

Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia pulex* para la evaluación de muestras ambientales

Pedro Miguel Escobar Malaver*

Fecha de envío: 28 de diciembre de 2008.

Fecha de aceptación: 16 de abril de 2009.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación es la implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando un microcrustáceo nativo del área de la sabana de Bogotá, la *Daphnia pulex*, para determinar el índice de toxicidad de muestras ambientales y obtener una clasificación de efluentes industriales que permita fortalecer los mecanismos de calidad y control ambiental.

Se realizaron pruebas de toxicidad de efluentes de industrias de curtiembre (proceso de curtido con cromo y proceso de ribera), industria inorgánica (planta cloro-soda), industria termoeléctrica (patio de cenizas) e industria galvanoplástica (proceso de galvanoplastia) para obtener la respectiva CL_{50} que permita, con el caudal de cada proceso, determinar el índice toxicológico de los efluentes y clasificar las industrias de acuerdo con la carga tóxica vertida al cuerpo receptor.

Una vez obtenida la toxicidad de los efluentes de los procesos: curtido con cromo (CL_{50-48} de 0,643%),

proceso de ribera (CL_{50-48} de 0,038%), planta cloro-soda (CL_{50-48} de 0,033%), patio de cenizas (CL_{50-48} de 68,461%) y proceso de galvanoplastia (CL_{50-48} de 0,060%), se clasifican las industrias tipo de acuerdo con su carga tóxica en: despreciable (industria de curtiembre), moderada (industria termoeléctrica) y considerable (industrias inorgánica y galvanoplástica).

Los distintos niveles de clasificación obtenidos permiten establecer que las cargas tóxicas de los efluentes dependen no sólo de la concentración letal del vertimiento, sino del caudal aportado por éste.

El índice toxicológico constituye una herramienta valiosa, poco costosa y efectiva para la protección, control, evaluación y clasificación no sólo de efluentes industriales vertidos, sino también de cuerpos de agua receptores. Esto permite a las entidades reguladoras realizar fácilmente un ordenamiento territorial adecuado.

Palabras clave: ecotoxicidad, bioensayos, ensayo estático, Probit, índice toxicológico, *Daphnia pulex*.

* Profesor del Programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de La Salle.

ABSTRACT

The objective of this investigation is the implementation of a system of alert of toxicological risk using a native microcrustacean of the area of the plain of Bogotá, the *Daphnia pulex*, determining the index of toxicity of environmental samples to obtain a classification of industrial effluent's that allows to strengthen the mechanisms of quality and environmental control of the entities attributed to the Ministry of the Environment.

They were carried out tests of toxicity of effluent's of tannery industries (I process of weather-beaten with chromium and riverside process), inorganic industry (it plants chlorine-soda), thermoelectric industry (patio of ashy) and industry galvanoplasty (process of galvanoplasty) for the obtaining of the respective CL50 that allows, with the flow of each process, to obtain the toxicological index of the effluent's and to classify the agreement industries with the toxic load poured to the receiving body (Bogotá river).

The obtained toxicity of the effluent's of the process of weatherbeaten with chromium (CL50-48 of

0,643%), riverside process (CL50-48 of 0,038%), it plants chlorine-soda (CL50-48 of 0,033%), patio of ashy (CL50-48 of 68,461%) and process of galvanoplasty (CL50-48 of 0,060%), it allowed to classify the industries agreement type with their toxic load in worthless (tannery industry), moderate (thermoelectric industry) and considerable (inorganic industries and galvanoplasty).

The different obtained classification levels allow to establish that the toxic loads of the effluent's depend, not alone of the lethal concentration of it discharges but of the flow contributed by the same one.

The toxicological Index constitutes a valuable tool, not very expensive and effective for the protection, control, evaluation and non alone classification of industrial effluent's poured but of bodies of water receivers, allowing to the entities regulators (Ministry of the Environment) the realization of an appropriate territorial classification.

Keywords: Rehearsals with alive beings, Bioassays, Aquatic toxicity, *Daphnia*, Toxicological CL50, index.

INTRODUCCIÓN

El movimiento de un contaminante a través del aire, el suelo y la biota, así como las interacciones y modificaciones que ocurren en cada uno de estos medios, son procesos complejos y poco estudiados.

Cuando un contaminante entra al medioambiente, se dispersa e interactúa con los elementos pertenecientes al medio, y, en algunos casos, se transporta a ciertas distancias para, posteriormente, transferirse a otros componentes del sistema.

En cualquiera de estos pasos, el contaminante se podrá transformar o degradar, llegando a producir efectos sobre los organismos individuales en forma inmediata, ya sea por toxicidad directa o por alteración del ambiente donde se desarrollan; pero, desde el punto de vista ecológico, la importancia del contaminante está dada por el impacto generado sobre las poblaciones expuestas.

En Europa y los Estados Unidos se han desarrollado por más de ciento veinte años varios tipos de ensayos de toxicidad, aunque las diferencias básicas son la concentración de tóxico utilizada y el tiempo de exposición a éste.

El uso de pruebas de toxicidad para determinar el efecto de sustancias sobre los ecosistemas acuáticos se inició en 1947 con Fry, quien estudió los efectos del ambiente sobre la actividad de los organismos. Wuhrmann (1952) se refiere, con el estudio de la relación tiempo-efecto para la evaluación de la toxicidad de una sustancia, al tiempo de manifestación de un efecto tóxico en un organismo.

En los últimos veinticinco o treinta años, se han utilizado ensayos de toxicidad con organismos de aguas continentales, tanto en condiciones de laboratorio, como de campo, con el objeto de evaluar y reconocer

los efectos de xenobióticos sobre la biota acuática, ensayos estandarizados por organizaciones internacionales de regulación y control tales como la CEE (Comunidad Económica Europea), ASTM (American Society of Technicals and Materials), ISO (The International Organization for Standardization), WHO (World Health Organization), USEPA (United States Environmental Protection Agency) y Cetesb (Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental de Brasil), y otros, que las utilizan en la evaluación de la carga tóxica de vertimientos al medio acuático.

Los bioensayos, son, por tanto, definidos como el método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente tóxico (químico o no) sobre un organismo vivo, a través de la comparación de ese agente con el efecto de una solución patrón o estándar. La prueba de toxicidad corresponde al método utilizado para detectar y evaluar la capacidad de un agente dado para producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos; su objetivo primario, además de obtener datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es caracterizar la relación dosis-respuesta del agente.

Son pruebas que se basan en la exposición de juveniles (cultivados en laboratorio) de *Daphnia pulex* a diferentes porcentajes de dilución de un (agente) efluente potencialmente tóxico por un período de 48 horas, para determinar la concentración (%) del tóxico que produce la muerte del 50% de la población expuesta en las 48 horas. Esta concentración (%) se expresa como la concentración letal media (CL_{50}).

