

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**Ciclo Optativo de Profesionalización en
Gestión de Calidad y Auditoría Ambiental**



**“ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DEL EFLUENTE DE
DESENCALE EN BIOENSAYOS CON *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* y
Chlorella vulgaris”**

Presentado por:

Edith Maricrijs Chagua Delgado

Lisbeth Milagros Morales Lavado

Trabajo de Titulación para Optar el Título de:

INGENIERO AMBIENTAL

Lima – Perú

2014

A Dios por darnos la fuerza y el conocimiento;
y a nuestras familias por ser quienes incondicionalmente
nos han apoyado y alentado para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Las autores expresan su reconocimiento a:

Nuestros padres y hermanos por su amor, soporte económico, confianza y apoyo, antes, durante y después la realización del trabajo de investigación.

A la empresa Helianthus S.A.C. por haber confiado en nosotras y por los aportes económicos y técnicos.

Al Mg. Quim. Lizardo Visitación Figueroa por su dedicación y el aporte de experiencias útiles aplicadas durante el estudio.

A la Ph. D. Lisveth Flores del Pino; Dra. Rosemary Vela Cardich; y Mg. Fermin Arévalo Ortiz por los consejos y correcciones al presente trabajo.

A Karina Ccapa Ramírez por su ayuda en la realización de los análisis en el laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

A nuestros amigos por las palabras alentadoras en los momentos difíciles, y por su demostración de confianza y afecto.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	
1.1.	OBJETIVO GENERAL.....	
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1.	INDUSTRIA DE CURTIDO.....	
2.1.1.	La industria de curtido en el Perú	
2.1.2.	Marco legal	
2.1.3.	Situación ambiental del sector curtiembre.....	
2.2.	DESENCALE DENTRO DEL PROCESO DE CURTIDO	
2.2.1.	Desencale dentro del proceso de curtido	
2.2.2.	Tipos de Desencale	
2.3.	EFFECTOS DE LOS EFLUENTES DE CURTIEMBRE.....	
2.3.1.	Efectos sobre los cuerpos de agua	
2.3.2.	Efectos sobre el alcantarillado y plantas de tratamiento de aguas residuales....	
2.3.3.	Efectos en las plantas y suelo	
2.4.	BIOENSAYOS TOXICOLÓGICOS.....	
2.4.1.	Bioensayos en <i>Daphnia magna</i>	
2.4.2.	Bioensayos en <i>Lactuca sativa</i>	
2.4.3.	Bioensayos con <i>Chlorella vulgaris</i>	
2.4.4.	Bioensayos de toxicidad en efluentes de curtiembre.....	
2.4.5.	Análisis Probit	
2.5.	ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP).....	
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	
3.1.	DELIMITACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL.....	
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS	
3.2.1.	Materiales y equipos para la preparación del efluente de desencale	
3.2.2.	Materiales y equipos para la toma de muestra y caracterización del efluente.....	16
3.2.3.	Materiales y equipos para bioensayos	17

3.3.	METODOLOGÍA.....
3.3.1.	Preparación del efluente de desencale.....
3.3.2.	Caracterización del efluente.....
3.3.3.	Realización de las pruebas toxicológicas.....
3.3.4.	Determinación del índice de efecto tóxico potencial (IETP).....
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS EFLUENTES.....
4.2.	BIOENSAYOS CON <i>Daphnia magna</i>
4.3.	BIOENSAYOS CON <i>Lactuca sativa</i>
4.4.	BIOENSAYOS CON <i>Chlorella vulgaris</i>
4.5.	DETERMINACIÓN DEL INDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IE
V.	CONCLUSIONES.....
VI.	RECOMENDACIONES.....
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....
VIII.	ANEXOS.....

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Valores máximos admisibles (VMA) y los límite máximo permisible (LM efluentes para aguas superficiales de la actividad del subsector curtiembre
Cuadro 2: Clasificación de la carga tóxica en función del Índice de Efectivos Tóxico Potenciales
Cuadro 3: Insumos utilizados en el proceso de desencale alternativo.....
Cuadro 4: Insumos utilizados en el proceso de desencale alternativo con recirculación.....
Cuadro 5: Insumos utilizados en el proceso de desencale químico o tradicional
Cuadro 6: Parámetros de monitoreo
Cuadro 7: Condiciones recomendadas para las pruebas con <i>Daphnia magna</i>
Cuadro 8: Condiciones recomendadas para las pruebas con <i>Lactuca sativa</i>
Cuadro 9: Condiciones recomendadas para la prueba con microalgas clorofíceas
Cuadro 10: Resultados del análisis de caracterización de los tres efluentes
Cuadro 11: Porcentajes de <i>Daphnia magna</i> inmovilizadas por la exposición al eflue DE-1 en 24 y 48 horas
Cuadro 12: Porcentajes de <i>Daphnia magna</i> inmovilizadas por la exposición al eflue DE-2 en 24 y 48 horas
Cuadro 13: Porcentajes de <i>Daphnia magna</i> inmovilizadas por la exposición al eflue DE-3 en 24 y 48 horas
Cuadro 14: Porcentaje de inhibición de la germinación, radícula e hipocotilo de <i>Lact. sativa</i> por la exposición al efluentes DE-1
Cuadro 15: Porcentaje de inhibición de la germinación, radícula e hipocotilo de <i>Lact. sativa</i> por la exposición al efluente DE-2.....
Cuadro 16: Porcentaje de inhibición de la germinación, radícula e hipocotilo de <i>Lact. sativa</i> por la exposición al efluentes DE-3
Cuadro 17: Porcentaje de índice de germinación de <i>Lactuca sativa</i> por la exposición tres efluentes
Cuadro 18: Porcentaje de estímulo de crecimiento del alga <i>Chlorella vulgaris</i>

Cuadro 19: Respuesta de inhibición <i>Chorella vulgaris</i> con la dilución 17%.....	
Cuadro 20: Resumen de las concentraciones efectivas de todos los efluentes.....	
Cuadro 21: Unidades tóxicas para todos los efluentes	
Cuadro 22: Índice de efecto tóxico potencial para todos los efluentes	
Cuadro 23: Porcentaje de <i>Daphnias magna</i> inmovilizadas al usar dicromato de potas ($K_2Cr_2O_7$) en 24 de exposición.....	
Cuadro 24: Porcentaje de <i>Daphnias magna</i> inmovilizadas al usar dicromato de potas ($K_2Cr_2O_7$) en 48 de exposición.....	
Cuadro 25: Porcentaje de inhibición de germinación de <i>Lactuca sativa</i> al aplicarles concentraciones de sulfato de zinc ($ZnSO_4$).....	
Cuadro 26: Porcentaje de inhibición en radícula de <i>Lactuca sativa</i> al aplicarles concentraciones de sulfato de zinc ($ZnSO_4$).....	
Cuadro 27: Porcentaje de inhibición de hipocotilo de <i>Lactuca sativa</i> al aplicarles concentraciones de sulfato de zinc ($ZnSO_4$).....	
Cuadro 28: Porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> al usar dicitrato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Flujograma del proceso de curtido.....	
Figura 2: Flujograma del proceso de desencale alternativo	
Figura 3: Flujograma del proceso de desencale alternativo con recirculación.....	
Figura 4: Flujograma del proceso de desencale tradicional o químico	
Figura 5: Botal donde se realizó el proceso de desencale.....	
Figura 6: Tanque donde se almacena y homogeniza el efluente de desencale	
Figura 7: Cultivo de <i>Daphnia magna</i> en laboratorio.....	
Figura 8: Daphnidos con menos de 24 horas de nacidos en el tubo de ensayo.....	
Figura 9: Concentraciones del efluente DE-3 (izquierda) y del control positivo (derec	
Figura 10: Concentraciones del efluente de desencale para <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 11: Colocación de las semillas de lechuga en la placa Petri	
Figura 12: Medición de la radícula e hipocotilo de <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 13: Frascos con <i>Chlorella vulgaris</i> en la cámara de incubación.....	
Figura 14: Muestras de <i>Chlorella vulgaris</i> filtradas.....	
Figura 15: Colocación de sustancias químicas para la determinación de clorofila a ...	
Figura 16: Curva Concentración-Respuesta de <i>Daphnia magna</i>	
Figura 17: Curva Concentración-Respuesta de <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 18: Curva Concentración-Respuesta de <i>Chlorella vulgaris</i>	
Figura 19: Carta control de <i>Daphnia magna</i> para 24 horas de exposición	
Figura 20: Carta control de <i>Daphnia magna</i> para 48 horas de exposición	
Figura 21: Carta control de Germinación de <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 22: Carta control de Radícula de <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 23: Carta control de Hipocotilo de <i>Lactuca sativa</i>	

Figura 24: Carta control de <i>Chlorella vulgaris</i>	
Figura 25: Botal donde se realizó el proceso de descalcificación.....	
Figura 26: Sacado de la piel después del proceso de descalcificación	
Figura 27: Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	
Figura 28: Diferencia de tamaño de los cultivos de <i>Daphnia magna</i>	
Figura 29: Concentraciones preparadas para el ensayo con <i>Daphnia magna</i>	
Figura 30: Inhibición de crecimiento (izquierda) y sin germinación (derecha)	
Figura 31: Crecimiento del hipocotilo y radícula de <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 32: Materiales usados para el bioensayo con <i>Lactuca sativa</i>	
Figura 33: Tratamientos del efluente DE-2 y control +	
Figura 34: Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en la cámara de incubación	

