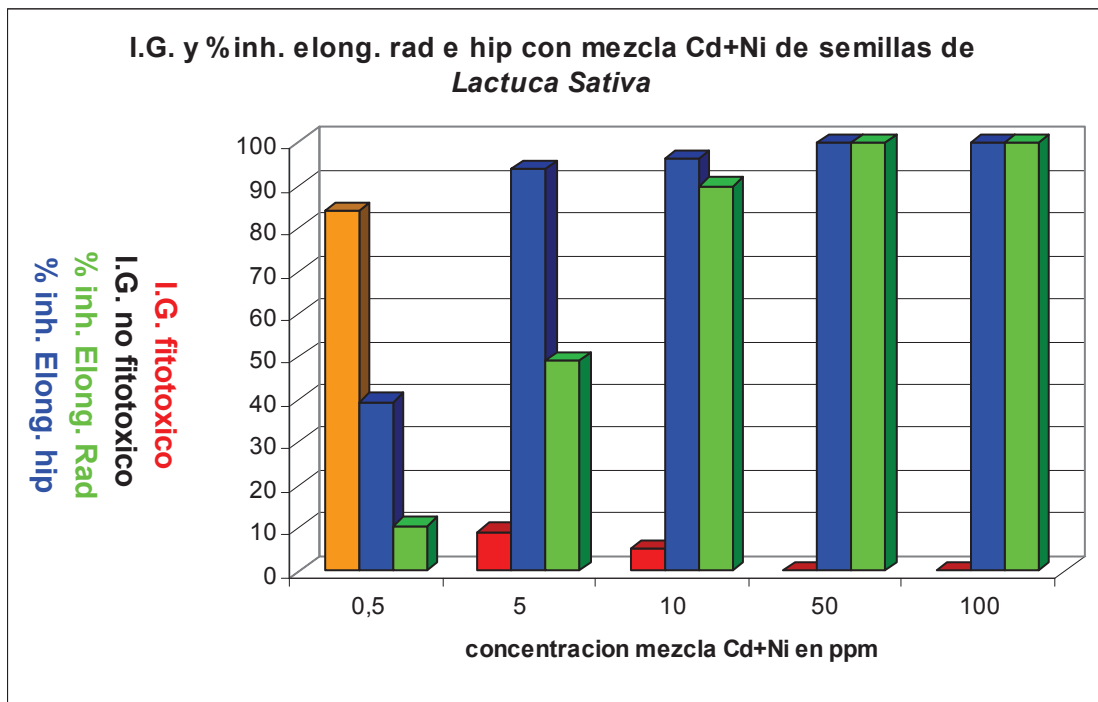


Figura 3. Índice de germinación, % de inhibición de elongación de radícula e hipocótilo vs. Concentración de arsénico en ppm de semillas de *Lactuca sativa*.

En la figura 4, podemos observar el comportamiento de una mezcla de Cadmio y Níquel, indicando altos niveles de toxicidad debido a la presencia de fitotoxicidad a bajas concentraciones de efluente, donde también se producen elevadas inhibiciones de la elongación correspondiente al hipocótilo.



**Figuro 4. Índice de germinación, % de inhibición de elongación de radícula e hipocótilo Vs. Concentración de mezcla de Cadmio + Níquel en ppm de semillas de *Lactuca sativa*.**

Para este indicador en particular donde pueden cuantificarse por separado la inhibición en la elongación de las radículas e hipocótilos, como se puede observar en las tablas 1-2 para los elementos analizados, las radículas se encuentran más notablemente afectadas siendo necesaria la aplicación de menores concentraciones efectivas para provocar la inhibición del 50 % de la elongación de las radículas respecto del hipocótilo, resultando los elementos más tóxicos para las semillas de lechuga los efluentes artificiales de arsénico y de la mezcla de Cadmio+Níquel (figura 6).

	RADICULA			
METAL	CE50 análisis regresión	CE50 Met. Probit *	limite inferior	limite superior
Cadmio II	0,741	1,812	0,911	2,839
Níquel II	12,48	12,475	9,588	15,657
Arsénico III	0,372	0,364	0,207	0,544
Cd+Ni	0,388	0,713	0,281	1,275

**Tabla 1. CE50 analizando inhibición de elongación de radícula de lechuga *Lactuca sativa* con distintos metales**

\*Valores calculados con el 95 % de confianza

	HIPOCOTILO			
METAL	CE50 análisis regresión	CE50 Met. Probit *	limite inferior	limite superior
Cadmio II	8,388	7,942	5,903	10,265
Níquel II	24	22,607	15,477	34,637
Arsénico III	0,612	0,929	0,68	1,17
Cd+Ni	3,434	3,162	1,782	4,952

**Tabla 2. CE50 analizando inhibición de elongación de hipocótilo de lechuga *Lactuca sativa* con distintos metales**

\*Valores calculados con el 95 % de confianza



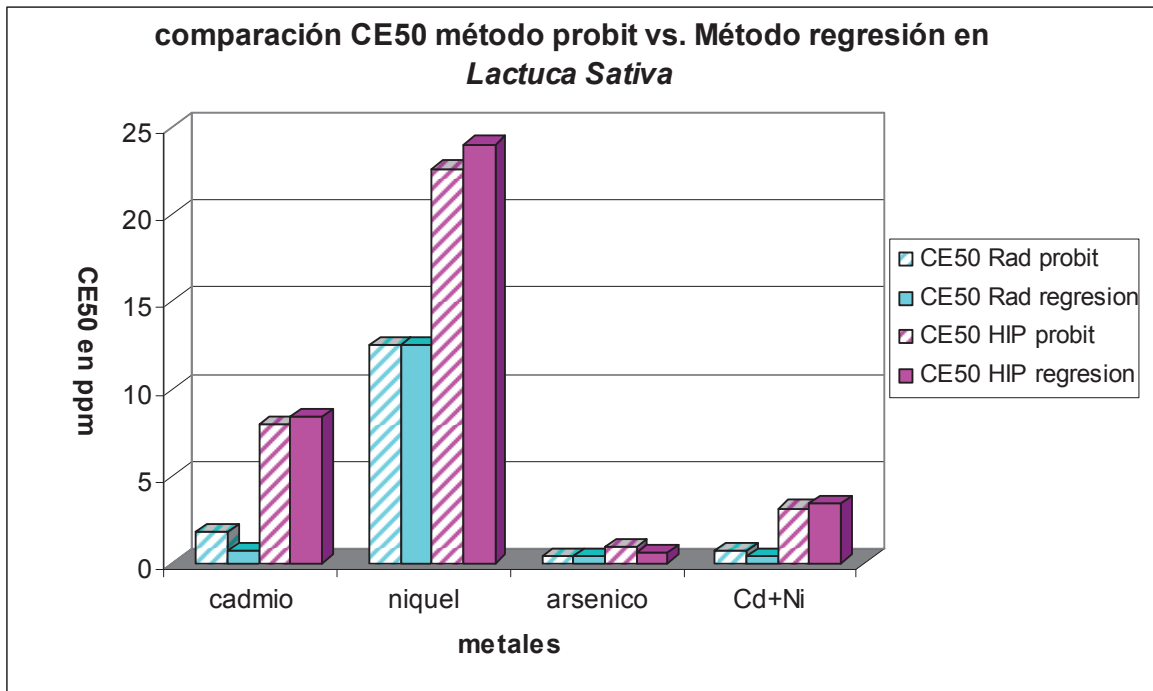


Figura 5. Comparación CE50 método probit y de método de regresión analizando inhibición de elongación de radícula e hipocótilo de semillas de lechuga de *Lactuca sativa*