Los conceptos de toxicidad y concentraciones ambientales, relacionados con las sustancias químicas, son válidos también para los efluentes líquidos, y son importantes en la medida en que en estos conceptos se basa el establecimiento de los criterios para controlar el nivel de los agentes tóxicos presentes en los efluentes.

El control del efluente como un todo se realiza a través de pruebas de toxicidad, en las cuales los organismos acuáticos representativos de las comunidades biológicas de los cuerpos de agua receptores son expuestos a varias concentraciones de éste, por lo que se comprueba cuáles son los efectos que estos efluentes causan sobre los organismos de prueba, y que se traducen en un resultado final de las acciones aditivas, antagonicas y sinérgicas de las sustancias biodisponibles que los componen.

De esta forma, la toxicidad, que es una característica inherente a una sustancia o mezcla de sustancias químicas y que se ejerce sobre organismos vivos, se vuelve, desde este punto de vista, la única variable para ser medida, por lo que es posible, a través del control de la toxicidad del efluente líquido, compatibilizar su vertimiento con las características deseables del cuerpo receptor, de tal forma que éste no cause efectos tóxicos de naturaleza aguda o crónica a la biota acuática, fundamentalmente, cuando uno de sus principales usos se refiere a su protección.

La evaluación más común de la toxicidad es la medida de la letalidad a corto plazo. Para una sustancia o vertimiento dado, esta medida implica la determinación de la concentración media que es letal para una porción fija (50%) de una población de organismos de prueba, después de una exposición continua durante un tiempo fijo (48-96 horas).

Al seleccionar organismos para evaluar la toxicidad, es necesario tener en cuenta la relevancia de éstos respecto al ambiente de interés, la sensibilidad frente a muchas sustancias tóxicas y que el mantenimiento en el laboratorio no sea el factor limitante. Este último factor es particularmente fundamental para la selección de animales que deban someterse a pruebas.

Los organismos usados en las pruebas de toxicidad deben ser genéticamente idénticos y libres de pató-

genos. Deben conservarse en condiciones estériles en un ambiente constante e iluminados con luz artificial, que, en lo posible, debe ser equivalente a la luz solar durante un período determinado (12 a 16 horas). Éstos son requerimientos cuyo principal interés es un ensayo de toxicidad que sea completamente repetible.

El uso de microcrustáceos para determinar la toxicidad resulta recomendable. Es rápido y no resulta caro. Grandes números de organismos de prueba se encuentran disponibles en condiciones controladas con precisión, de suerte que los resultados obtenidos presentan validez estadística y pueden repetirse con facilidad (ver figura 1).

Figura 1.



Fuente: Lab. Bioensayos U. de La Salle

Su uso en ensayos cuantitativos sobre sustancias tóxicas conocidas, y en la ordenación de toxicidades relativas, es perfectamente factible con considerable ahorro de gastos en mantenimiento de los animales.

El presente trabajo presenta los resultados de las concentraciones letales CL_{50-48} de la industria de curtambres (efluentes de los procesos de ribera y curtido con cromo); industria inorgánica (efluente de la planta cloro-soda); industria termoeléctrica (efluente patio de cenizas), y la industria galvanoplástica (efluente proceso galvanoplastia). Así, se obtuvo el índice toxicológico con el que se clasificaron los efluentes de las diferentes industriales seleccionadas, lo cual demostró la aplicación del sistema de alerta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como en esta investigación se manejó una sola variable independiente (porcentaje de dilución del efluente utilizado) y se buscó establecer la relación dosis-respuesta sobre una determinada población, se seleccionó un diseño completamente aleatorio, donde los tratamientos se distribuyen en las unidades experimentales en forma completamente aleatoria.

En la estructura de diseño completamente aleatorio, todas las unidades experimentales son homogéneas y los tratamientos se asignan a las unidades experimentales utilizando el azar; por lo general, los tratamientos se asignan a un igual número de unidades experimentales.

Las ventajas sobresalientes del diseño completamente aleatorio son:

1. *Flexibilidad:* Se puede usar cualquier número de tratamientos y repeticiones. Aún más, no es necesario que todos los tratamientos tengan igual número de repeticiones; sin embargo, las comparaciones entre los tratamientos resultan más precisas cuando han sido replicados igual número de veces.
2. *Sencillez en el análisis estadístico:* El análisis estadístico es simple, a pesar de que se tenga diferente número de repeticiones, y no se complica por la pérdida de unidades experimentales.

El diseño completamente aleatorio es usado si las unidades experimentales son uniformes (siendo el más eficiente de los diseños) y si una porción grande de unidades pueden no responder o pueden perderse en experimentos donde hay limitación en el número total de unidades experimentales (ya que proporciona el mayor número de grados de libertad para el error).

La agrupación en forma aleatoria de las unidades en los t grupos deberá remover los sesgos sistemáticos, esto es, la aleatorización deberá asegurar que los t grupos de unidades experimentales son similares por naturaleza antes de que se apliquen los tratamientos; finalmente, uno de los t tratamientos se asigna al azar a cada grupo.

El análisis estadístico empleado para los resultados obtenidos en la investigación fue el análisis Probit con el que se obtuvo la CL_{50} , así como los respectivos límites de confianza al 95%. La información obtenida a partir del experimento diseñado estadísticamente fue analizada por el método conocido como análisis de varianza o ANOVA. Se trata de una técnica que consiste en aislar y estimar las varianzas separadas que contribuyen a la varianza total de un experimento; es entonces posible ensayar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas. En este caso, se realizó para determinar si existían o no diferencias significativas en las mortalidades de los diferentes tratamientos.

Para el control y análisis de los parámetros físico-químicos, se contó con los siguientes equipos: pHmetro (Mettler Delta 340 y 240), oxímetro (Corning M-90), conductímetro (Corning M-90), balanza analítica (Mettler AE-160), bombas aireadoras (Fanam).

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

Para la realización de las pruebas de toxicidad, se contó con una incubadora con control de luz y temperatura (Precision 818), con un cuarto climatizado a 20 °C, con una nevera, con buretas automáticas (Brand, Digital II), con un computador (AcerMate 466d), con *software* estadístico (Probit y

análisis de varianza), con una placa calentadora y agitadora (Corning), con un destilador (Aquatron A8S) y con un deionizador (Barnstead NanoPure).