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CONTROL POSITIVO PARA <i>Daphnia magna</i>
ANEXO 2: CONTROL POSITIVO PARA <i>Lactuca sativa</i>
ANEXO 3: CONTROL POSITIVO PARA <i>Chlorella vulgaris</i>
ANEXO 4: ANÁLISIS DE LA PRECIPITACIÓN DEL HIDROXIDO DE CROMO (Cr(OH) ₃).....
ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA <i>Daphnia magna</i>
ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA <i>Lactuca sativa</i>
ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA <i>Chlorella vulgaris</i>
ANEXO 8: RESULTADOS DE <i>Daphnia magna</i>
ANEXO 9: RESULTADOS DE <i>Lactuca sativa</i>
ANEXO 10: RESULTADOS DE <i>Chlorella vulagris</i>
ANEXO 11: GALERÍA FOTOGRÁFICA

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue analizar los efectos tóxicos producidos por el efluente de desengale proveniente de tres procesos de curtido (alternativo DE-1, alternativo con recirculación DE-2, y tradicional DE-3), para lo cual se usó bioensayos de inmovilización de *Daphnia magna*, inhibición de *Lactuca sativa*, e inhibición de crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

Los bioensayos se realizaron siguiendo el Protocolo de Ensayos Agudos en Lugares con Residuos Tóxicos (EPA 600/3-88/029) de la USEPA, (1986); y se obtuvieron las concentraciones efectivas 5, 10 y 50 (CE₅, CE₁₀ y CE₅₀) para cada bioensayo a partir de curvas de concentración-respuesta, éstas se obtuvieron mediante el ajuste de los resultados de los bioensayos (programa Probit).

En los tres bioensayos, el efluente DE-3 generó mayores efectos tóxicos siendo la CE₅₀ para inmovilización de *D. magna* 6.75% en 48 horas, para inhibición de germinación de *L. sativa* 20.10 % en 120 horas; y para inhibición de crecimiento de *C. vulgaris* 92.42% en 96 horas. Este último valor se calculó teniendo como referencia la menor concentración evaluada y no el blanco, porque para los tres efluentes no hubo inhibición de crecimiento de *C. vulgaris* sino estimulación, esto debido a la alta cantidad de nutrientes esenciales como nitrógeno y materia orgánica. El Índice de Efecto Tóxico Potencial (IETP) se determinó con la CE₅ y CE₁₀, resultando una carga toxica mayor en DE-3 en comparación a DE-1 y DE-2.

En conclusión, el análisis de los efectos tóxicos producidos por los tres efluentes de desengale a través de bioensayos, estableció que DE-3 tenía la mayor carga tóxica y que por tanto si éste fuese vertido a un cuerpo de agua se debería priorizar las acciones correctivas en dicho efluente. Así también, a pesar que los tres efluentes sobrepasaron los valores de los LMP para aguas superficiales del subsector curtiembre, estos presentaron una carga tóxica despreciable (IETP <1.99), con lo que se prueba que el comportamiento individual de cada parámetro difiere del impacto que puede ocasionar unido a otros parámetros o factores.

I. INTRODUCCIÓN

La tecnología de fabricación del cuero requiere varios pasos de procesamiento, con adiciones secuenciales de productos químicos, intercalados por lavados y procesos mecánicos. Este proceso se divide en cuatro fases de trabajo: pre-tratamiento y almacenamiento, ribera, curtido y acabado. Dentro de la fase de curtido se encuentra el desencalado, donde se busca eliminar la cal y productos alcalinos del interior del cuero, para lo cual se usan disoluciones acuosas de ácidos para neutralizar la piel. Las cargas contaminantes más importantes de esta operación son los sulfuros aplicados en el pelambre y el nitrógeno amoniacal debido al sulfato de amonio (CPTS, 2003).

La industria del cuero en el Perú está conformada principalmente por microempresas, siendo la mayoría informales, y solo el cincuenta por ciento del cuero que se curte en el país lo hacen las empresas formales (Miller *et al.*, 1999); lo que ha resultado en menos ingresos económicos para el gobierno, menos protección y seguridad para el trabajador, y una mayor contaminación con serias consecuencias para el ambiente y la salud pública (MINTICI, 2002).

Las regulaciones ambientales de nuestro país, como los Límites Máximos Permisibles y Los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental, buscan proteger el ambiente, pero estos parámetros físico-químicos no siempre son suficientes para reducir la concentración de contaminantes. Con el fin de mejorar la calidad del agua y garantizar la supervivencia de todos los organismos acuáticos, también debería exigirse la calidad sobre las características ecotoxicológicas, para así proteger la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos (Silva *et al.*, 2009), ya que estudios muestran la poca relación directa entre la toxicidad aguda y los parámetros físico-químicos (Nieto, 2003).

Los bioensayos son procedimientos apropiados para la evaluación de la toxicidad de sustancias complejas presentes en las aguas residuales; la biota de similar o diferente nivel trófico tiene diferentes respuestas de toxicidad, siendo que las similitudes proporcionan una mayor seguridad de los efectos o no efectos de un efluente, y el tener respuestas diferentes indica que la toxicidad puede existir para algunas especies y no para otras (Burton *et al.*, 2001), por lo que es adecuado tener una batería de organismos de

bioensayos para determinar los efectos tóxicos de contaminantes vertidos al ecosistema (Sánchez *et al.*, 2007).

Según Bohórquez y Campos (2007), los bioensayos son importantes porque son una herramienta de caracterización, detección, y evaluación del potencial tóxico de las mezclas complejas presentes en las aguas residuales. Por tanto, la toxicidad de un efluente no puede ser entendida, ni explicada, solamente por el análisis de las concentraciones de sustancias o parámetros individuales, porque algunas sustancias pueden ser muy tóxicas en forma aislada pero su efecto tóxico puede estar mitigado o aumentado, dando origen a acciones antagónicas y/o sinérgicas, cuando se encuentren formando parte de un efluente debido a la interacción con otros componentes físicos y/o químicos (Sáenz *et al.*, 2003 y Di Marzi, 2005).

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Analizar los efectos tóxicos producidos por el efluente proveniente del desencale de tres procesos de curtido (alternativo, alternativo con recirculación y tradicional) a través de bioensayos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el efluente de desencale de tres procesos de curtido y analizar las concentraciones de los contaminantes.
- Analizar la toxicidad aguda del efluente de desencale de tres procesos de curtido, mediante bioensayos con *Daphnia magna* a 48 horas; *Lactuca sativa* a 120 horas; y *Chlorella vulgaris* a 96 horas de exposición en condiciones de laboratorio, para determinar la carga tóxica de los efluentes a través del IETP.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. INDUSTRIA DE CURTIDO

El curtido es un conjunto de operaciones físico-químicas, que mediante el adecuado uso de productos químicos y un proceso que consiste en reforzar la estructura proteica de la piel creando un enlace entre las cadenas de péptidos, convierte a la piel en un material durable e imputrescible.

En general, las principales etapas o procesos industriales involucrados en el proceso de curtido son las siguientes: pre-tratamiento y almacenamiento, ribera, curtido y acabado (MINTICI, 2002). Existen algunas variaciones según sea el tipo de piel, la tecnología disponible y las características finales a conseguir en el cuero. Las principales proceso de ribera y curtido se realizan en grandes recipientes cilíndricos de madera llamados fulones, en donde se introducen las pieles, el agua y los reactivos químicos. En la Figura 1 se presenta un flujograma basado en CPTS (2003), donde se detallan los insumos y residuos en cada proceso.