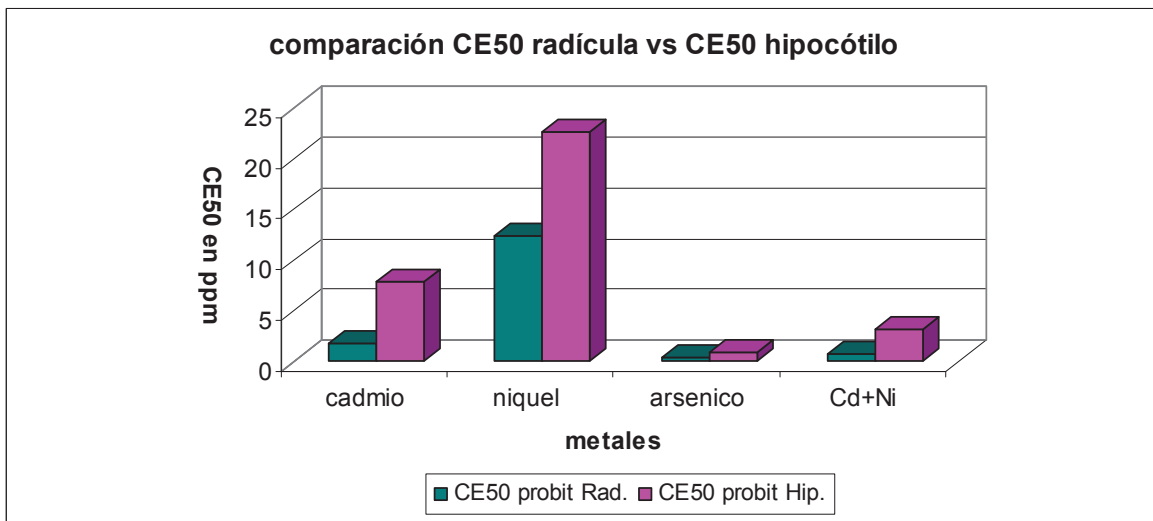


Figura 6. CE50 calculadas por método probit analizando inhibición de elongación de radícula e hipocótilo de semillas de *Lactuca sativa*

Luego mediante el cálculo de los índices toxicológicos NOEC y LOEC se observan las diferencias en la sensibilidad de un mismo indicador para diferentes elementos,

nuevamente pudiéndose comprobar la aparición de efectos inhibitorios a concentraciones menores para los efluentes artificiales de arsénico y de la mezcla de Cadmio y Níquel. (tabla 3).

metal	LOEC Rad.	LOEC hip.	NOEC Rad.	NOEC Hip.
cadmio	2	2	---	---
níquel	9	20	1,5	11,6
arsénico	0,5	0,5	0,05	0,05
Cd+Ni	0,5	5	---	0,5

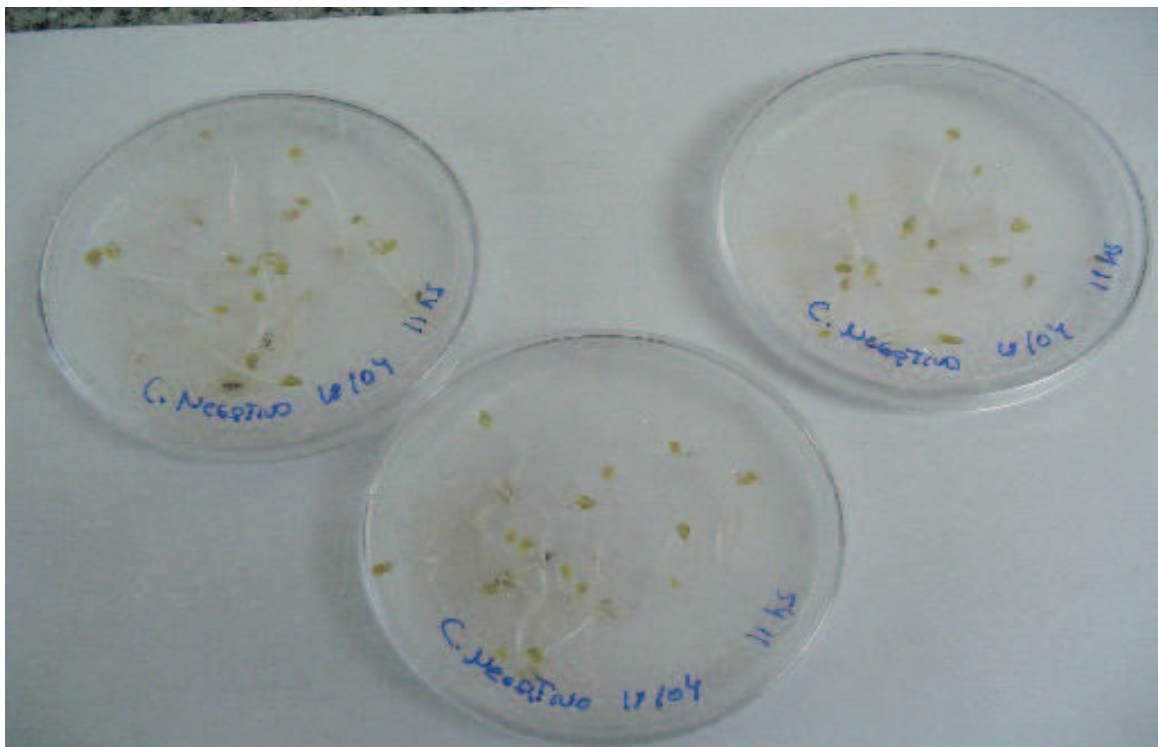
**Tabla 3. Determinación de LOEC y NOEC siendo el efecto analizando inhibición de elongación de radícula e hipocótilo de semillas de *Lactuca sativa***

LOEC: menor concentración a la que se observa efecto.