MATERIALES

Se contó con los siguientes materiales de vidrio y otros elementos: pipetas graduadas 10 ml (12), pipetas graduadas de 1 ml (12), pipetas Pasteur plásticas (500), pipetas Pasteur de vidrio (250), tubos de ensayo de 20 ml de capacidad (500), gradilla en polipropileno para tubos de ensayo (18), lámpara fluorescente de 1500 lux para el conteo de los neonatos (1), cristalizadores de 100 ml de capacidad (24), cristalizadores de 60 ml de capacidad (18), estantería metálica de 3 niveles (3), beakers de 50 ml (60), pipeteador para 10 ml (6), acuario de 15 litros de capacidad para preparar el agua de dureza deseada (2), bomba aireadora de doble salida para acuario (2), frasco de vidrio de 300 ml (3), probeta de 2 000 ml (2), beakers de 3 000 ml (10), dispensadores de 50 ml (2), dispensadores de 30 ml (2), garrafón en polipropileno de 50 litros con llave inferior (1).

REACTIVOS

Para la preparación del agua de dilución y de mantenimiento de los cultivos respectivos de microcrustáceos y algas, se utilizaron los siguientes reactivos químicos de calidad (p. a.) “grado analítico”:

- *Reactivos químicos para el mantenimiento de los cultivos:* NaHCO_3 , CaCl_2 , KCl , MgSO_4 , todos grado analítico.
- *Reactivos químicos para el cultivo de algas:* NaNO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; K_2HPO_4 ; NaCl ; KH_2PO_4 ; KOH ; EDTA ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; H_2SO_4 ; H_3BO_3 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; MoO_3 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento llevado a cabo durante la investigación consta de trece pasos que se describen a continuación.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

El organismo seleccionado corresponde a la especie *Daphnia púlex*, perteneciente al grupo de los cladóceros, clase crustácea, utilizándose individuos cultivados en el laboratorio de la tercera generación (obtenida por partenogénesis). El cultivo se alimentó con una suspensión de *Selenastrum capricornutum*, alga verde monocultivada en un medio nutritivo, a razón de 3,0 células/organismo/día, suministrada cada tercer día.

AGUA DE DILUCIÓN

El agua de dilución utilizada en las pruebas fue agua reconstituida con igual dureza a la de mantenimiento del cultivo de organismos ($40\text{-}50 \text{ mg/l CaCO}_3$), preparada a partir de agua destilada-deionizada (CETESB, 1991). El agua se aireó 24 horas antes de ser llevada a cabo la prueba. La concentración de oxígeno disuelto permaneció por encima de los 6 mg/l, y el pH se mantuvo en el rango 7,2 y 7,6.

En la evaluación del agua de dilución (si no tenía ningún efecto sobre la supervivencia de las daphnias) se realizaron ensayos de viabilidad, los cuales permitieron una supervivencia mayor que el 90% de los organismos en un período de 24 horas.

EFLUENTES INDUSTRIALES EVALUADOS

Corresponden a los efluentes de industrias de curtientes (efluentes de los procesos de ribera y curtido con cromo), industria inorgánica (efluente de la planta cloro-soda), industria termoeléctrica (efluen-

te patio de cenizas) y la industria galvanoplástica (efluente proceso galvanoplastia).

TOMA Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

Se tomaron un total de 27 muestras durante los meses de febrero a noviembre de 1996. Las muestras se tomaron en envases plásticos de 1 l de capacidad y se preservaron mediante refrigeración mientras se transportaron al laboratorio para el inicio de los análisis. Igualmente, en el momento de tomar la muestra se midió el caudal del respectivo efluente. Las muestras de los efluentes de los procesos de curtido con cromo, proceso de ribera, planta cloro-soda y patio de cenizas fueron tomadas en forma puntual; las muestras del proceso de galvanoplastia se recolectaron en forma compuesta por un período de ocho horas debido a que la industria trabaja con el sistema de turnos. APHA (American Public Health Association), 1995.

PRUEBAS DE TOXICIDAD

Se expusieron individuos de menos de 24 horas de nacidos de *Daphnia pulex* a diferentes porcentajes

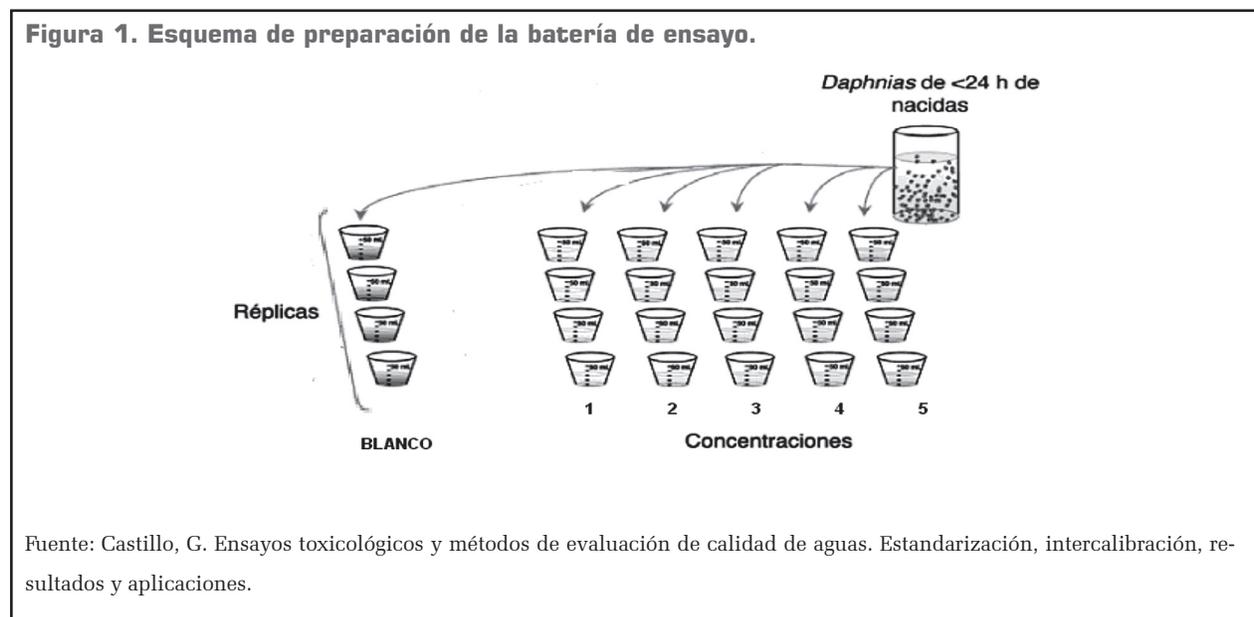
de dilución de los efluentes industriales, y se determinó el porcentaje de dilución del efluente que produjo la muerte de los organismos expuestos durante un tiempo establecido de exposición. Este porcentaje de dilución, conocido como CL_{50-48} , correspondió a la dilución que en un período de 48 horas produjo el 50% de mortalidad de los organismos expuestos.