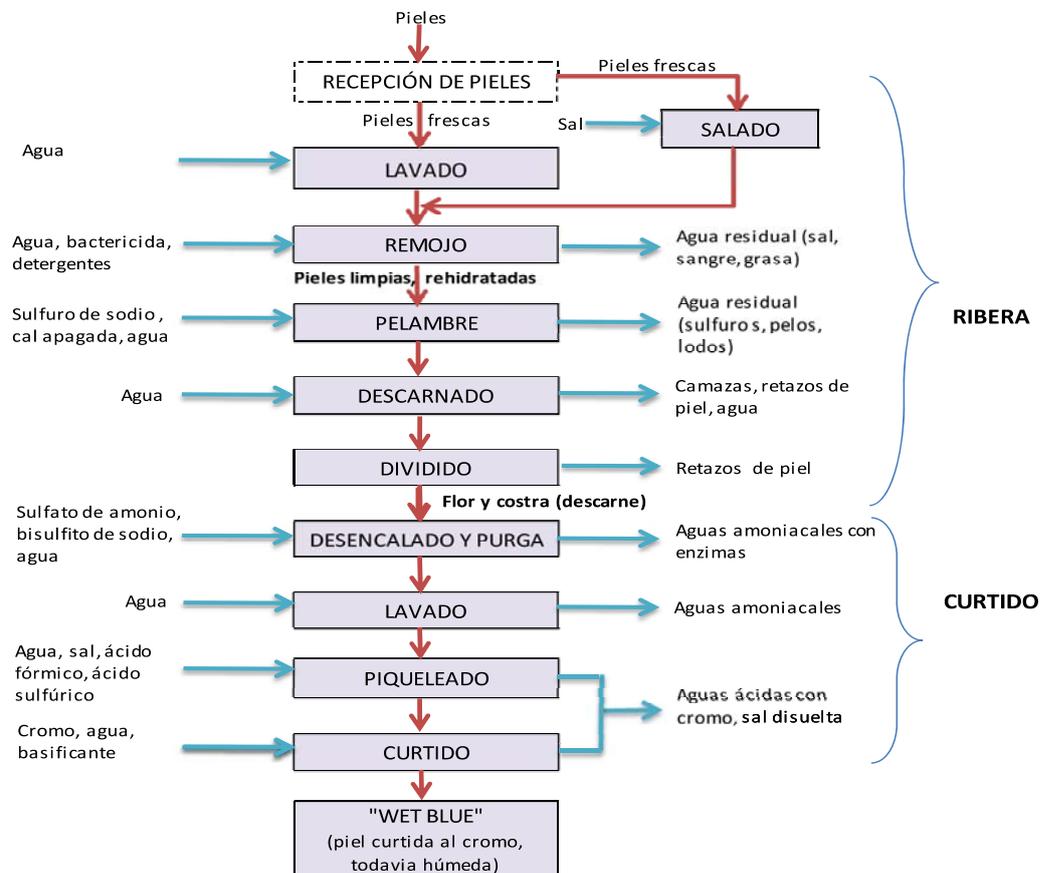


Figura 1: Flujograma del proceso de curtido

2.1.1. La industria de curtido en el Perú

La industria del cuero en el Perú durante el siglo XX se encontraba en estado crítico, ya que muchas curtiembres formales cerraron y reaparecieron como curtiembre informales, además muchas de las formales, alquilaban sus servicios a curtidores informales como medio para generar ingreso. Ante tal hecho en 1998 se crea el Centro de Innovación Tecnología del Cuero, Calzado e Industrias Conexas (CITEccal), para brindar servicios de tecnología, desarrollo e innovación y así poder frenar el informalismo.

En la actualidad, la creciente tendencia hacia el informalismo en las curtiembres del Perú ha resultado en menos ingresos económicos para el gobierno, menos protección y seguridad para el trabajador, y una mayor, ampliamente dispersa, contaminación con serias consecuencias para el ambiente y la salud pública (MINTICI, 2002).

Las empresas de curtido registradas en setiembre del año 2000 sumaban 438, de las cuales: el 30.1% se concentraba en Lima, el 29.5% en Arequipa, el 24.2% en la Libertada, el 3.2% en Cuzco, el 2.7% en Junín y el 10.3% en el resto del país. En el año 1999, el 89.2% correspondía a microempresas, 5.1% a pequeñas, 4.0% a medianas y el 1.7% a grandes empresas. (MITINCI, 2002).

2.1.2. Marco legal

Los efluentes del sector curtiembre en el Perú tienen que cumplir la normativa de los límites máximos permisibles y valores referenciales para las actividades industriales de cemento, cerveza, curtiembre y papel (D.S. N°003-2002-PRODUCE del 4 oct 2002); y los valores máximos admisibles de las descargas de aguas residuales no domésticas al sistema de alcantarillado sanitario (D.S. N°021-2009-VIVIENDA del 20 nov 2009) (Ver Cuadro 1).

Cuadro 1: Valores máximos admisibles (VMA) y los límite máximo permisible (LMP) de efluentes para aguas superficiales de la actividad del subsector curtiembre

PARÁMETROS	VMA	LMP-Aguas Superficiales
pH	6.0-9.0	5.0-8.5
Temperatura (°C)	<35	35
Sólidos Susp. Tot. (mg/l)	500	30
Aceites y Grasas (mg/l)	100	20
DBO ₅ (mg/l)	500	30
DQO (mg/l)	1000	50
Sulfuros (mg/l)	5	0,5
Cromo VI (mg/l)	0.5	0.2
Cromo Total (mg/l)	10	0.5
Coliformes Fecales (NMP/100ml)	-	1000
Nitrógeno amoniacal N-NH ₄ (mg/l)	80	10

Fuente: D.S. N°003-2002-PRODUCE y D.S. N°021-2009-VIVIENDA

2.1.3. Situación ambiental del sector curtiembre

El daño al medio ambiente ocasionado por el efluente de la curtiembre se está convirtiendo en un grave problema en muchos países donde esta industria es una de las principales fuentes de ingreso, tal es el caso de la India. Aguas residuales de curtiembre se caracterizan principalmente por la alta salinidad, alta carga orgánica y contaminantes específicos tales como el cromo (Colak *et al.*, 2005).

Según Rao citado por Baleeiro (2007), la industria de curtición presentan el siguiente consumo de agua para procesar una tonelada de pieles: remojo = 9-12 m³, encalado = 4-6 m³, desencalado = 1.5-2 m³, piquelado = 1-1.5 m³, curtido al cromo = 1-2 m³, es decir, un consumo total de 16.5 a 23.5 m³ en estos pasos. Además se consume un promedio de 630 litros de agua por piel procesa en un curtido integrado (produce cuero acabado de la piel salada). Sobre esta base, una curtidora, que procesa 3.000 pieles al día consumiría aproximadamente 1 900 m³ de agua al día (Pacheco citado por Faria, 2010)

El desencale es parte del proceso de curtiembre y las cargas de contaminantes más importantes de esta operación se encuentran en el efluente líquido. Desde el punto de vista ambiental, la presencia de amonio en la descarga líquida es indeseable. Generalmente, el efluente líquido del desencale arrastra el 3 y 5 por ciento de sulfuros aplicado en el pelambre y contiene nitrógeno amoniacal a causa del sulfato de amonio. El uso del bisulfito ayuda a eliminar gran parte de este sulfuro (CPTS, 2003).

Según Zárate *et al.*, (1993) si el desengale se realiza con dióxido de carbono (CO₂) y con una pequeña cantidad de sulfato de amonio (0.3 a 0.8%), la carga de nitrógeno en el efluente líquido fluctúa entre 0.6 y 1.7 kg de nitrógeno amoniacal/t piel. Si el desengale es llevado a cabo con esteres o ácidos orgánicos débiles, la DQO puede estar entre 15 a 35 kg/t piel. Por tanto la cantidad de nitrógeno amoniacal presente el efluente líquido va depender del tipo de desengalente que se usa en el proceso. Así también, conforme varíe el proceso de curtido, la cantidad de contaminantes y el volumen del efluente de desengale va a variar de una curtiembre a otra.

2.2. DESENGALE DENTRO DEL PROCESO DE CURTIDO

2.2.1. Desengale dentro del proceso de curtido

La piel debe ser acondicionada antes de ser sometida a la operación de curtido. Este acondicionamiento comprende las operaciones de desengale y purgado. En el Perú, estas dos operaciones pueden realizarse en forma sucesiva o simultánea en el mismo baño de desengale.

Esta parte del proceso se debe realizar eficientemente, sino puede ocasionar problemas como: el aumento de basicidad en la curtición al cromo, crispación de la flor, toque duro o acartonado, soltura de flor, quiebre de flor. Por otra parte si no se logra un deshinchamiento suficiente puede generar una sobre curtición de flor, un curtido muy turgente, un cuero inelástico y quebradizo (Cueronet, 2000).

El objetivo del desengale es remover la cal que fue agregada durante la operación de pelambre, la cual se encuentra en la piel en tres formas: combinada con la misma piel, disuelta en los líquidos que ocupan los espacios interfibrilares y depositados en forma de lodos sobre las fibras, o como jabones cálcicos formados por la saponificación de las grasas en la operación de pelambre. Parte de la cal es eliminada por el lavado con agua y luego por medio de ácidos débiles, o por medio de sales amoniacaes (sulfato de amonio o cloruro de amonio) o de sales ácidas (bisulfito de sodio). Los agentes químicos de desengale dan sales ácidas solubles de fácil eliminación con agua y no deben producir efectos de hinchamiento sobre el colágeno. Además el desengale permite neutralizar la piel, detener su hinchamiento y remover el sulfuro remanente (CPTS, 2003).

2.2.2. Tipos de Desencale

a. Desencale tradicional o químico

El desencale se inicia con dos lavados, que es el inicio de la eliminación de la cal solo con agua, luego de éstos lavados, se procede al desencale propiamente dicho, donde la cal será eliminada por medio de ácidos débiles, sales amoniacales (sulfato de amonio o cloruro de amonio) o sales ácidas (bisulfito de sodio).