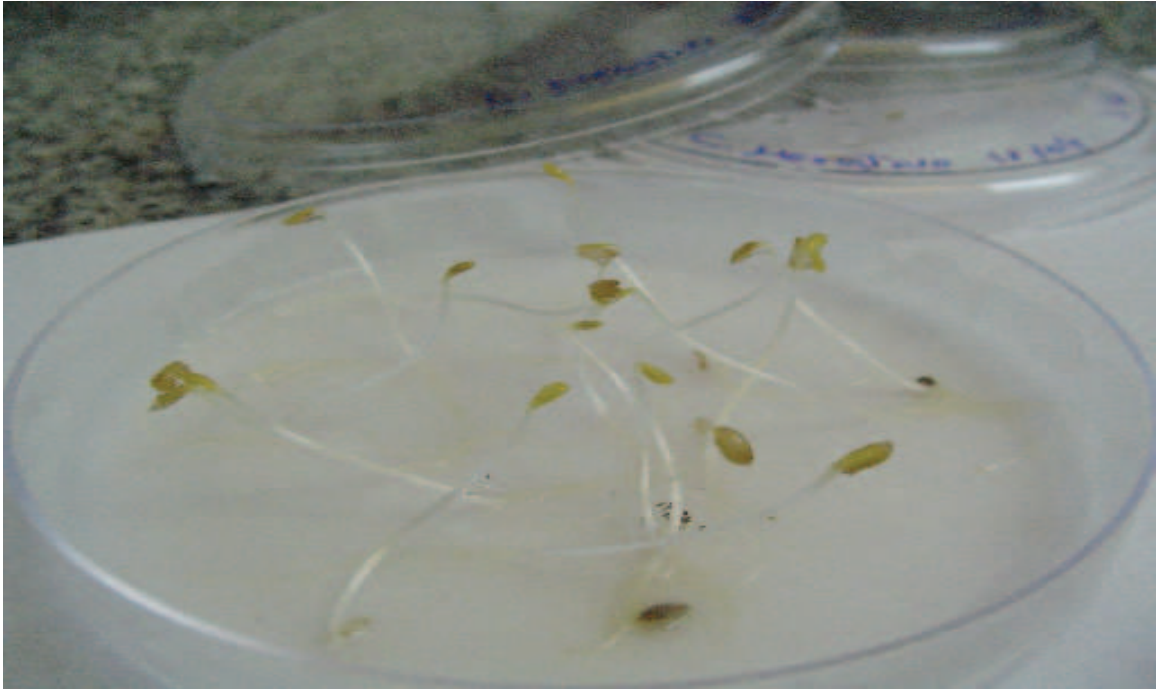
NOEC: mayor concentración a la cual no se observan efectos.

Los valores correspondiente a NOEC de Cadmio y de la mezcla Cd+Ni no pudieron ser calculados debido a que las mínimas concentraciones analizadas para los dos metales en cuestión, exhiben el efecto cuantificado para calcular dichos índices de toxicidad.

A continuación podrán observarse algunas fotografías de los ensayos realizados durante el desarrollo de la presente tesina.



**Imagen 1. crecimiento de control negativo, ensayos con *Lactuca Sativa***



**Imagen 2. crecimiento ensayo con *Lactuca Sativa* control negativo.**



**Imagen 3. Medición radícula e hipocótilo, ensayo con *Lactuca Sativa*.**

4.1.4.2-ENSAYOS CON *EISENIA FOETIDA*:

tratamiento	n° de muertes	Tratamiento	n° de muertes	tratamiento	n° de muertes
<b>Control neg.</b>	<b>0</b>	<b>Control neg.</b>	<b>0</b>	<b>Control neg.</b>	<b>0</b>
Cd (II) 1000	0	Cd (II) 1000	0	Cd (II) 1000	0
Cd (II) 100	0	Cd (II) 100	0	Cd (II) 100	0
Cd (II) 10	0	Cd (II) 10	0	Cd (II) 10	0
Ni (II) 1000	0	Ni (II) 1000	0	Ni (II) 1000	0
Ni (II) 100	0	Ni (II) 100	0	Ni (II) 100	0
Ni (II) 10	0	Ni (II) 10	0	Ni (II) 10	0
<b>As (III) 1000</b>	<b>6</b>	<b>As (III) 1000</b>	<b>6</b>	<b>As (III) 1000</b>	<b>6</b>
As (III) 100	0	As (III) 100	0	As (III) 100	0
As (III) 10	0	As (III) 10	0	As (III) 10	0
As (III) 1	0	As (III) 1	0	As (III) 1	0
As (III) 0,1	0	As (III) 0,1	0	As (III) 0,1	0
Cd+Ni 100	0	Cd+Ni 100	0	Cd+Ni 100	0
Cd+Ni 10	0	Cd+Ni 10	0	Cd+Ni 10	0
Cd+Ni 1	0	Cd+Ni 1	0	Cd+Ni 1	0
Cd+Ni 0,1	0	Cd+Ni 0,1	0	Cd+Ni 0,1	0

**Tabla 4. Numero de muertes observadas en ensayos de toxicidad de *Eisenia foétida***

Como puede observarse en la tabla 4 el efecto de mortalidad utilizado como punto final del ensayo no proporciona demasiada información debido a la baja sensibilidad en el efecto analizado para este tipo de indicador, de medio de desarrollo del bioensayo y específicamente para los metales pesados analizados en el presente trabajo.

Además se realiza un seguimiento del peso de las lombrices durante el desarrollo del ensayo, no mostrando un comportamiento constante con respecto de la concentración, por lo cual tampoco se puede utilizar la variación de peso como un efecto crónico relacionado con el nivel de contaminación.

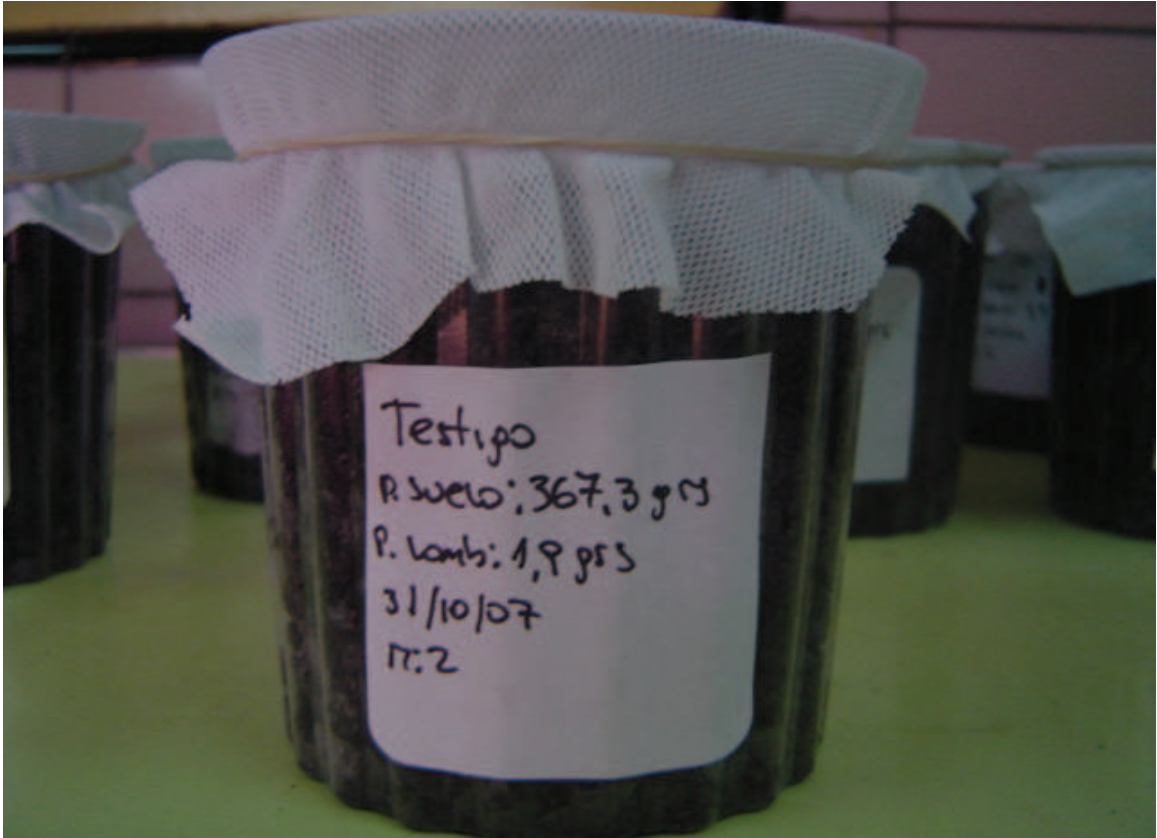




Imagen 4. Pesada lombrices ensayo con *Eisenia Foétida*.