Esta prueba de toxicidad aguda se llevó a cabo en dos etapas:

PRUEBAS PRELIMINARES (SCREENING TEST)

En estos ensayos, se empleó un amplio intervalo de porciones de muestra para determinar el rango en el cual se llevaría a cabo el ensayo definitivo, buscando los porcentajes en los cuales murieron todos los organismos expuestos (100% mortalidad) y no muere ninguno de los organismos expuestos (0%).

Cada grado de dilución se realizó por cuadruplicado y en forma tal que comprendieron cinco órdenes de magnitud. El esquema de la forma como se preparó la batería de ensayo para las pruebas de toxicidad (Bertoletti, 1990), se presenta en la figura 1.



ENSAYOS DEFINITIVOS

A partir del ensayo preliminar, se emplearon diluciones de muestra por debajo de la porción que determinó el 100% de mortalidad y por encima de la que no provocó ninguna muerte (0%). Se emplearon rangos selectivos según los resultados de la prueba preliminar. Cada grado de dilución se realizó por cuadruplicado, y empleó cinco rangos de dilución con su respectivo control (agua de dilución)(véase la figura 1) (Cetesb, 1991).

DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS CONDICIONES DE LOS ENSAYOS

Antes y después de cada una de las pruebas, tanto preliminares como definitivas, se verificaron el pH, el oxígeno disuelto y la dureza.

Las determinaciones físico-químicas controladas fueron las siguientes:

pH

Para obtener la máxima exactitud en su medición, se utilizó un pH-metro electrónico marca Mettler, modelo 340, cuya confiabilidad dependió de una permanente y cuidadosa calibración.

El pH, tanto del agua de dilución, como del agua de la prueba, permaneció en un rango entre 7,2 y 7,6 unidades.

DUREZA

Se determinó por titulación con EDTA (ácido etilén - diamino - tetraacético) para determinar el magnesio y el calcio presentes en la muestra (APHA, American Public Health Association, 1995).

Debido a que la *Daphnia pulex*, organismo utilizado en los bioensayos, es cultivado en agua moderada-

mente blanda, ésta se mantuvo en un rango de 40 a 48 ppm como CaCO_3 .

TEMPERATURA

Las lecturas de los recipientes utilizados para el cultivo de los organismos se mantuvieron en un rango de 20 ± 1 °C, y fueron realizadas con termómetros ASTM de - 10 a + 50 °C con subdivisiones de 0,1 °C. Los ensayos con *Daphnia pulex* se realizaron en una incubadora marca Precision modelo 818 con control de temperatura, la cual se mantuvo en 20 ± 1 °C.

OXÍGENO DISUELT

La medición del oxígeno disuelto se realizó por el método electrónico, utilizando un oxímetro marca Mettler Toledo, modelo M-90, mediante el cual, al introducir el electrodo en el agua, se leía directamente en una pantalla con números digitales el valor (en mg/l de O_2) del oxígeno disuelto. Durante los ensayos, los valores permanecieron por encima del 70% de saturación.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE PRUEBA

Para la recolección de las muestras ambientales (efluentes de las industrias), se utilizaron recipientes plásticos de un 1 litro de capacidad los cuales se llenaron completamente, evitando dejar burbujas de aire. Las pruebas se realizaron dentro de las 24 horas después de la recolección de las muestras para minimizar las posibles alteraciones de sus características, por lo que se mantuvieron refrigeradas durante su transporte al laboratorio y posterior almacenamiento.

En la preparación de estas soluciones se tuvo en cuenta el intervalo de concentración intermedio entre los valores de 0 y 100% de mortalidad. Cuando se presentó un alto porcentaje de mortalidad durante

las primeras horas del bioensayo, se diluyó aún más la muestra, o se repitió la prueba.

Para cada uno de los cinco porcentajes de dilución a utilizar se prepararon 100 ml de solución, repartida en volúmenes de a 10 ml en cada uno de los recipientes de ensayo (tubos de ensayo de 20 ml de capacidad) y en las correspondientes réplicas.

MONTAJE DE LAS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

Se preparó una serie de 24 recipientes (tubos de ensayo de 20 ml de capacidad), distribuidos en cinco diluciones, un control y cuatro réplicas por cada dilución. La prueba se inició en el momento en que se colocaron cinco neonatos en cada uno de los recipientes, y finalizó a las 48 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó el número de organismos muertos en cada recipiente y se anotaron los resultados en los respectivos registros.

Para establecer la diferencia entre inmovilidad y muerte, se agitó el recipiente y, si al cabo de 10 segundos no había reacción (movilidad, respiración, etcétera), se consideró que estaban muertos.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Para mantener los cultivos en el laboratorio, se evaluó semanalmente la sensibilidad de los neonatos mediante bioensayos, en los cuales se utilizó una sustancia tóxica de referencia como el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) reactivo grado analítico. Este procedimiento se conoce con el nombre de prueba de sensibilidad, y tiene el propósito de garantizar, no sólo la confiabilidad de los datos obtenidos de las pruebas con otros tóxicos, en relación con la capacidad de respuesta de los organismos de prueba, sino el estado fisiológico del cultivo.

Antes de las pruebas rutinarias de control, se estableció el intervalo base dentro del cual permaneció

el cultivo. Si el valor de la CL_{50} se encontraba fuera de este intervalo, se descartaban los bioensayos que se habían realizados paralelamente. Inmediatamente, se verificó que las condiciones de manutención del cultivo fueran las óptimas. Se construyó una carta de control con sus respectivos límites de control, que son los intervalos de concentración por encima y por debajo de la media que representa la tendencia central. Se estima que, con veinte datos puntuales, se tiene una condición representativa de la variabilidad natural de la respuesta de los organismos (EPA, 1994).

ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Para evaluar la aceptabilidad de los resultados obtenidos, se tuvo en cuenta que la mortalidad de los organismos de control no excedió el 10%, que la concentración final del oxígeno disuelto fue mayor que 2 mg/l y que la CL_{50} al dicromato estuvo dentro de los límites determinados para la especie utilizada.

OBTENCIÓN Y CÁLCULO DE LA CL50

La estimación de este valor sigue un modelo matemático que asume una relación continua entre dosis y respuesta, normalidad de los datos e independencia estadística. El valor se calcula con una confiabilidad del 95%.

El análisis más utilizado fue el método de Probit, el cual consiste en un ajuste de los datos obtenidos a partir la mortalidad presentada en el control; luego se aplica una técnica de vecindad para estimar los parámetros que caen por debajo de la distribución logarítmica de la tolerancia, que se asume, tiene una forma particular (EPA, 1994). Se utilizó un programa informático especialmente diseñado para correr este análisis.