Se realiza un control con el indicador de fenolftaleína, que debe dar una coloración incolora al ser agregado (unas gotas) al corte de la piel, si da una tonalidad violeta significa que la piel todavía contiene cal. Si el control es incoloro se procede con el purgado, donde se debe eliminar las proteínas no colágenas, incluyendo algunas raíces de pelo remanente en la piel, a fin de mejorar la textura del cuero, para logra ello, las pieles serán tratadas con enzimas pancreáticas y/o bacteriales, con la finalidad de que la piel esté constituida de solo proteína colágena, para aumentar considerablemente la elasticidad del cuero. Para que las enzimas de la solución de purga tengan máxima actividad, el pH debe ser ajustado a un valor óptimo (8.0 a 8.5) con las mismas sales utilizadas para el desencale (sulfato o cloruro de amonio) (Zárate *et al.*, 1993). Y para el lavado final del desencale se usa el nonil fenol 6, para humectar la piel y que esté preparada para el curtido propiamente dicho.

b. Desencale alternativo

A este desencale se le domina así porque durante todo el proceso de curtido se va reemplazar químicos por enzimas y/u otros químicos con menos carga contaminante. Así tenemos que, después de los dos lavados propios de este proceso, se procede al desencale, donde se trabaja sin baño o con lo que queda del escurrido, al cual se le agrega 0.05% de un desengrasante biodegradable y luego se agrega un complejante de calcio con baja cantidad de nitrógeno. También se usa enzimas pancreáticas y/o bacteriales, como en el proceso tradicional para aumentar la elasticidad del cuero. Y finalmente para terminar con el lavado final se agregará el humectante, así tener la piel lista para el siguiente proceso.

2.3. EFECTOS DE LOS EFLUENTES DE CURTIEMBRE

2.3.1. Efectos sobre los cuerpos de agua

Cuando se descarga aguas residuales directamente a un cuerpo de agua se ocasionan efectos negativos en la vida acuática y los usos posteriores de estas aguas. Un cuerpo de agua contaminado disminuye el valor de uso como bebida o para fines agrícolas e industriales. Afectan la vida acuática, mueren los peces por la disminución del oxígeno disuelto y el agua se convierte en no apta para consumo. Por otra parte, si su uso es indispensable, los costos de tratamiento se tornan muy altos. Fundamentalmente y en forma resumida, los componentes específicos que causan problemas en los cursos de agua son cromo, sulfuros y carga orgánica.

En el caso de las aguas subterráneas, su combinación es más problemática y persistente porque su autodepuración es lenta debido a que no presenta corrientes que le confieren una adecuada aeración. Esto se agrava cuando es la única fuente de abastecimiento de agua para la población. Los efluentes no tratados de curtiembre ocasionan salinidad en las aguas subterráneas debido a la alta concentración de cloruros (Zárate *et al.*, 1993).

2.3.2. Efectos sobre el alcantarillado y plantas de tratamiento de aguas residuales

Los efluentes crudos de curtiembre, vertidos a una red de alcantarillado, provocan incrustaciones de carbonato de calcio y gran deposición de sólidos en las tuberías, y los sulfatos aceleran el deterioro de materiales de concreto y cemento.

Si la carga contaminante presenta sustancias tóxicas como cromo, y es vertido a una planta de tratamiento, puede interferir con el proceso biológico de la planta. En lugares donde no existen plantas de tratamiento, estos contaminantes afectan la calidad del cuerpo receptor causando su deterioro. Los residuos líquidos de curtiembre que son descargados sin tratamiento a cuerpos de agua provoca una drástica disminución de oxígeno disuelto en ella por el sulfuro, además de los fenómenos de embaucamiento por sólidos totales el aumento de materia orgánica general, más la presencia indeseada de cromo trivalente (Zárate *et al.*, 1993).

2.3.3. Efectos en las plantas y suelo

Según Oliveria *et al.*, (2007) la presencia de metales pesados en las aguas residuales industriales y urbanas es una de las principales causas de la contaminación del agua y del suelo. La contaminación del suelo por metales es esencialmente diferente de la contaminación del aire o el agua debido a que la persistencia de los metales pesados en el suelo es aparentemente mucho más tiempo que en otros compartimentos de la biosfera. La eliminación de metales pesados del suelo contaminado es difícil. Una vez depositado en el suelo ciertos metales tales plomo y cromo puede ser casi permanente (Okeyode y Moshood, 2010).

Por ende, el suelo tiene cierta capacidad para neutralizar la carga contaminante recibida. A sí también, la descarga de un efluente tratado puede ser beneficiosa para la irrigación de un terreno agrícola. Sin embargo, los niveles de contaminación deben ser cuidadosamente controlados para evitar el daño de la estructura del suelo, y la consecuente disminución de la producción agrícola y aceleración de la erosión. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que la recuperación de un terreno deteriorado demanda un periodo largo de tiempo. Tan solo el riego reiterado con un efluente rico en cloruro de sodio daña la vegetación debido a que el ión cloruro es fitotóxico. Por otra parte el ión sodio también es perjudicial al dañar la estructura del suelo porque desintegra las arcillas afectando la porosidad del mismo (PNUMA y OMS, 1991).

2.4. BIOENSAYOS TOXICOLÓGICOS

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.

En los últimos veinticinco o treinta años, se han utilizado ensayos de toxicidad con organismos de aguas continentales y terrestre, tanto en condiciones de laboratorio, como de campo, con el objeto de evaluar y reconocer los efectos de xenobióticos sobre la biota acuática y terrestre, 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 Standarization), WHO (Word 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 y terrestre (Escobar, 2008).

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 (Castro, 2002).

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 de toxicidad (Castro, 2002).

2.4.1. Bioensayos en *Daphnia magna*

Dentro de los organismos comúnmente utilizados en los bioensayos de toxicidad se encuentran los cladóceros, también llamados pulgas de agua, son crustáceos pequeños que constituyen la mitad de la Clase Branchiopoda. El caparazón (bivalvo) encierra al tronco, pero no a la cabeza y suele terminar posteriormente en una espina apical. La cabeza porta un sólo ojo nauplio mediano, también posee antenas frecuentemente largas y utilizadas en la natación. Además, presenta de cuatro a seis pares de apéndices troncales y el pots abdomen esta girado ventralmente hacia delante. La mayoría de estos organismos son pálidos y transparentes y viven casi exclusivamente en agua dulce (Hernández y Espinoza, citado por Burga 2006).

Los ensayos con *Daphnia magna*, son una herramienta valiosa para las evaluaciones predictivas y la clasificación de efluentes, ya que son de fácil acceso, económico y sobre todo sensibles (Adema citado por Martins *et al.*, 2007).

Dentro del grupo de los cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia

distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta), y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, a nivel universal (Díaz *et al.*, 2004).

2.4.2. Bioensayos en *Lactuca sativa*

Es una prueba estática de toxicidad de toxicidad aguda (120 h de exposición) donde se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas (aguas residuales) en el proceso de germinación de las semillas de lechuga.

En este bioensayo se determina la inhibición en la germinación y en la elongación de la raíz y el hipocotilo de la planta, ya que estos últimos constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. A diferencia de los ensayos tradicionales de germinación de semillas, la evaluación del efecto de la elongación en la radícula y el hipocotilo de las plantas de lechuga, permite examinar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir el proceso de crecimiento de la radícula o el hipocotilo. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales (Sobrero y Ronco 2004).

Si bien *Lactuca sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, ni tampoco es una especie nativa o naturalizada en nuestros ambientes, la información generada a partir de este ensayo de toxicidad proporciona datos sobre el posible efecto de los contaminantes sobre las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, como su importancia desde el punto de vista hortícola. El ensayo de toxicidad con semillas de lechuga es de muy bajo costo, simple ejecución y no requiere del uso de equipamiento costoso o sofisticado para la evaluación de los puntos finales de toxicidad (Sobrero, 2010).

2.4.3. Bioensayos con *Chlorella vulgaris*

Las especies de *Chlorella* son algas unicelulares muy simples, fáciles de cultivar y ampliamente usadas en estudios ecofisiológicos (Wu *et al.* citado por Aguirre *et al.*, 2007).

Las algas unicelulares son importantes productoras de oxígeno y son la comida básica de la red trófica en los ecosistemas marinos. Las especies algales son sensibles a los cambios ambientales y su crecimiento podría ser inhibido (efecto tóxico) o estimulado (efecto trófico) por la presencia de contaminantes (USEPA, 1986 y Carballeira *et al.*, 2012).

Esta prueba con algas se basa en la determinación de los efectos inhibitorios sobre la tasa de crecimiento poblacional que se pueden producir en muestras de agua o en efluentes con o sin tratamiento. Este ensayo se fundamenta en que una población microalgal, cuando se encuentra en condiciones propicias para su desarrollo, es capaz de aumentar su tamaño de población, por lo que en esas condiciones es posible detectar si los productos problema o muestras a analizar producen inhibición en la tasa de crecimiento poblacional. Las microalgas, como componentes del fitoplancton, constituyen el grupo de productores primarios que son fundamentales en todos los ecosistemas acuáticos, ya que determinan la productividad de los mismos y permiten el desarrollo de consumidores de diferente nivel trófico. Es por ello que resulta importante evaluar los efectos sobre este grupo de organismos. Siendo la tasa de crecimiento una respuesta sensible y fácil de monitorear, se puede evaluar la disminución de dicha respuesta como un indicador del estrés al cual están sujetas las poblaciones de microalgas (Martínez, 2008).