Imagen 5. Observación estado de lombrices, ensayo con *Eisenia Foétida*.



**Imagen 6. Ensayo con *Eisenia Foétida*.**

#### **4.2.2. ENSAYOS CON BULBOS DE CEBOLLA *Allium cepa* L.:**

Como se observa en la figura 7 el crecimiento de la raíz de bulbos de cebolla *Allium cepa* L. se encuentra inversamente relacionado con la concentración del metal, lo que permite la utilización de este parámetro como un indicador del nivel de concentración de determinado metal en el agua.

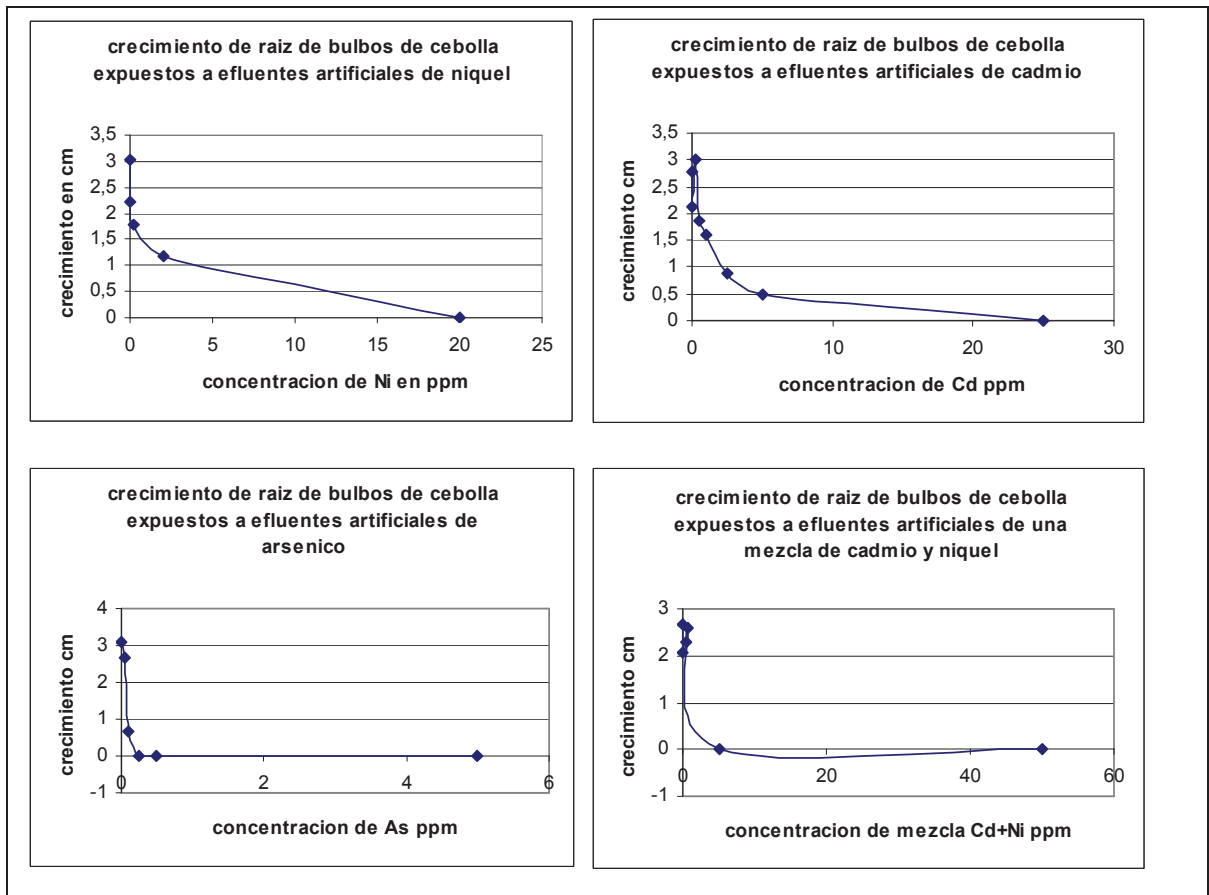


Figura 7. Crecimiento de raíz de bulbos de cebolla *Allium cepa L.* frente a distintos metales pesados

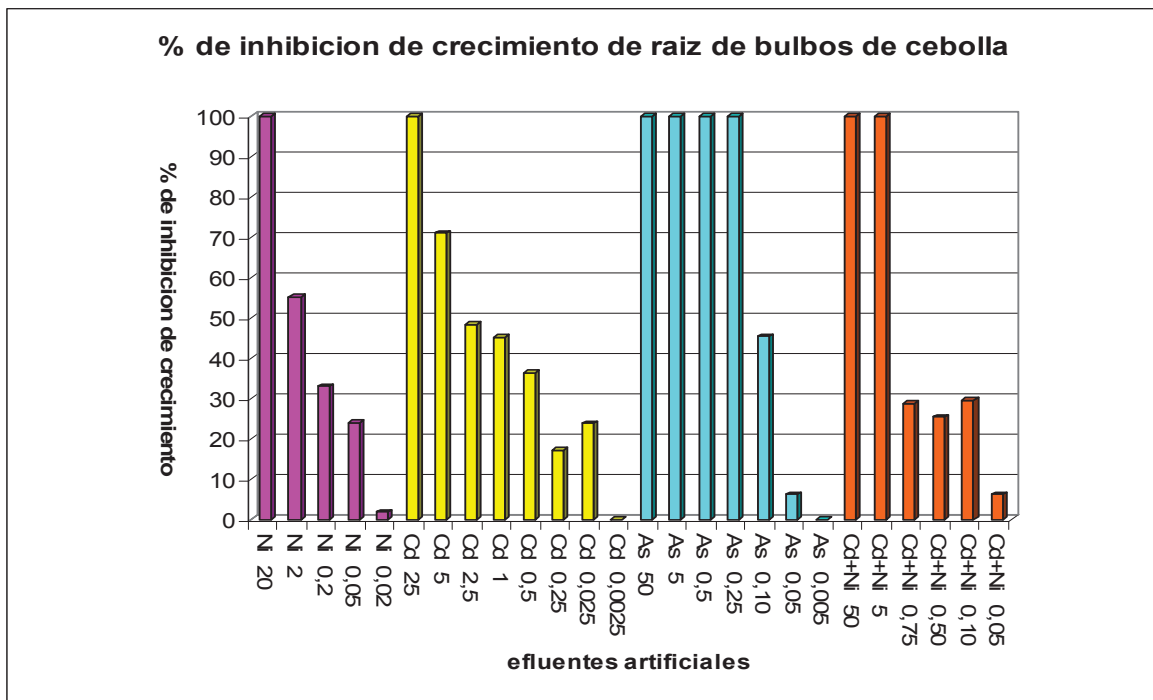


Figura 8. Comportamiento de % de inhibición de crecimiento de raíz de bulbos de cebollas *Allium cepa L.* Con distintos efluentes artificiales de metales pesados.