Antes de realizar la corrida de los datos obtenidos, se realizó el respectivo análisis de varianza (ANOVA

o prueba F), donde se comprueba la hipótesis de que las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos (mortalidad), y con los resultados del análisis se obtuvo el valor de la respectiva CL_{50} de los efluentes industriales evaluados.

TRATAMIENTO DE LA INFORMACIÓN (OBTENCIÓN DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO)

Para el cálculo del índice toxicológico se contó con la información del nivel trófico afectado (consumidor primario), con el caudal del agua residual respectiva, con la concentración letal media del vertimiento y con la carga tóxica del efluente.

Para el cálculo de la carga tóxica, se utilizó la siguiente ecuación, expresada en unidades tóxicas (UT):

$$\text{Carga tóxica (UT)} = \frac{100 * Q}{L_{50}}$$

En donde:

CL_{50} = concentración letal 50 (concentración del efluente que produjo la mortalidad del 50% de los organismos expuestos)

Q = caudal promedio del efluente ($m^3/día$).

ÍNDICE TOXICOLÓGICO DE LOS EFLUENTES SELECCIONADOS

Con el cálculo y la transformación logarítmica en base 10 de la carga tóxica, se obtuvo el índice toxicológico con el que se clasificaron los efluentes seleccionados de la siguiente manera:

1. valores entre 1,0 y 1,99 - carga tóxica despreciable;
2. valores entre 2,0 y 2,99 - carga tóxica reducida;

3. valores entre 3,0 y 3,99 - carga tóxica moderada;
4. valores entre 4,0 y 4,99 - carga tóxica considerable;
5. valores mayores que 5,0 - carga tóxica elevada.

REPLICACIONES

Para la realización de las diferentes réplicas de las pruebas, se utilizaron los elementos bioestadísticos que se presentan en el protocolo de ejecución de las pruebas toxicológicas (ver tabla 1).

Mahon *et al.* (1989) recomiendan mínimo tres niveles de dosis y dos cultivos separados en cada grupo de dosis. En la presente investigación se utilizaron cinco niveles de dosis y cuatro cultivos separados en cada grupo de dosis (réplicas) más el control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Los datos que se presentan a continuación se refieren a los efectos de los efluentes utilizados en la experimentación sobre microcrustáceos acuáticos del género *Daphnia púlex*. Obteniendo la CL_{50-48} y utilizando el caudal de ellos, se calculó el índice toxicológico de los vertimientos industriales con el fin de alcanzar una alerta o control de este tipo de contaminación. Seguidamente, se presentan los resultados en el orden de la metodología expuesta.

SENSIBILIDAD DEL CULTIVO

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación durante los meses de febrero a noviembre de 1996 y de la sensibilidad de los cultivos de *Daphnia púlex* a la sustancia de referencia (dicromato de potasio - $K_2Cr_2O_7$).

Tabla 1. Protocolo de ejecución de pruebas toxicológicas utilizando *Daphnia pulex*

Tipos de ensayos:	preliminar y definitivo
Rangos de concentraciones:	preliminar (amplio), definitivo (restringido)
Sistema:	estático
Agua de dilución:	agua sintética de laboratorio
Temperatura:	20 °C _ 1 °C
Luz:	sin iluminación
Fotoperíodo:	sin foto período
Aireación:	sin aireación
Tamaño de recipientes de prueba:	depende del organismo utilizado
Volumen soluciones de prueba:	10 mililitros
Renovación de las soluciones:	Sin Renovación
Edad de los organismos de prueba:	estados iniciales, neonatos
Aceptabilidad, validez de la prueba:	el control mínimo supervivencia del 90%
Número organismos concentración:	preliminar (5), definitivo (mínimo 20)
Número concentraciones de prueba:	mínimo 5 y un control
Número réplicas por concentración:	4 réplicas
Duración de la prueba:	48 horas
Efecto observado:	mortalidad en porcentaje
Expresión de los resultados:	CL_{50} - 48
Grupos de tratamiento:	dosis., respuesta
Fuente de sesgos:	cambio en la variable de respuesta
Método de evaluación estadística:	regresión, Probit y ANOVA, F calculado

Fuente: Cetesb, Laboratorio de Toxicología Acuática 1999

Tabla 2. Sensibilidad del cultivo de *Daphnia pulex*

Núm.	FechaA	CL ₅₀	Núm.	Fecha	CL ₅₀
1	15-02-96	0,0691	26	22-06-96	0,0908
2	21-02-96	0,0639	27	26-06-96	0,1522
3	27-02-96	0,1585	28	02-07-96	0,1115
4	27-02-96	0,0812	29	06-07-96	0,1086
5	29-02-96	0,0637	30	18-07-96	0,1209
6	29-02-96	0,0830	31	27-07-96	0,1596
7	05-03-96	0,1948	32	04-08-96	0,1460
8	22-03-96	0,0664	33	08-08-96	0,1257
9	22-03-96	0,0769	34	12-08-96	0,1403
10	24-03-96	0,2106	35	14-08-96	0,1994
11	28-03-96	0,1356	36	23-08-96	0,1000
12	28-03-96	0,1642	37	09-09-96	0,0765
13	29-03-96	0,1202	38	20-09-96	0,1213
14	29-03-96	0,0687	39	30-09-96	0,1149
15	01-04-96	0,1097	40	08-10-96	0,1171
16	06-04-96	0,0899	41	24-10-96	0,0677
17	12-06-96	0,0676	42	28-10-96	0,0836
18	09-05-96	0,1736	43	30-10-96	0,1173
19	10-05-96	0,1911	44	02-11-96	0,1149
20	20-05-96	0,1423	45	06-11-96	0,1171
21	25-05-96	0,1576	46	12-11-96	0,0677
22	07-06-96	0,1615	47	19-11-96	0,0836
23	07-06-96	0,1408	48	24-11-96	0,1173
24	21-06-96	0,1407	49	30-11-96	0,0642
25	21-06-96	0,1098			
			\bar{X}		0,1175
			S		0,0397
			2S		0,0794
			$\bar{X} + 2S$		0,1969
			$\bar{X} - 2S$		0,0381

OBTENCIÓN DE CAUDALES DE EFLUENTES EVALUADOS

En la tabla 3 se presentan los caudales promedio de los efluentes de las industrias evaluadas, obtenidos de los respectivos muestreos puntuales y compuestos de cada efluente.

Tabla 3. Caudales promedio obtenidos de las industrias evaluadas

Industria	Caudal promedio* (m ³ /día)
Proceso de curtido	0,02
Proceso ribera	0,02
Planta cloro-soda	10,3
Patio de cenizas	5961,6
Proceso galvanoplastia	23,89

Caudal promedio*: obtenido de los muestreos puntuales y compuestos realizados para cada industria

Como se puede observar, los caudales más altos son de los efluentes industriales del patio de cenizas y proceso de galvanoplastia.