2.4.4. Bioensayos de toxicidad en efluentes de curtiembre

En el estudio de caracterización ecotoxicológica del agua residual de curtido en Dhaka, Bangladesh en plantas (*Lactuca sativa*), microcrustacios (*Daphnias magna*) y en bacterias (*Vibrio fischeri*), se encontró evidencia biológica de que las aguas residuales de curtiduría en el área de Hazaribagh presenta efectos perjudiciales amplios en los ecosistemas acuáticos y organismos terrestres, lo que a su vez destruyen el ecosistema. Además este trabajo de investigación recomienda que es necesario realizar una Evaluación de Identificación de Toxicidad (TIE), en la que se combine los ensayos químicos y biológicos de las sustancias tóxicas, para obtener un alcance del impacto ecotoxicológico de los cuerpos de aguas residuales de curtiembre (Arias *et al.*, 2010).

Otro estudio realizado en *Ceriodaphnia dubia*, mostró que a concentraciones bajas del efluente total de curtiembre (0.2 y 0.4 ml/l) no se afectó significativamente la sobrevivencia, ni el número de neonatos y ni de camadas, indicando que el efluente no sería tóxico en estas concentraciones. Las concentraciones intermedias (0.6 y 0.8 ml/l) tuvieron un marcado efecto negativo mientras que las concentraciones altas (1.0 a 1.8 ml/l) afectaron de forma muy significativa. Hubiera sido imposible predecir los efectos biológicos registrados del efluente a partir de análisis químicos únicamente (Ceresoli y Gagneten, 2003).

Sáenz *et al.*, (2003) realizó un estudio donde expuso a poblaciones algales de *Scenedesmus quadricauda* a concentraciones del efluente iguales y superiores al 3 % del efluente de curtidos de cuero, y presentaron una inhibición significativa de las tasas de crecimiento respecto de las poblaciones controles. Las poblaciones incubadas en presencia de 50% y 100 % del efluente presentaron una inhibición total del crecimiento desde el inicio de la evaluación. Y para el caso de *Raphidocelis subcapitata* las poblaciones algales expuestas a concentraciones iguales y superiores a la menor concentración ensayada (3.1 %) presentaron una disminución significativa en las tasas de crecimiento respecto a las poblaciones controles. Además, no se registró crecimiento algal en las poblaciones expuestas a concentraciones mayores e iguales al 25 % del efluente.

2.4.5. Análisis Probit

La CE_{50} determina la concentración efectiva media de una sustancia de ensayo que causa una respuesta en el 50 por ciento de los organismos de ensayo, dentro de un periodo de exposición establecido; en otras palabras se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias. La determinación de la CE_{50} requiere de la estadística cuantil, para lo cual es necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas (Burga, 2006).

El Programa Probit de la USEPA (U.S.A Environmental Protection Agency), determina la CE_{50} de sustancias conocidas, empleando los principios anteriormente mencionados, ingresando los resultados de los bioensayos tales como: concentraciones a las que fueron sometidas la especie test, número de individuos expuestos, número de individuos que respondieron al estímulo e información sobre el grupo control. El

programa genera los valores de CE_{50} , los límites de confianza y realiza el test de bondad de ajuste mediante el estadístico Ji - cuadrado (X^2), en este caso la hipótesis nula es que la línea Ldp (Línea dosis-Probit) es un modelo adecuado de los datos (Martínez y Osorio, 1995).

2.5. ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP)

El IETP fue desarrollado por Blaise y Férard, citado por Carballeira *et al.*, 2012 que proporciona datos completos de pruebas biológicas, ya que esos datos son normalmente dispersos y difíciles de encontrar. El índice permite la evaluación y la comparación de la toxicidad potencial de los efluentes de aguas residuales como un único valor numérico que integra tanto su potencial tóxico (determinado por una batería de bioensayos a pequeña escala que representa diferentes niveles biológicos y tipos de efectos tóxicos) y su flujo.

Este índice es apropiado para la evaluación de los efluentes de desecale que tienen relativamente baja toxicidad. El IETP se calcula por lo general con los valores de NOEC y LOEC, que no se pueden obtener siempre (Isnard citado por Carballeria *et al.*, 2012) por lo que también se puede calcular con los valores CE_x o CE_y .

Los parámetros toxicológicos son transformados primero en unidades tóxicas (UT), mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$UT = \frac{C}{CE_x}$$

Donde

-C: concentración máxima del efluente utilizado

- CE_x : Concentración efectiva a X%

Luego se calcula el IETP con la siguiente fórmula:

$$IETP = \text{Log}_{10} \left[1 + n \left(\sum \frac{T_i}{N} \right) Q \right]$$

Donde

- $[n (\sum T_i / N)]$: impresión tóxica

- $[n (\sum Ti / N) Q]$: la carga tóxica
- n: número de bioensayos que exhiben una respuesta tóxica
- Ti: número de UT generada por cada bioensayo (i) en las muestras de los efluentes
- N: número máximo de respuestas medibles
- Q: caudal de los efluentes (m³/h)

Obtenido el valor del IETP se clasifica según el Cuadro 2 (Escobar, 2008).

Cuadro 2: Clasificación de la carga tóxica en función del Índice de Efectivos Tóxico Potenciales

Clasificación de Carga Tóxica	Valor IETP
Carga tóxica DESPRECIABLE	< 1.99
Carga tóxica REDUCIDA	2-2.99
Carga tóxica MODERADA	3-3.99
Carga tóxica CONSIDERABLE	4-4.99
Carga tóxica ELEVADA	>5

Fuente: Escobar, 2008

III. MATERIALES Y METÓDOS

3.1. DELIMITACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL

El trabajo se llevó a cabo en cuatro etapas. En la primera, se elaboró los tres tipos de efluentes en la empresa Helianthus S.A.C. En la segunda etapa se muestreo y se hizo los análisis de caracterización en el Laboratorio de Análisis Químicos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). En la tercera etapa, se realizó los bioensayos con las especies de *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* y *Chlorella vulgaris* en el Laboratorio de Tesis de Química. Y finalmente en la cuarta etapa, se generaron los datos para evaluar los efectos tóxicos y así determinar el IETP para cada efluente

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. Materiales y equipos para la preparación del efluente de desengale

- Reactivos con marca registrada:
 - SOLVTAN B CAP EXP
 - TANZYME P 10
 - TANPLEX FLA
 - SOLVGRAX TAN
- Reactivos:
 - Nonil fenol
 - Bisulfito de sodio
 - Sulfato de amonio
- Agua
- Maquinaria: Botal de madera

3.2.2. Materiales y equipos para la toma de muestra y caracterización del efluente

- Materia prima: efluentes de desengale
- Reactivos:
 - ácido sulfúrico (H₂SO₄)

- ácido nítrico (HNO_3)
- Materiales de toma de muestra:
 - Botellas de plástico de boca ancha de 1 litro,
 - Botellas de vidrio de boca ancha de 1 litro
 - Guantes de látex desechables
- Equipos:
 - pH-metro serie: 09340800, modelo: lab 850, marca: SCHOTT
 - Conductímetro serie: 10250166, modelo: lab 960, marca SCHOTT
 - Termómetro manual marca BOECO
 - Oxímetro serie: 11320126, modelo: hendylab OX 12, marca: SCHOTT

3.2.3. Materiales y equipos para bioensayos

- Agentes biológicos:
 - *Daphnia magna*
 - *Lactuca sativa* variedad mantecosa
 - *Chlorella vulgaris*
- Reactivos de referencia:
 - Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
 - Sulfato de zinc (ZnSO_4)
- Reactivos:
 - Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
 - Sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Cloruro de potasio (KCl)
- Medio de cultivo para algas:
 - Nitrato de sodio (NaNO_3)
 - Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
 - Fosfato mono básico de potasio (KH_2PO_4)
 - Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)
 - Cloruro de sodio (NaCl)

- Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),
 - Ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido bórico (H_3BO_3)
 - EDTA
 - Hidróxido de potasio (KOH)
 - Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
 - Cloruro de manganeso tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
 - Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
 - Nitrato de cobalto hexahidratado [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
- Equipos:
 - Balanza analítica serie: 10961226040690, modelo: Aventurer, marca: OHAUS
 - Bomba de oxigenación marca: RAKASD, modelo: SB-108
 - Espectrofotometría serie: 2M6G050002, modelo: Genesys 6, marca: TERMO SPECTRONIC
 - Centrifuga serie: 20A5467, modelo: Mikro 22R, marca: HETTICH
 - Sistema de filtrado al vacío
- Modulo básico de química
- Materiales adicionales:
 - Colador
 - Gotero
 - Baldes de 5 litros
 - Bolsas plásticas
 - Papel milimetrado
 - Ligas
 - Fluorescentes Philips de 40W con 2500 lumen

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Preparación del efluente de desengrase

La elaboración de los tres efluentes de desengrase se realizó en las instalaciones de la empresa Helianthus S.A.C. siguiendo las formulaciones recomendadas por esta empresa. A continuación se describe la elaboración y la cantidad de insumos usados en cada uno de los tres efluentes.

a. Desengrase alternativo (DE-1)

En este tipo de desengrase se reemplazaron productos químicos por otros químicos con menos carga tóxica. Primero se realizó dos lavados con agua a 28°C durante 20 minutos cada uno, luego se procedió al escurrido del efluente. Después del segundo lavado se agregó el desengrasante biodegradable SOLVGGRAX TAN y el desengraseante TAMPLEX FLA. Para controlar el contenido de cal en la piel se utilizó el indicador fenolftaleína, si al agregar unas gotas de este indicador al corte de la piel, este presentaba una tonalidad violeta, significaba que la piel aún contenía cal, por tanto se daba más tiempo al lavado para sacar la cal de la piel, pero si la tonalidad era incolora se procedía a agregar la enzima TANZYME P 10 para aumentar la elasticidad del cuero y el desengrasante SOLVTAN B CAP EXP para humectar el cuero. En el lavado final se agregó solo agua a temperatura ambiente y tuvo una duración de 20 minutos, del cual solo se escurrió el 60% y el 40% se dejó para continuar con el proceso de curtido.