Según puede observarse en figura 8 a medida que aumentamos la concentración del metal aumenta el % de inhibición de elongación de la raíz de los bulbos, siendo los elementos que provocan mayor toxicidad para este indicador el Arsénico y el Níquel (tabla 5), correspondiéndoles obviamente menores CE50. (figura 9)

METAL	CE50 análisis regresión	CE50 método Probit *	Limite inf.	Limite sup.
Cadmio (II)	0,895	1,099	0,426	3,034
Níquel (II)	0,691	0,603	0,221	2,089
Arsénico (III)	0,111	0,1	0,075	0,147
Cd+Ni	0,988	0,736	0,357	1,752

\*Valores calculados al 95% de confianza

Tabla 5. CE50 analizando inhibición de elongación de raíz de bulbos de cebolla *Allium cepa L.* frente a distintos metales pesados

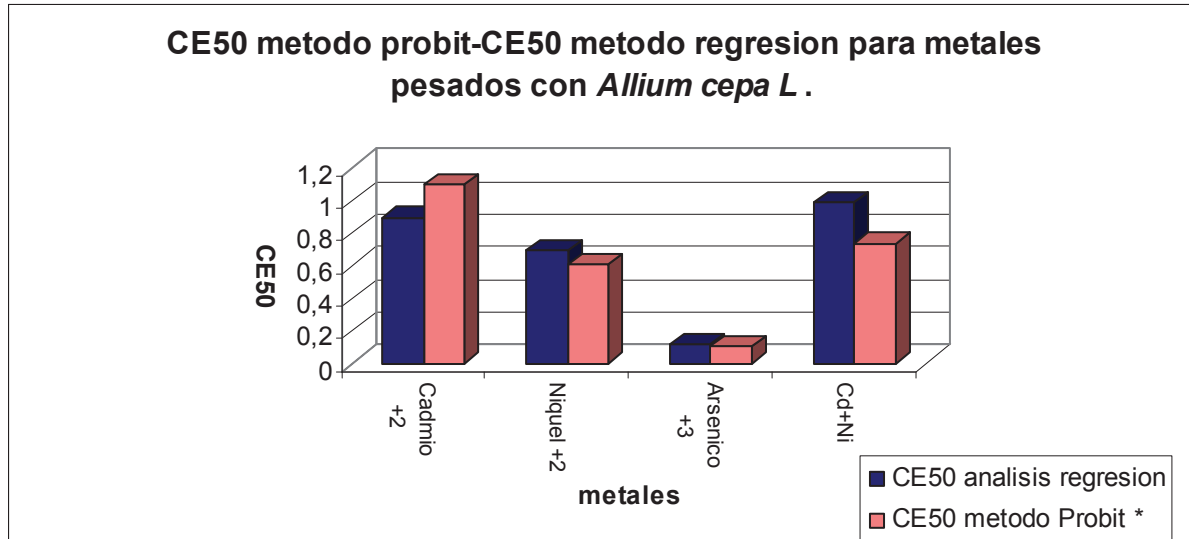


Figura 9. Comparación CE50 método probit vs. CE50 método regresión para metales pesados analizando inhibición de elongación de raíz de bulbos de cebolla *Allium cepa L.*

Como se puede observar a través del cálculo de los índices LOEC y NOEC los bulbos de cebolla *Allium Cepa L.* resultan ser un indicador altamente sensible para los elementos analizados debido a que sus efectos tóxicos inhibitorios se producen a dosis muy bajas



(tabla 6), inferiores a las necesarias para provocar inhibiciones en las semillas de Lechuga *Lactuca Sativa*.

metal	LOEC	NOEC
cadmio	0,5	0,25
níquel	0,2	0,05
arsénico	0,1	0,05
Cd+Ni	0,75	0,5

**Tabla 6. Determinación de LOEC y NOEC analizando inhibición de elongación de raíz de bulbos de cebolla *Allium cepa L.* mediante análisis de varianza de método Infostat.**



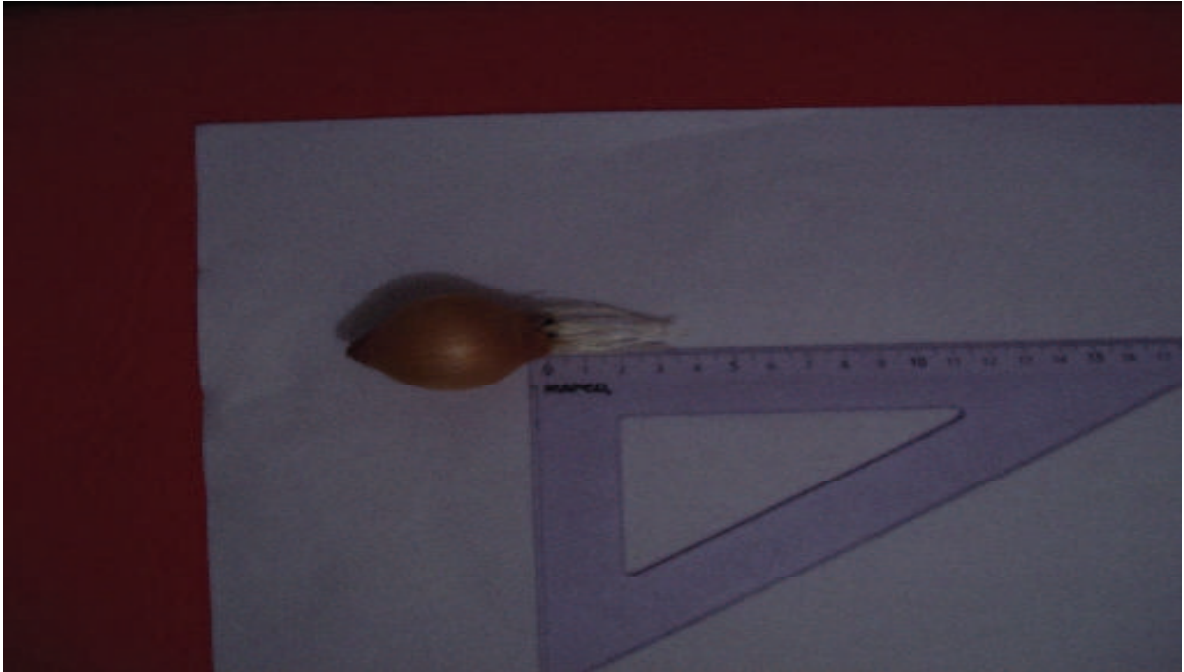
**Imagen 7. Crecimiento de raíz de bulbos *Allium Cepa L.* en control positivo.**



Imagen 8. Crecimiento de raíz de bulbos *Allium Cepa L.* en control negativo.