CL₅₀₋₄₈ DE LOS EFLUENTES EVALUADOS

En la tabla 4 se presentan los datos obtenidos durante los bioensayos de *Daphnia pulex* con el efluente del proceso de curtido, el proceso ribera, la planta cloro-soda, el patio de cenizas y el proceso galvanoplastia.

Tabla 4. Concentración letal CL₅₀₋₄₈ de las industrias evaluadas

Efluente industrial	CL ₅₀₋₄₈ (% V/V)
Proceso curtido con cromo	0,643
Proceso de ribera	0,038
Planta cloro-soda	0,033
Patio de cenizas	68,461
Proceso galvanoplastia	0,060

Tabla 5. Índice toxicológico de las industrias evaluadas

Efluente industrial	Caudal promedio (m ³ /día)	CL ₅₀₋₄₈ (% V/V)	Unidades tóxicas	Índice toxicológico (IETP)**
Proceso curtido con cromo	0,02	0,643	3,110	0,614
Proceso de ribera	0,02	0,038	52,631	1,729
Planta cloro-soda	10,3	0,033	31 212,120	4,494
Patio de cenizas	5 961,6	68,461	8 708,023	3,940
Proceso galvanoplastia	23,89	0,060	39 816,665	4,600

UT*: Unidades tóxicas

IETP**: índice de efectos tóxicos potenciales

OBTENCIÓN DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO

En la tabla 5 se presentan los datos del índice toxicológico resultados del análisis de los datos de bioensayos obtenidos de *Daphnia pulex* con los efluentes de los procesos industriales evaluados.

RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS EFLUENTES EVALUADOS

En la tabla 6 se presentan los datos obtenidos del análisis físico-químico de los efluentes evaluados.

Tabla 6. Resultados fisicoquímicos de los efluentes evaluados

Parámetro (mg/l)	Efluente proceso Galvanotecnia 1996	Efluente patio cenizas termoelectrica 1996	Efluente planta cloro-soda 1996	Efluente proceso de Ribera 1996	Efluente proceso de curtido 1996	Efluente proceso de mercurio 2007
DQO*	60	28,88	150,2	24435,7	27760,3	36
OD**	0,00	6,2	2,74	1,2	3,5	6,02
pH***	3,14	6,4	12,5	12,4	3,60	7,44
Dureza total	384,8	46,17	49,32	-	-	81,6
Conductividad	2 360	1 307	1 080	-	-	-
Cloruros	-	-	2550,5	-	-	357
Sólidos Totales	-	663,7	-	-	-	-
Sulfuros	-	-	-	2068,0	-	-
Mercurio	-	-	-	-	-	0,002
Aluminio	0,54	-	-	-	-	-
Cobre	1,22	-	-	-	-	-
Cromo total	0,57	-	-	-	2869,2	-
Níquel	1,12	-	-	-	-	-
Plomo	0,08	-	-	-	-	-
Zinc	0,04	-	-	-	-	-
Hierro total	0,23	-	2,92	-	0,78	-
Bario	0,65	-	0,24	-	0,24	-

*: demanda química de oxígeno

OD**: oxígeno disuelto

pH***: expresado en unidades de pH

CLASIFICACIÓN DE EFLUENTES A PARTIR DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO

En la tabla 7 se presenta la clasificación a partir del índice toxicológico y la carga tóxica de efluentes.

Tabla 7. Clasificación de efluentes a partir del índice toxicológico

Índice toxicológico (IETP)	Carga tóxica (CT)
Valor entre 1,00 y 1,99	Despreciable
Valor entre 2,00 y 2,99	Reducida
Valor entre 3,00 y 3,99	Moderada
Valor entre 4,00 y 4,99	Considerable
Valor mayor de 5,00	Elevada

CLASIFICACIÓN DE LAS INDUSTRIAS EVALUADAS A PARTIR DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO

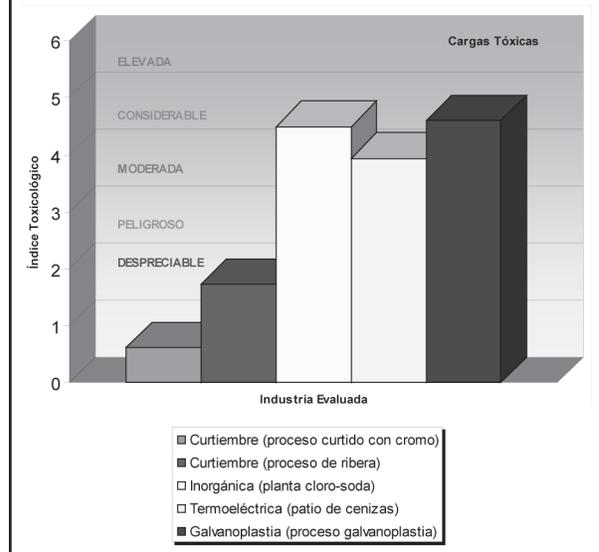
En la tabla 8 se presenta la clasificación de los efluentes de los procesos industriales evaluados a partir del índice toxicológico obtenido de los bioensayos con *Daphnia pulex*.

Tabla 8. Clasificación de industrias evaluadas a partir del índice toxicológico

Industria evaluada	Índice toxicológico (IETP)	Carga tóxica (CT)
Curtiembre (proceso curtido con cromo)	0,614	Despreciable
Curtiembre (proceso de ribera)	1,729	Despreciable
Inorgánica (planta cloro-soda)	4,494	Considerable
Termoeléctrica (patio de cenizas)	3,940	Moderada
Galvanoplastia (proceso galvanoplastia)	4,600	Considerable

En la figura 2 se muestra la clasificación de las diferentes industrias evaluadas, de acuerdo con el índice toxicológico obtenido del análisis de sus efluentes.

Figura 2. Índice de efectos tóxicos potenciales para las diferentes industrias



DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En general, los resultados obtenidos de la CL_{50} , el índice toxicológico de los efluentes seleccionados y la clasificación de las industrias tipo de acuerdo con su carga tóxica permiten evaluar la contribución de cada efluente de un determinado cuerpo receptor, lo que se constituye en un instrumento industrial útil de jerarquización y, consecuentemente, de adopción de estrategias y toma de decisiones en las acciones de control ejercidas por las entidades reguladoras.

Los análisis de varianza efectuados para establecer si las mortalidades en los diferentes tratamientos presentaban diferencias significativas, es decir, si dependían de la concentración del efluente, mostraron que, para los diferentes efluentes seleccionados, el F calculado fue mayor que el F teórico, por lo que se acepta que la mortalidad obtenida fue función de la concentración del efluente.