En el Cuadro 3 se detallan los porcentajes y propiedades de los insumos usados en este proceso y en la Figura 2 la parte del proceso en la que se agregaron.

Cuadro 3: Insumos utilizados en el proceso de desengale alternativo

Insumo	Denominación química	Porcentaje usado	Propiedad
SOLVGRAX TAN	Tensoactivo aniónico y no aniónico.	0.05	Desengrasante
TANPLEX FLA	Complejo de calcio libre de nitrógeno	1.70	Desengalante, acomplejante de cal
TANZYME P 10	Enzima microbiana	0.12	Facilita la elasticidad del cuero
SOLVTAN B CAP EXP	Asociación de tensoactivos aniónicos y no iónicos	0.05	Desengrasante
AGUA A 28 °C		200	Lavado
AGUA A T° AMBIENTE		100	Lavado Final

Fuente: Elaboración propia

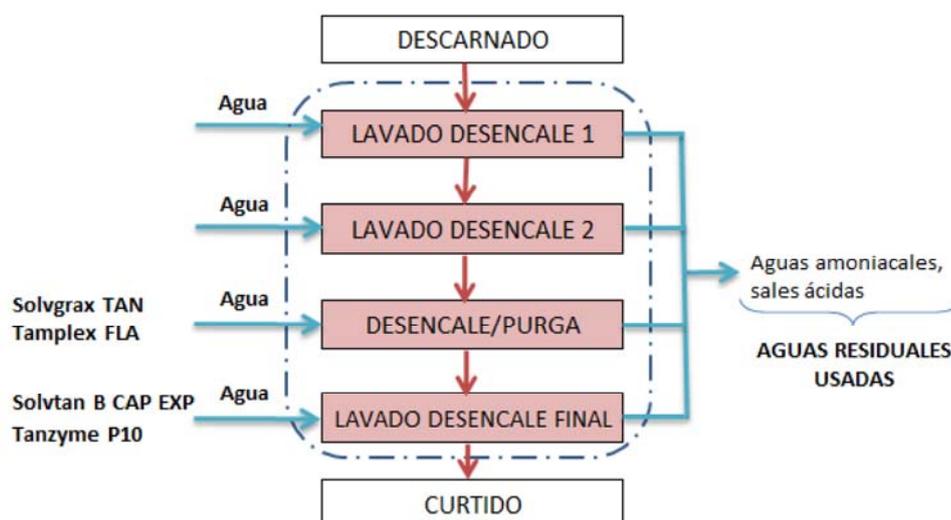


Figura 2: Flujograma del proceso de desengale alternativo

b. Desengale alternativo con recirculación (DE-2)

El proceso fue semejante al desengale alternativo (DE-1), solo que para el lavado final (antes del proceso de curtido) se usó el baño de curtido del proceso alternativo anterior, llevándose a cabo este lavado por 20 minutos, luego se escurrió el 60% y se dejó el 40% del agua para dar inicio al proceso de curtido propiamente dicho. Los porcentajes de insumos usados y los momentos en que se añadieron se muestran en el Cuadro 4 y la Figura 3 respectivamente.

Cuadro 4: Insumos utilizados en el proceso de desengrase alternativo con recirculación

Insumo	Denominación química	Porcentaje usado	Propiedad
SOLVGRAX TAN	Tensoactivo aniónico y no aniónico.	0.05	Desengrasante
TANPLEX FLA	Complejo de calcio libre de nitrógeno	1.00	Desencalante, acomplejante de cal
TANZYME P 10	Enzima microbiana	0.12	Facilita la elasticidad del cuero
SOLVTAN B CAP EXP	Asociación de tensoactivos aniónicos y no iónicos	0.05	Desengrasante
BAÑO DE CURTIDO		100	Lavado
AGUA A 28 °C		200	Lavado
AGUA A T° AMBIENTE		100	Lavado Final

Fuente: Elaboración propia

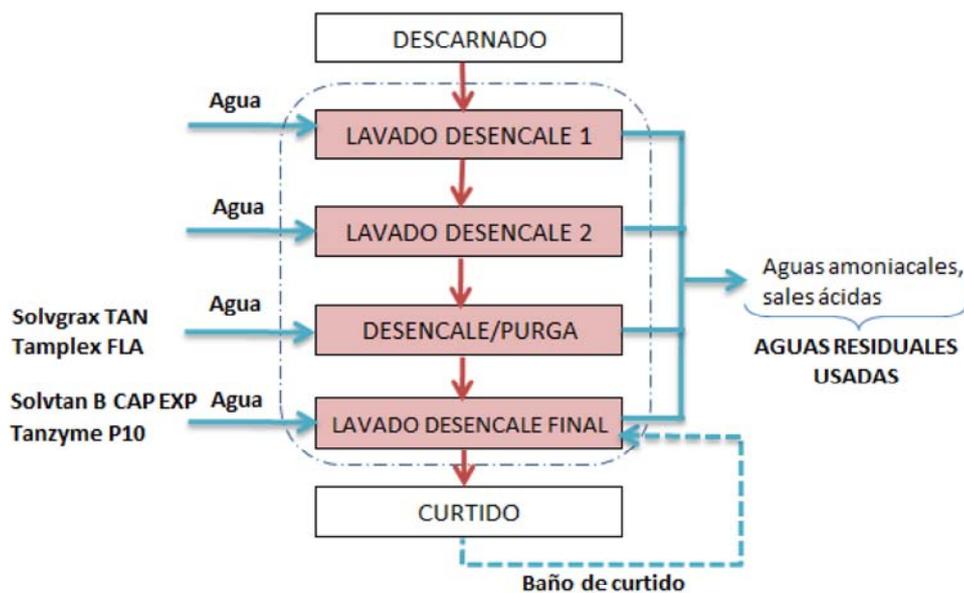


Figura 3: Flujograma del proceso de desengrase alternativo con recirculación

c. Desengrase químico o tradicional (DE-3)

Primero se realizó dos lavados para ir eliminando la cal, semejante a los procesos anteriores, luego de escurrir el efluente se procedió a realizar el desengrase propiamente dicho, para lo cual se agregó agua, SULFATO DE AMONIO y BISULFITO DE SODIO. El control de la cal también se hizo con la fenoltaleína, igual que los otros procesos. Para que la piel esté constituida de solo proteína colágena y tenga elasticidad, se agregó la enzima TANZYME P10 y el desengrasante NONIL FENOL 6, para esto se ajustó el pH a

un valor óptimo de 8.0 a 8.5 con el sulfato de amonio. Por último se realizó el lavado final agregando solo agua a temperatura ambiente, con una duración de 20 minutos, y se escurrió el 20% y el 80% del efluente paso al siguiente proceso.

En el Cuadro 5 se detalla los porcentajes y propiedades de cada insumo, mientras que en la Figura 4 se detalla en que parte del proceso se agregó cada insumo.

Cuadro 5: Insumos utilizados en el proceso de desengrase químico o tradicional

Insumo	Denominación química	Porcentaje usado	Propiedad
SULFATO DE AMONIO		2.00	Desengrase
BISULFITO DE SODIO		0.50	Desengrase
TANZYME P 10	Enzima microbiana	0.12	Facilita la elasticidad del cuero
NONIL FENOL 6M	Tensoactivo	0.10	Desengrase
AGUA A 28 °C		300	Lavado
AGUA A T° AMBIENTE		100	Lavado Final

Fuente: Elaboración propia

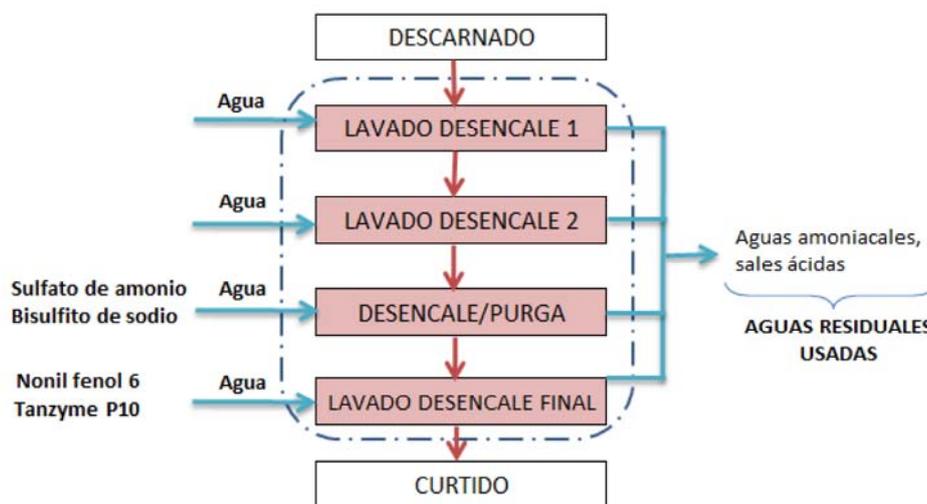


Figura 4: Flujograma del proceso de desengrase tradicional o químico

3.3.2. Caracterización del efluente

a) Selección de los parámetros de monitoreo

Los parámetros de monitoreo se seleccionaron considerando los Límites Máximos Permisibles de Efluentes para Aguas Superficiales de la Actividad de Curtiembre (D.S. N°003-2002-PRODUCE del 4 oct 2002), que incluye a los siguientes parámetros: pH, temperatura, cromo total, DBO₅, DQO, nitrógeno amoniacal, sulfuros, sólidos suspendidos totales, aceites y grasas. Se realizaron las mediciones en el Laboratorio de Análisis Químicos de la UNALM, con los métodos que establece APHA (1998) (Ver Cuadro 6). También se incluyeron otros parámetros como conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, cloruros, dureza total y sólidos disueltos totales, esto para determinar el estado inicial del efluente donde se colocaron los organismos de ensayos.