Imagen 9. Desarrollo ensayo bulbos *Allium Cepa L.*



**Imagen 10. Medición de raíz bulbos *Allium Cepa L.***

## **4.2. DISCUSION**

La utilización de indicadores biológicos de exposición para el análisis de aguas residuales permite evaluar el nivel de contaminación de manera rápida y sencilla, observándose diferentes sensibilidad de acuerdo al indicador utilizado, lo cual se coincide con lo propuesto por Maldonado, Arrueta y Navarro en determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria (2006). [66]

Leonard (1990) considera que estos bioensayos proporcionan un valor presuntivo del nivel de contaminación de las muestras, coincidiendo a su vez con lo propuesto por Shandu (1991) sobre la importancia de la escasez de resultados falsos positivos en este tipo de ensayos. [70]

De acuerdo al elemento que se quiera determinar mediante estos bioensayos será la elección de cual organismo se utilizará teniendo en cuenta que no todos los indicadores responden de igual manera para distintos elementos, coincidiendo con lo propuesto por Iannacone y Alvariño en su trabajo efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares (2005). [67]

Torres Rodríguez, García Melian, Hernández Perera y Fernández Novo ( 2006) consideran que en el caso de análisis de aguas residuales el indicador *Lactuca sativa*

responde de manera correcta para este tipo de análisis, siendo importante tener en cuenta la facilidad de realización del ensayo y el bajo costo necesario para su desarrollo. [71]

Marcano, Carruyo, Montiel, Bracho y Soto (1999) afirman que los bulbos de cebollas *Allium cepa L.* se pueden utilizar para determinar los niveles de Cadmio presentes en una muestra, pudiendo valorarse diferentes puntos finales como índice mitótico, aberraciones cromosómicas, elongación de raíz, etc., estando el grado de toxicidad relacionado no solamente a la concentración sino también al tiempo de exposición. [68]

Ávila, Gaete, Morales y Neaman (2007) utilizan *Eisenia foétida* como indicador de contaminación de suelos, analizando toxicidad aguda y crónica, observando que este indicador proporciona información valiosa analizando efectos crónicos, como modificaciones en reproducción, etc. Siendo el efecto agudo de muerte un parámetro que proporciona poca información debido a su bajo nivel de sensibilidad. [69]

Coincidiendo con lo expuesto anteriormente por Ávila, Gaete, Morales y Neaman, mediante el ensayo de toxicidad aguda de *Eisenia foétida* no se lograron obtener resultados significativos debido probablemente a las características del medio donde se desarrollo el ensayo y a los elementos que se analizaron en el presente trabajo. El comportamiento de los pesos durante el desarrollo del bioensayos tampoco arrojó un resultado significativo al no presentar un comportamiento que pudiera relacionarse con modificaciones en las concentraciones de metal por lo cual tampoco puede utilizarse como índice de toxicidad.

## CAPITULO 5. CONCLUSIONES

El uso de indicadores biológicos de exposición es una alternativa para el monitoreo de índices de contaminación que presenta algunas características que en el momento de selección de método de análisis pueden favorecer su elección frente a los métodos analíticos instrumentales. Algunas de estas características son la facilidad de desarrollo de los ensayos, bajo costo instrumental, rapidez, puntos finales fáciles de cuantificar que no requieren demasiada inversión de capacitación a la persona que realice los ensayos, permiten valorar el efecto tóxico total de la muestra, siendo el resultado representativo de lo que en realidad sucede, a diferencia del análisis físico-químico que permite la caracterización de riesgo a partir del análisis individual de los distintos elementos contenidos en la muestra. Otra característica importante a tener en cuenta es la selección de que tipo de indicador se va a utilizar en función del tipo de muestra a analizar, debido a que de acuerdo a las características propias de cada indicador y de los elementos presentes en la muestra, varía la sensibilidad del ensayo.

En el análisis de aguas residuales estudiadas en el presente trabajo, los indicadores ensayados que mejor responden son las semillas de *Lactuca sativa* y los bulbos de cebolla de *Allium cepa* L. debido a que las sensibilidades con respecto a los metales son altas permitiendo el análisis de muestras que presentan baja concentración de metales pesados. A su vez entre estos dos indicadores, el que presenta mayor sensibilidad son los bulbos de cebolla que presentan sus CE50 alrededor de 1 ppm para los metales ensayados.

En el caso del indicador *Eisenia foétida*, el punto final caracterizado presenta muy baja sensibilidad, no resultando un indicador adecuado para este tipo de muestras, teniendo en cuenta el sustrato utilizado para desarrollar el ensayo. Es importante tener en cuenta que la baja sensibilidad en este ensayo puede estar relacionada con la concentración real de metal que queda biodisponible para ser utilizado por las lombrices, debido en parte a la composición del sustrato que presenta entre sus componentes arcilla, la cual en sus cargas negativas puede retener gran cantidad del metal, modificando la concentración real que queda disponible para el indicador. En este sentido, la comparación de diferentes sustratos para desarrollo del bioensayos sería de utilidad, de modo de poder seleccionar aquel en el cual se aumente el metal biodisponible y de este modo se podría determinar si la baja sensibilidad del bioensayo se debe a que las concentraciones probadas no están disponibles para las lombrices o si la baja sensibilidad se encuentra relacionada con aspectos propios de alta resistencia del organismo a este tipo de elementos químicos.



En el presente trabajo se pudo observar que para los metales cadmio y níquel, sus niveles de toxicidad aumentan cuando se encuentran ambos presentes en un efluente, con respecto a lo que sucede cuando se analizan los elementos en forma individual, indicando que se produce un efecto de potenciación o sinergismo. Este efecto de potenciación observado es importante, debido que sólo surge a partir de un ensayo biológico y no de un análisis físico-químico instrumental, siendo mas significativo de lo que sucede realmente en el ecosistema o en el medio ensayado.

En síntesis, el uso de indicadores biológicos de exposición es una herramienta sumamente útil que permite la caracterización del impacto ambiental o nivel de contaminación de manera rápida, sencilla y con un costo sumamente bajo que permite tener una noción más real que la proporcionada por el análisis instrumental. Es importante cuando se intenta realizar la caracterización del nivel de contaminación utilizar varios indicadores de manera de observar los efectos a distintos niveles tróficos, permitiéndome tener una idea aproximada del impacto que tiene sobre el ecosistema la presencia, en este caso de aguas residuales con niveles de contaminación predefinidos.

## CAPITULO 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] TOXICOLOGIA FUNDAMENTAL : Manuel Repetto, Editorial Díaz de Santos, publicado 01/01/2009
- [2] TOXICOLOGIA.NET: <http://wzar.unizar.es/stc/toxicologianet/pages/t/01/t0110.htm>, fecha de consulta: 05/2009
- [3] ANALISIS AMBIENTAL MULTIDISCIPLINARIO: Carlos H. Colangelo y Humberto Abbiatti, Editorial Praia, publicado 2003.
- [4] Material del curso de ecotoxicología de Universidad Nacional de San Martín
- [5] ASOCIACION ARGENTINA DE ECOTOXICOLOGIA: <http://www.aae.org.ar/>, fecha de consulta: 05/2009.
- [6] ECOTOXICOLOGIA: Dr. Alejandro Malpartida, <http://teoria.ecologica.googlepages.com/BorradorEcotoxicologa.pdf>, fecha de consulta: 05/2009.
- [7] EMPLEO DE LOS ENSAYOS CON PLANTAS EN EL CONTROL DE CONTAMINANTES TOXICOS AMBIENTALES: Dra. Teresa torres Rodríguez [http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol41\\_2-3\\_03/hie092-3203.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol41_2-3_03/hie092-3203.htm), fecha de consulta: 05/2009.
- [8] ENSAYOS TOXICOLOGICOS PARA LA EVALUACION DE SUSTANCIAS QUIMICAS EN AGUAS Y SUELOS: Patricia romero, Anna Mendoza Cantu. <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/download/573.pdf>, fecha de consulta: 05/2009
- [9] INDICADORES BIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA : <http://www.fcyt.umss.edu.bo/docentes/29/documentos/indicadoresBiologicosCalidadAgua.pdf>, fecha de consulta: 05/2009.
- [10] USO DE INDICADORES BIOLÓGICOS DE SUELOS: VENTAJAS Y LIMITANTES: Ledieth Uribe: [http://www.mag.go.cr/congreso\\_agronomico\\_XI/a50-6907-III\\_039.pdf](http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_XI/a50-6907-III_039.pdf), fecha de consulta: 05/2009.
- [11] MANUAL PARA EL USO DE PLANTAS BIOINDICADORES EN CENTROS EDUCATIVOS: <https://www.uni-hohenheim.de/eurobionet/Acrobat/Valencia.pdf>, fecha de consulta: 05/2009.
- [12] RINCON VERDE: BIOINDICADORES: <http://rinconverde.blogspot.com/2007/01/bioindicadores.html>, fecha de consulta: 05/2009.