A continuación, se analiza cada uno de los resultados a la luz de la hipótesis formulada.

INDUSTRIA DE CURTIEMBRE. PROCESO DE CURTIDO CON CROMO

Como se observa en el análisis de resultados de la CL_{50} del proceso de curtido con cromo, los valores de la toxicidad, que oscilan entre 0,422 y 1,510, están relacionados con la concentración de cromo encontrado en el efluente.

Si se asume que la única sustancia en el efluente capaz de generar un efecto tóxico es el cromo, se puede calcular la concentración letal media a partir de las concentraciones medidas; los resultados de estos cálculos muestran que la CL_{50-48} media de 0,643% produce un índice toxicológico de 0,614, lo cual es indicativo de una carga tóxica despreciable.

El cromo es particularmente peligroso por su poder de acumulación en muchos organismos; se ha demostrado que algunas algas acuáticas concentran valores hasta 400 veces el encontrado en su entorno (Barnes, 1969).

La solubilidad de las sales de cromo trivalente utilizado en el proceso está relacionada con el mantenimiento de un pH menor que 4, y la disminución o eliminación del efecto tóxico del cromo depende del efecto del pH sobre la solubilidad de este compuesto. Al mezclarse el efluente con las aguas del río Bogotá, el pH se incrementa, y genera la precipitación del elemento tóxico en forma de hidróxido; además, sumado al caudal del proceso (0,02 m³/día), produce una carga tóxica considerada como despreciable.

INDUSTRIA DE CURTIEMBRE. PROCESO DE RIBERA

En el caso de las muestras del proceso de ribera, los resultados de la CL_{50} oscilaron entre 0,025 a 0,055%, siendo su valor promedio de 0,038%. Si se tiene en cuenta el caudal tan bajo del efluente (la carga tóxica es de 52,631 y el índice toxicológico de 1,729), éste

puede ser clasificado como de carga tóxica despreciable.

Comparando los resultados obtenidos de los efluentes de la industria de curtimento, éstos muestran que la operación de ribera produce un efluente mucho más tóxico que la del proceso de curtido con cromo. El cálculo de la CL_{50-48} del efluente del proceso de ribera, en función de la concentración de sulfuros presente en la muestra, señala que existen otros elementos generadores de toxicidad diferentes de los sulfuros.

La disminución o eliminación del efecto tóxico del sulfuro se encuentra relacionada con el valor del pH; la presencia de sulfuros solubles sólo será posible a pH mayor que 12, por lo que, al producirse la mezcla del efluente con las aguas del río, la forma predominante será el ácido sulfhídrico que escapará en forma de gas.

El intervalo de diluciones para la ejecución de las pruebas de toxicidad para el efluente del proceso de ribera es mucho más estrecho que los realizados para el efluente del proceso de curtido con cromo, lo cual requiere de una elaboración más compleja del bioensayo.

INDUSTRIA INORGÁNICA. PLANTA CLORO-SODA

Como se observa en los resultados obtenidos, el efluente de la planta cloro-soda presenta una alta toxicidad (expresada como CL_{50}) entre el 0,017 y 0,046%. Teniendo en cuenta el caudal promedio de 10,3 m³/día, se obtuvo un índice toxicológico de 4,494, lo que indica un efluente con carga tóxica considerable.

Basados en información suministrada por la CAR, así como en los procesos desarrollados en la industria, se midió la concentración de cloruros, dureza total,

hierro total, oxígeno disuelto y pH en el efluente, presentándose una amplia variabilidad de los valores. La presencia de cloruros en cantidades muy elevadas durante todos los muestreos genera problemas de salinidad que inducen a alteraciones osmóticas sobre los organismos expuestos.

La hidrólisis del hipoclorito da lugar a la formación de ácido hipocloroso, el cual se descompone posteriormente liberando oxígeno (potente agente oxidante); este efecto es fácilmente apreciado por la mortalidad de los organismos de ensayo, ya que la daphnia utilizada carece de mecanismos para la regulación iónica, lo cual produce una muerte rápida (Barnes, 1969).

INDUSTRIA TERMOELÉCTRICA. PATIO DE CENIZAS

Aunque en términos generales podría afirmarse que el efluente del patio de cenizas presentó una baja toxicidad con una CL_{50} promedio de 68,461%, es necesario tener en cuenta que el caudal (5 961,6 m³/día) influye en la determinación del índice toxicológico (3,940), por lo que la carga tóxica del efluente se considera moderada.

Los análisis físico-químicos efectuados señalan la presencia de sólidos totales en concentraciones entre 120 a 1640 mg/l (véase la tabla 1), lo cual puede interferir en los mecanismos respiratorios del organismo utilizado en el bioensayo. La toxicidad observada podría estar relacionada con el alto contenido de sólidos y de materia orgánica (DQO), lo que contribuye a magnificar el efecto tóxico presentado.

INDUSTRIA GALVANOPLÁSTICA. PROCESO DE GALVANOPLASTIA

Los valores de toxicidad (CL_{50-48}) encontrados en el efluente del proceso de galvanoplastia están en un rango de 0,093 a 0,171%, con un promedio de

0,060%, lo cual, unido al caudal de 23,89 m³/día, permite obtener un índice de toxicidad de 4,6 con una carga tóxica considerable.

Los resultados físico-químicos de las muestras analizadas presentan una variación considerable, con unos contenidos de metales pesados (aluminio, cobre, cromo, hierro, zinc) excesivamente altos, lo que establece una relación con los resultados obtenidos de las pruebas de toxicidad. Igualmente, debe tenerse en cuenta que el valor del pH es muy bajo (3,2), y que la mezcla del efluente con el agua de dilución de las pruebas de toxicidad modifica la solubilidad de estos metales ejerciendo el efecto tóxico sobre los organismos de prueba.

De la anterior discusión de resultados se obtienen, a partir del índice toxicológico, una clasificación de los efluentes industriales seleccionados en despreciable (industria de curtiembre), moderada (industria termoeléctrica) y considerable (industrias inorgánica y galvanoplástica).

SENSIBILIDAD DEL CULTIVO DE *DAPHNIA PÚLEX*

Los valores obtenidos de la CL_{50} para las pruebas de sensibilidad del cultivo permiten establecer su permanencia dentro de los rangos de aceptación que comprenden valores entre 0,0381 y 0,1969 mg/l con un valor promedio de 0,1175 mg/l expresados como dicromato de potasio, por lo que los ensayos realizados en paralelo con los diferentes efluentes industriales son considerados válidos estadísticamente, ya que los cultivos estaban en condiciones de ser utilizados en las pruebas de toxicidad.