Cuadro 6: Parámetros de monitoreo

PARÁMETRO	MÉTODO/INSTRUMENTO
pH	Método electrométrico (pH-metro Schott Instruments)
Temperatura (°C)	Método electrométrico (Termómetro digital CITIZEN)
Conductividad eléctrica (µS/cm)	Método electrométrico (Conductímetro Schott Instruments)
Oxígeno disuelto (mg/l)	Método del electrodo de membrana (Oxímetro HANNA)
Turbidez (NTU)	Método nefelométrico
Cromo total (mg/l)	Método colorimétrico
Aceites y grasas (mg/l)	Método de partición gravimétrica
DBO ₅ (mg/l)	Método 5210 B (TestDBO5)
DQO (mg/l)	Método Open Reflux
Cloruros (mgCl/l)	Método argentométrico
Nitrógeno Amoniacal (mgN-NH ₃ /l)	Método de electrodo selectivo a amonio
Dureza total (mgCaCO ₃ /l)	Método volumétrico
Sulfuros (mg/l)	Método azul de metileno
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	Método gravimétrico

Fuente: Elaboración propia, basada en los Standard Methods, APHA (1998)

b) Muestreo

El muestreo de los efluentes se realizó siguiendo las técnicas del Protocolo de Monitoreo de Emisiones de Efluentes (R.M. 026-2000-ITINCI-DM del 28 feb 2000). A la salida del botal (Figura 5) se colocó una manguera para derivar todos los baños provenientes del desencale a un tanque donde se mezclaron uniformemente todos los baños y así tener un único efluente de desencale por cada proceso de curtido, el cual finalmente fue colectado del tanque para su posterior caracterización (Figura 6).

La recolección de las muestras se hizo en botellas de plástico de un litro para los análisis de nitrógeno amoniacal, dureza, DQO, DBO₅, sulfuros, cloruros, sólidos suspendidos totales, sólidos disueltos totales y también para los bioensayos; mientras que para el cromo total, y aceites y grasas se usaron botellas de vidrio. El pH, temperatura, conductividad eléctrica y volumen de cada lavado se midieron in situ.



Figura 5: Botal donde se realizó el proceso de desencale



Figura 6: Tanque donde se almacena y homogeniza el efluente de descencale

3.3.3. Realización de las pruebas toxicológicas

Para realizar los bioensayos se siguió los lineamientos del Protocolo de Ensayos Agudos en Lugares con Residuos Tóxicos (EPA 600/3-88/029) de USEPA, (1986). Se utilizaron como organismos de prueba *Daphnias magna*, semillas de lechuga *Lactuca sativa* y algas *Chlorella vulgaris*.

a) Bioensayo de inmovilización de *Daphnia magna*

Se condujo las pruebas de toxicidad aguda estática a 24 y 48 horas de exposición siguiendo las condiciones descritas en el Cuadro 7.

Se colectaron hembras de *Daphnia magna* de un acuario particular. Para criar a los daphnidos se preparó agua dura reconstituida según se detalla en APHA (1998), y se les alimentó con suspensiones de algas *Chlorella vulgaris* cada tercer día después de la limpieza (Martínez, 2008), siendo sometidas a condiciones óptimas de temperatura y aireación (18-23 °C y 2.5-6.0 mg/l de O₂), esto según Burga (2006) y Díaz *et al.*, (2004).

Los experimentos se realizaron con daphnidos de menos de 24 horas de nacidos, obtenidas de las hembras partenogénicas de los cultivos masivos (Figura 7), además los individuos no se alimentaron durante la prueba. Se hicieron diferentes concentraciones para cada efluente con su respectivo blanco y tres replicas. Las concentraciones preparadas se repartieron en volúmenes de 10 ml para cada tubo de ensayo, empleando 5 individuos

por tubo de ensayo (Figura 8), siendo un total de 60 daphnidos para cada concentración evaluada.



Figura 7: Cultivo de *Daphnia magna* en laboratorio

En simultaneo con los bioensayos de los efluentes se hicieron pruebas de sensibilidad (control positivo) con los neonatos, usando dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como sustancia tóxica de referencia (Figura 9), con el propósito de garantizar no sólo la confiabilidad de los datos obtenidos de las pruebas con los efluentes, en relación con la capacidad de respuesta de los organismos de prueba; sino también garantizar el estado fisiológico del cultivo. Para esto se verificó que la concentración efectiva media (CE_{50}) se encontrara dentro del rango establecido en la carta control (Ver Anexo 1), y cuando esto no se cumplía se descartaban los bioensayos con los efluentes que se realizaban en paralelo.



Figura 8: Daphnidos con menos de 24 horas de nacidos en el tubo de ensayo



Figura 9: Concentraciones del efluente DE-3 (izquierda) y del control positivo (derecha)

Las pruebas de toxicidad aguda de inmovilización de *Daphnia magna* se expresaron en términos de concentración efectiva media (CE_{50}), y para ello se usó el programa estadístico Probit.

Los parámetros LOEC (concentración más baja ensayada que produce efecto) y NOEC (concentración más elevada ensayada que no produce efecto) se calcularon mediante el test de Dunnet (USEPA, 2002).

Cuadro 7: Condiciones recomendadas para las pruebas con *Daphnia magna*

Tipo de ensayo	Estático
Duración de la prueba	24 y 48 horas
Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco y frío
Intensidad luminosa	540-1080 luxes
Fotoperiodo	16 horas de luz y 8 horas de oscuridad
Edad de los organismos	Menos de 24 horas de nacidos
Número de réplicas	3
Numero de organismo por recipiente	No debe ser > de 1 neonato por cada 2 ml
Régimen de alimentación	No
Aireación	No
pH	6-10
Respuesta evaluada	Inmovilización
Blanco	Sobrevivencia ≥ 90%
Control positivo	Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)

Fuente: USEPA (1986)

b) Bioensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa*

Se condujo las pruebas estáticas de toxicidad aguda de inhibición de germinación e inhibición de la elongación de la radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa* en 120 horas de exposición siguiendo las condiciones descritas en el Cuadro 8.

Se compraron las semillas de lechuga del centro de ventas de hidroponía de la UNALM y se realizaron las pruebas para verificar que éstas germinaban más del 90% tal como lo indica el protocolo. Se usó el agua dura reconstituida (APHA, 1998) como blanco y para las concentraciones estudiadas, con tres replicas cada uno (Figura 10). Mientras que para las pruebas de sensibilidad se usó como sustancia tóxica de referencia sulfato de zinc (ZnSO₄).

Se colocó en placas Petri un círculo de papel filtro y se agregó 3 ml de las concentraciones evitando que se formen bolsas de aire y con ayuda de una pinza se colocaron 20 semillas en cinco hilera dejando suficiente espacio entre las semillas para permitir la elongación de las raíces (Figura 11). Las placas fueron tapadas y colocadas en

bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad y, finalmente, se las puso en un lugar oscuro para que se produzca la germinación durante el periodo de ensayo de 120 horas (5 días) a temperatura ambiente.



Figura 10: Concentraciones del efluente de desengale para *Lactuca sativa*



Figura 11: Colocación de las semillas de lechuga en la placa Petri

Después del periodo de exposición se contó el número de semillas germinadas y se midió cuidadosamente la longitud de la radícula y el hipocotilo con ayuda de un papel milimetrado de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de desengale y sus respectivos blancos (Figura 12).

Por último se obtuvo concentración efectiva media (CE₅₀) de la inhibición de germinación y elongación de radícula e hipocotilo, usando el programa estadístico Probit, y para el LOEC y NOEC se usó el test de Dunnet (USEPA, 2002).