- [13] CONTAMINACION Y FITOTOXICIDAD EN PLANTAS POR METALES PESADOS PROVENIENTES DE SUELOS Y AGUA: Judith Prieto Méndez, César A. González Ramírez, Alma D. Román Gutiérrez, Francisco Prieto García: Centro de investigaciones químicas de Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: <http://www.veterinaria.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/viewFile/25/12> , fecha de consulta: 05/2009.
- [14] INFOJARDIN: [www.infojardin.net](http://www.infojardin.net) , fecha de consulta 05/2009.
- [15] LOMBRICULTURA: Pedro Toccalino, Jaun Roux, Celeste Agüero. Cátedra de zoología y recursos fánicos, Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE, Corrientes Argentina.
- [16] LOMBRICULTURA: PRIMERA PARTE: <http://www.surconsult.com.py/ccu/2006/septiembre2006/lombricultura.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [17] MATERIAL CURSO DE LOMBRICULTURA: Ing. Diana Crespo: IMYZA, INTA Castelar, Bs. As, publicado 2002.
- [18] CEBOLLAS: <http://fichas.infojardin.com/hortalizas-verduras/cebollas-cebolla-temprana-cebolla-tardia-allium-cepa.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [19] VALORACION DEL EFECTO TOXICO DE PENTOXIDO DE VANADIO EN MERISTEMAS DE CEBOLLA: Montiel, Carruyo, Fernandez, Marcano y Torrealba: Departamento de Biología de Universidad del Zulia, Venezuela: [http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-20762007000100003&lng=es&nrm=iso](http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-20762007000100003&lng=es&nrm=iso), fecha de consulta: 05/2009.
- [20] EFECTO ECOTOXICOLOGICO DE TRES METALES PESADOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE CUATRO PLANTAS VASCULARES: José Iannacone y Lorena Alvarino: Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú: [www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072005000200009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072005000200009&script=sci_arttext), fecha de consulta: 05/2009.
- [21] VALORACION DEL EFECTO TOXICO DEL CADMIO EN CELULAS MERISTEMATICAS DE CEBOLLA ALLIUM CEPA L.: Marcano, Carruyo, Montiel, Bracho y Soto: revista facultad de agronomía de Universidad de Zulia, Venezuela: [http://www.revfacagronluz.org.ve/v16\\_5/v165z004.html](http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_5/v165z004.html), fecha de consulta: 05/2009.
- [22] LIBRO ELECTRONICO: LAS CUENCIAS DE LA TIERRA Y EL MEDIO AMBIENTE:

- <http://www.tecnun.es/asignaturas/ecologia/hipertexto/00General/IndiceGral.html>,  
fecha de consulta: 05/2009
- [23] LIBRO VIRTUAL INTRAMED: MEDICINA AMBIENTAL: Alberto Jorge Tolcachies: [http://www.intramed.net/sitios/libro\\_virtual4/4.pdf](http://www.intramed.net/sitios/libro_virtual4/4.pdf), fecha de consulta: 05/2009.
- [24] ALIPSO: CONTAMINACION DEL AIRE: [www.alipso.com](http://www.alipso.com), fecha de consulta: 05/2009.
- [25] GREEN FACUSS: consenso científico sobre la contaminación del aire
- [26] CONTAMINACION DEL SUELO:  
<http://www.sagangea.org/hojaredsuelo/paginas/20hoja.html>, fecha de consulta: 05/2009.
- [27] CONTAMINACION DEL SUELO, ECOLOGIA Y MEDIO AMBIENTE:  
[www.monografias.com](http://www.monografias.com), fecha de consulta: 05/2009.
- [28] EFLUENTES LIQUIDOS: ESTRUCTURPLAN ONLINE:  
[www.estrucplan.com.ar/efluliq.htm](http://www.estrucplan.com.ar/efluliq.htm), fecha de consulta: 05/2009.
- [29] TRATAMIENTO DE EFLUENTES: facultad de ingeniería Universidad Nacional de Cuyo: Guillaume Monchanin y Nicolás Pena,  
<http://www.fing.uncu.edu.ar/catedras/industrias/archivos/2008-Tratamientos-de-efluentes.pdf>, fecha de consulta: 05/2009.
- [30] LEY N° 1508: [http://www.apa.lapampa.gov.ar/Legislacion/pdf/LEY\\_1508\\_-\\_Normas\\_efluentes\\_liquidos\\_y\\_sus\\_agregados.pdf](http://www.apa.lapampa.gov.ar/Legislacion/pdf/LEY_1508_-_Normas_efluentes_liquidos_y_sus_agregados.pdf), fecha de consulta: 05/2009.
- [31] TRATAMIENTO DE EFLUENTES:  
[http://fai.unne.ar/biologia/microind/pagina\\_nueva\\_1.htm](http://fai.unne.ar/biologia/microind/pagina_nueva_1.htm), fecha de consulta 05/2009.
- [32] EVALUACION DE ECOTOXICIDAD DE EFLUENTES INDUSTRIALES Y MUNICIPALES: <http://ecotoxicologia.blogspot.com>, fecha de consulta: 05/2009.
- [33] Ley N° 5965: <http://www.ingenieroambiental.com/?pagina=998>, fecha de consulta: 05/2009.
- [34] GESTION Y CONSERVACION DEL SUELO:  
<http://www.unex.es/edafo/GCSP/GCEMestalesPesados.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [35] METALES PESADOS EN AGUAS RESIDUALES: Ernesto Simon: grupo de fisicoquímica de procesos industriales y medioambientales Universidad Complutense de Madrid:

- <http://weblogs.madrimasd.org/remtavares/archive/2009/05/01/83698.aspx>, fecha de consulta: 05/2009.
- [36] CONTAMINACION DE SUELOS POR METALES PESADOS: <http://www.ecoportal.net/content/view/full/39739>, fecha de consulta: 05/2009.
- [37] CONTAMINACION POR METALES PESADOS: Inés García y Carlos Dorronsoro: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [38] TOXICOLOGIA AVANZADA: Manuel Repetto, editorial Díaz de Santos, publicado 01/01/1995.
- [39] CADMIO: Lenntech: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Cd.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [40] METALES PESADOS: Lenntech: <http://www.lenntech.com/espanol/metales%20pesados.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [41] CONTAMINACION POR METALES PESADOS: [www.sagan-gea.org/hojared\\_AGUA/paginas/15agua.html](http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/15agua.html), fecha de consulta: 05/2009.
- [42] METALES PESADOS: CADMIO TOXICO ENCUBIERTO: [www.ecogenesis.com.ar/index.php?.sec=articulo.php&codigo=30](http://www.ecogenesis.com.ar/index.php?.sec=articulo.php&codigo=30), fecha de consulta: 05/2009.
- [43] CADMIO: HOJA INFORMATIVA DE SUSTANCIAS PELIGROSAS: Departamento de salud y servicios para personas mayores de New Jersey
- [44] ARSENICO: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs2.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs2.html), fecha de consulta: 05/2009.
- [45] INTOXICACION POR METALES PESADOS: [http://www.paritarios.cl/especial\\_intoxicaciones\\_metales\\_pesados.htm](http://www.paritarios.cl/especial_intoxicaciones_metales_pesados.htm), fecha de consulta: 05/2009.
- [46] Decreto 336/03: <http://www.dsostenible.com.ar/leyes/bares336.html>, fecha de consulta 05/2009
- [47] Decreto 2793/06: <http://www.ecologialapampa.gov.ar/Legislacion/pdf/decreto%202793-06.pdf>, fecha de consulta 05/2009.
- [48] PILAS Y BATERIAS: [www.estrucplan.com.ar/Articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=159](http://www.estrucplan.com.ar/Articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=159), fecha de consulta: 05/2009.



- [49] PILAS Y BATERIAS: [www.alihuen.org.ar/informacion-en-general/informacion-sobre-pilas-y-baterias.html](http://www.alihuen.org.ar/informacion-en-general/informacion-sobre-pilas-y-baterias.html), fecha de consulta: 05/2009.
- [50] IMPACTO AMBIENTAL PRODUCIDO POR PILAS EN DESUSO: [www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulos.asp?IDArticulo=1045](http://www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulos.asp?IDArticulo=1045), fecha de consulta: 05/2009.
- [51] EL PROBLEMA DE LAS PILAS: MERCEDES AMBIENTAL: <http://www.mercedesambiental.com.ar/081031cristianfrers.htm>, fecha de consulta: 05/2009.
- [52] HISTORIA DE LA BATERIA: [www.vzh.com.ar/newsletters-nota-007-03.html](http://www.vzh.com.ar/newsletters-nota-007-03.html) , fecha de consulta: 05/2009.
- [53] HISTORIAS DE LAS PILAS: <http://www.proyectogeo.com/bateriasypilas/histopilas.asp>, fecha de consulta: 05/2009.
- [54] LEY 26.184: [www.puntofocal.gov.ar/doc/arg2007/208a1\\_t.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/doc/arg2007/208a1_t.pdf), fecha de consulta: 05/2009.
- [55] PILAS: [http://www.fisicanet.com.ar/quimica/electrolisis/ap03\\_pilas.php](http://www.fisicanet.com.ar/quimica/electrolisis/ap03_pilas.php), fecha de consulta: 05/2009.
- [56] PROCESOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN PLANTAS GALVANICAS Y METALURGICAS: <http://www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=777>, fecha de consulta: 05/2009.
- [57] PILAS: [www.eco-sitio.com.ar/ea\\_12\\_pilas.htm](http://www.eco-sitio.com.ar/ea_12_pilas.htm), fecha de consulta: 05/2009
- [58] PRIMER CONGRESO DE AGUA EN LA PAMPA: EL AGUA UN TEMA DE TODOS: SANTA ROSA LA PAMPA 2005: [http://www.lapampa.gov.ar/RecHidricos/Publicaciones/Libro\\_Primer\\_Congreso\\_del\\_Agua.pdf](http://www.lapampa.gov.ar/RecHidricos/Publicaciones/Libro_Primer_Congreso_del_Agua.pdf), fecha de consulta: 05/2009.
- [59] PRESENCIA DE ARSENICO EN LAS AGUAS SUBTERRANEAS DE LA PAMPA: SEMINARIO HISPANO-LATIONOAMERICANO: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar), fecha de consulta: 05/2009.
- [60] RECLAMO NUEVA LEY DE AGUA POTABLE QUE ADHIERA AL CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO: [www.cuyonoticias.com.ar/index.php/suplementos/opinion/4938-la-pampa-reclama-una-nueva-ley-de-agua-potable-que-adhiera-al-codigo-alimentario-argentino.pdf](http://www.cuyonoticias.com.ar/index.php/suplementos/opinion/4938-la-pampa-reclama-una-nueva-ley-de-agua-potable-que-adhiera-al-codigo-alimentario-argentino.pdf), fecha de consulta: 05/2009.

- [61] FLUOR Y ARSENICO: HAY AGUA EN LA PAMPA QUE NOS ENFERMA: REDAGUA: <http://www.redagua.org/actividad.php?id=378>, fecha de consulta: 05/2009.
- [62] Aguas del colorado SAPEM <http://www.aguasdelscolorado-lp.com.ar/index.html>, fecha de consulta 05/2009.
- [63] REMOCION DE ARSENICO EN EL AGUA PARA BEBIDA Y BIORREMEDIACION DE SUELOS: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD: <http://www.cepis.org.pe/bvsair/e/repindex/rep85/vleh/matedu/ChileAs.pdf>, fecha de consulta: 05/2009.
- [64] PROTOCOLO DE ENSAYO CON SEMILLAS DE LECHUGA *LACTUCA SATIVA* Y *ALLIUM CEPA L.*: ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Gabriela Castillo Morales: <http://www.idrc.ca/openebooks/147-7/>, fecha de consulta: 05/2009.
- [65] PROTOCOLO DE LOMBRICES *EISENIA FOETIDA*: Laboratorio de Moscas, INTA Castelar, Bs. As.

#### REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

- TOXICIDAD AGUDA DE LIXIVIADOS ACUOSOS MEDIANTE UN ENSAYO CON *LACTUCA SATIVA*: Marina Teresa Torres Rodríguez, Maricel García Melian, Nélica Hernández Pereyra, Marta Fernández Novo: [http://www.ugr.es/~dpto\\_prev/revista/pdf/Hig%20Sanid%20Ambient%206%20170-172%20\(2006\).pdf](http://www.ugr.es/~dpto_prev/revista/pdf/Hig%20Sanid%20Ambient%206%20170-172%20(2006).pdf), fecha de consulta: 05/2009
- DETERMINACION DE EFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS A TRAVES DE ENSAYOS DE FITOTOXICIDAD USANDO SEMILLAS DE LECHUGA, ESCAROLA Y ACHICORIA: Navarro, Arrueta, Maldonado: Universidad Nacional de Tucumán 2006.
- TOXICIDAD AGUDA DEL CROMO USANDO *ALLIUM CEPA L.*: Margarita Zumaeta y María Esparza: centro panamericano de ingeniería sanitaria y ciencias del ambiente: <http://www.cepis.org.pe/bvsacd/scan2/039219/039219.pdf>, fecha de consulta: 05/2009.
- REPRODUCCION DE *EISENIA FOETIDA* EN SUELOS AGRICULAS DE AREAS CONTAMINADAS POR COBRE Y ARSENICO: Gonzalo Ávila, Hernán Gaete, Mario Morales y Alexander Neaman: Universidad de Valparaíso,

departamento de biología y ciencias ambientales:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2007000300018](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2007000300018), fecha de consulta. 05/2009.