CONCLUSIONES

En esta investigación se mide, evalúa y comprueba, mediante la obtención de las CL_{50} para diferentes efluentes, los efectos de la contaminación por la des-

carga de vertimientos de tipo industrial sobre la biota de un cuerpo de agua receptor, encontrándose que el IETP (índice de efectos tóxicos potenciales) es un buen indicador de la toxicidad, y muestra, en forma rápida, el peligro potencial de los efluentes industriales.

Finalizada la investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Basado en los resultados, se considera que el sistema propuesto con *Daphnia pulex*, como organismo de prueba, es una herramienta valiosa para la evaluación y clasificación de efluentes industriales en la realización de un adecuado ordenamiento territorial. El método es sensible y permite que las entidades reguladoras puedan utilizarlo fácilmente.
2. El efecto tóxico del efluente de curtido con cromo (CL_{50-48} promedio de 0,643%) es más claro y puede asociarse fácilmente a la presencia del cromo, contrario al efecto del efluente del proceso de ribera (CL_{50-48} promedio de 0,038%), que, aunque más tóxico, puede estar asociado a la presencia de otros elementos diferentes del sulfuro utilizados en el proceso.

Los anteriores valores, aunque tóxicos, permiten clasificar la industria de curtiembre como de carga tóxica despreciable; sin embargo, esta clasificación se ve influenciada por el bajo caudal producido en los procesos.

3. La CL_{50-48} promedio del efluente de la planta de cloro-soda de la industria inorgánica de 0,033% permite establecer un índice de toxicidad de 4,494 dependiente, tanto del caudal, como de la toxicidad, lo que clasifica el efluente como de carga tóxica moderada. Al mostrar el efluente una clara toxicidad, será necesario neutralizar o prevenir la causa de ésta para evitar el deterioro del cuerpo de agua receptor.
4. La concentración letal cincuenta promedio (CL_{50-48}) para *Daphnia pulex* del efluente del patio de cenizas de la industria termoeléctrica fue del 68,461%, con un índice tóxico de 3,94; lo que permite clasificar el efluente como de carga tóxica moderada, debido, principalmente, al alto caudal producido.
5. El efluente del proceso de galvanoplastia de la industria galvanoplástica presenta una carga tóxica de 4,6; lo que permite clasificar este efluente como de toxicidad considerable, acercándose al rango de clasificación elevado, debido a la presencia de metales pesados de carácter tóxico.
6. A pesar de que el índice toxicológico constituye una herramienta valiosa, poco costosa y efectiva, el análisis químico es esencial para la determinación de la causalidad de la toxicidad; por esto, en los programas rutinarios de calidad ambiental, la combinación de estas dos herramientas será básica para la protección y control no sólo de los efluentes industriales sino de los cuerpos de agua receptores.

LECTURAS RECOMENDADAS

- APHA, American Public Health Association. (1995). Standard Methods for the examination of water and wastewater, Washington D. C., 19th Edition.
- ASTM. (1988). Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*.
- Bassio, L. J., Regis Nieto, D. Tremaroli et al. (1990). Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos, CETESB, São Paulo.
- Bautista, A. *Tratamiento del agua residual de proceso de una empresa del sector de recubrimientos metálicos en Bogotá*. Bogotá: Departamento de Ingeniería Civil, Universidad Nacional de Colombia, 2003.
- Bernal, A. y Rojas, A. *Determinación de la concentración letal media (CL_{50}) del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia pulex**. Trabajo de grado. Bogotá: Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad de La Salle, 2007.
- Blaise C. R. "Micromethod for aquatic toxicity assesment using the green alga *Selenastrum capricornutum*". *An International Quarterly*, 1. 1986, 377- 385.
- Bulas Rossini, G.; Díaz, M.; Pica, Y. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad, cap. 5. En línea. Diciembre de 2006 < http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004 >
- Bustos, M.; Díaz, M.; Espinosa, A. *Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos*. Bogotá: Facultad de Ingeniería, sección de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, 2004, p. 36.
- Castro, S. *Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales de Uruguay*., Departamento de Normalización Técnica, Dirección Nacional del Medioambiente, 2002.
- CETESB. *Agua, test de toxicidad aguda con *Daphnia similis claus* (crustácea, cladocera)*. 1991, 1876.
- CETESB. *Análisis estadístico de resultados de pruebas de toxicidad aguda*. L50.17. 1992.
- CIDER-EEB-ISA. Estudio ambiental de termozipa. Documento Final. 1993.
- DUTKA, B. J. Stability and replicability of bioassays used the "battery of test" approach for aquatic ecosystem screening. NWRI Contribution N° 91-72. NWRI, CCIW. Burlington, 1991.
- EPA. *Procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays*. 600/8-87/011. 1987.
- Escobar, P.; García, E. *Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando *Daphnia Magna**. Anexo. 4 Bogotá: Facultad de Ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología, 1993.
- *Generación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico para la cuenca alta del río Bogotá mediante la utilización de bioensayos*. Bogotá: Facultad de Química Industrial, Universidad UDCA, 1997.
- Finney, D. L. *Statistical Method in Biological Assay*. 3th Edition. Londres: Charles Griffin & Company Ltd., London and High Wycombe, 1978.
- Gherardi-Goldsteins, E. *Procedimientos para la utilización de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos*. São Paulo: CETESB, 1990.
- González, H. y Gutiérrez, S. (1995). *Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la sabana de Bogotá*. Trabajo de Grado. Bogotá: Universidad de La Salle.

- Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G.A.; Cairns, J. Handbook of Ecotoxicology. Boca Ratón: Lewis Publishers..
- Hubert, J. (1995). *Bioassay and its relation to agricultural and environmental issues*. Simposio Internacional de Estadística. Santa Marta.
- ISO 8692. (1989). Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- ISO 6341. (1988) Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Strauss, Cladocera, Crustacea.
- Ministerio de Salud. (1984). Disposiciones sanitarias sobre aguas. Decreto 1594 del 26 de junio de 1984, Colombia.
- Proyecto CAR-BID-UN. (1995). Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores, Colombia.
- Roldán, G. (1992). *Fundamentos de limnología tropical*. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia, Colombia.
- Samitier, J. Unidad de Toxicología Experimental y Ecotoxicología (UTOX-PCB). Parc Científic de Barcelona. Universidad de Barcelona. En línea, febrero 2007.
- Ullmann. (1986). Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5ª Edición. Vol. A6.
- Universidad Nacional de Lujan. (1993). Ensayos toxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de la contaminación ambiental. Curso de postgrado. Laboratorio de ecotoxicología.
- Zagatto, P. (1988). Sensibilidad de *Daphnia similis*. Controle de qualidade de culturas. Ambiente. Vol. 2, núm. 2, pp. 79-82.