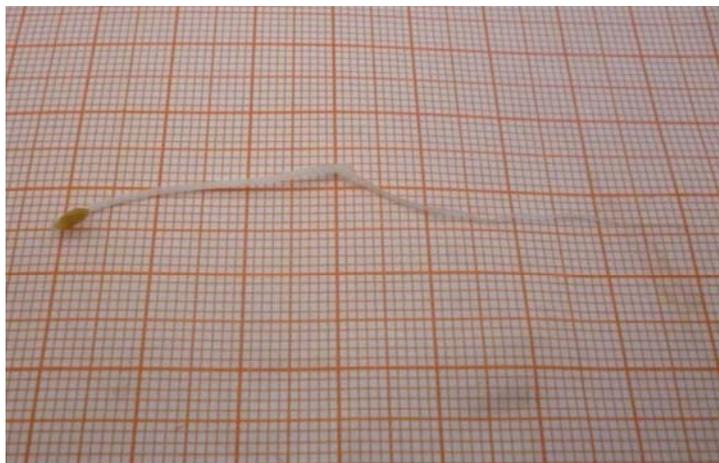


Figura 12: Medición de la radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa*

Cuadro 8: Condiciones recomendadas para las pruebas con *Lactuca sativa*

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	24 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de solución	3 a 4 ml
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
pH de la solución	4-10
Número de semillas por réplica	20
Número de replicas	3
Duración de la prueba	120 horas
Efecto medido	CE ₅₀ o % inhibición de germinación, elongación de radícula e hipocotilo
Aceptabilidad de los resultados	Germinación >90%
Control positivo	Zn (II) a partir de ZnSO ₄

Fuente: USEPA (1986)

c) Bioensayo de inhibición de crecimiento sobre *Chlorella vulgaris*

Se determinó los efectos inhibición del efluente de desengale en el crecimiento del alga *Chlorella vulgaris* relacionando la cantidad de clorofila, medido por espectrofotometría (medición indirecta) después de 96 horas de exposición, debido a la simplicidad y rapidez con la que se pueden hacer estas mediciones. El alga que se usó se obtuvo del laboratorio de la Organización Peruana para la Investigación Científica (OPIC), y el medio de cultivo se preparó de acuerdo a lo estipulado en el protocolo de la USEPA (1986), siendo también usada como agua de dilución.

Se preparó las concentraciones y el blanco con tres repeticiones; y para la prueba de sensibilidad se usó el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).

Estas pruebas se realizaron en frascos de 250 ml donde se agregó 50 ml de cada dilución y 10 ml de inóculo algal con iluminación continua dada por el fluorescente de 40W durante los cuatro días de prueba; también se agitaron los frascos moderadamente con la mano un minuto cada 12 horas, y se cambió de posición en la incubadora aleatoriamente (Figura 13). Las condiciones de ensayo se resumen en el Cuadro 9.



Figura 13: Frascos con *Chlorella vulgaris* en la cámara de incubación

La medición de clorofila (Figura 14 y 15) se realizó en el Laboratorio de Análisis Químicos de la UNALM y se siguió el método del APHA (1998).

Por último se obtuvo la concentración efectiva media (CE_{50}) usando el programa estadístico Probit, y para el LOEC y NOEC se usó el test de Dunnett (USEPA, 2002).



Figura 14: Muestras de *Chlorella vulgaris* filtradas



Figura 15: Colocación de sustancias químicas para la determinación de clorofila a

**Cuadro 9: Condiciones recomendadas para la prueba con microalgas
clorofíceas**

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	24 ± 2°C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco frío
Intensidad luminosa	4300 ± 430 luxes
Fotoperiodo	Iluminación continua
Recipientes de prueba	Frascos de 125 o 250 ml
Rango de pH	5-10
Edad del cultivo usado como inóculo	4-5 días
Volumen de solución	50 o 100 ml
Número de replicas	3
Tipo de agitación	Manual discontinua (2 veces al día)
Agua de dilución	Agua reconstituida con nutrientes
Duración de la prueba	96 horas
Efecto medido	Inhibición del crecimiento de la población algal
Resultado final	CE ₅₀ , NOEC, LOEC
Control positivo	K ₂ Cr ₂ O ₇

Fuente: USEPA (1986)

3.3.4. Determinación del índice de efecto tóxico potencial (IETP)

El IETP se determinó con los valores de CE₅ y CE₁₀, obtenidos de los bioensayos. Estos parámetros toxicológicos fueron transformados primero en unidades tóxicas (UT), y a partir de ello se calculó el IETP; para esto se usó las fórmulas del numeral 2.5 (Índice de efecto tóxico potencial), y luego se clasificó según el Cuadro 2.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFLUENTES

Cuadro 10: Resultados del análisis de caracterización de los tres efluentes

PARÁMETROS	DE-01 Alternativo	DE-02 Alt. Con recirculación	DE-03 Químico
pH	8.8	8.4	8.16
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	2200	4525	8460
Dureza Total (mgCaCO_3/l)	866.06	625.75	863.08
Aceites y grasas (mg/l)	42	22.5	51.50
Cloruros (mg/l)	286	1314.97	103.47
DBO ₅ (mgO_2/l)	187.5	280	310.00
DQO (mgO_2/l)	738	786	820.00
Sólidos disueltos totales (mg/l)	2134	4022	6785
Sólidos totales en suspensión (mg/l)	122	253	1180
Sulfatos ($\text{mgSO}_4^{2-}/\text{l}$)	64	69.44	282.40
Sulfuros (mg Sulfuros/l)	0.9	0.8	2.6
Cromo Total (mg/l)	ND*	1.46	ND*
Nitrógeno Amoniacal (NH_4^+)	49.70	111.83	870.44
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	22	24	25

*ND: no detectado

En el Cuadro 10 se muestra los resultados de la caracterización de los tres efluentes, donde se observa que en los tres casos no hay variación significativa en los valores de pH y temperatura. Mientras que la DBO₅ y DQO tienen poca variación, y la relación DBO₅/DQO es menor a 0.5 para los tres efluentes (DE-1=0.25, DE-2=0.36 y DE-3=0.38) lo que indica la presencia de sustancias tóxicas en los efluente y la inhibición de la biodegradabilidad (CVS, 2007). Además la conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales (SDT), sólidos suspendidos totales (STS), sulfatos y nitrógeno amoniacal sí tienen alta variación.

Los valores son mayores en DE-3, seguido de DE-2 y menores en DE-1, esto podría ser debido a que en el desencale tradicional (DE-3) se usa sulfato de amonio y bisulfato de sodio, mientras que en DE-1 y DE-2 se usan el SOLVGRAX TAN, SOLVTAN B CAP

EXP y TANPLEX FLA; de los cuales, los dos primeros contienen baja o nula cantidad de nitrógeno, mientras que el tercero es un complejante de calcio con baja cantidad de nitrógeno.

Solo se detectó cromo total en DE-2, pero no se pudo descartar la presencia de este elemento en los otros efluentes, debido a que el nivel de cromo medido estaba por debajo del límite de detección (0.005mg/l) del método utilizado. Además la presencia de cantidades de cromo detectable en DE-2 podría deberse a que se reutilizó el efluente de curtido del proceso alternativo anterior donde se utilizó el compuesto CROMO 33. Asimismo el reutilizar este efluente conlleva a que la cantidad de cloruros en DE-2 sea mayor a los otros dos efluentes.

Para obtener DE-1 y DE-2 se utilizaron los mismos insumos; pero los valores de los parámetros analizados fueron mayores en DE-2, esto podría también atribuirse a la reutilización del efluente de curtido, que contenía tanto insumos del proceso de desengrase como el de curtido.

Al comparar los valores del Cuadro 10 con los límites máximos permisibles (LMP) para aguas superficiales del subsector curtumbre (D.S.N°003-2002-PRODUCE del 4 oct 2002) y los valores máximos admisibles (VMA) para alcantarillado (D.S. N°021-2009-VIVIENDA del 20 nov 2009) se concluyó que ninguno de los tres efluentes cumple con los valores de los LMP para aguas superficiales; pero DE-1 sí cumple con los VMA en todos sus parámetros, mientras que DE-2 solo se sobrepasa en nitrógeno amoniacal, y DE-3 en STS y nitrógeno amoniacal, por lo que no cumplen con esta normativa.

4.2. BIOENSAYOS CON *Daphnia magna*

El porcentaje de neonatos daphnidos inmovilizados en los blancos de cada efluente fueron menores de 5%, lo que indica que los resultados cumplen con no exceder el 10% de neonatos inmovilizados que exige los lineamientos del Protocolo de Ensayos Agudos en Lugares con Residuos Tóxicos (EPA 600/3-88/029) de USEPA, (1986). Además la concentración final de oxígeno disuelto fue mayor de 4 mg/l y el pH se mantuvo en el rango de 6-10 (Ver Anexo 8) en todas las concentraciones evaluadas de los tres efluentes.

Se elaboró una carta control que sirvió de referencia para evidenciar la sensibilidad de la especie, la estabilidad de la respuesta biológica y la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Para esto se estableció los intervalos aceptables de variación de la respuesta para *Daphnia magna* usando el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y, los valores obtenidos de la CE_{50} para los dos periodos de exposición se mantuvieron dentro de los rangos de aceptación que comprenden valores entre 3.8 a 9.3 mg/l con un valor promedio de 6.5 mg/l para 24 horas de exposición; y valores entre 0.8 a 1.5 mg/l con un valor promedio de 1.2 mg/l para 48 horas de exposición, datos expresados como $K_2Cr_2O_7$ (Ver Anexo 1). En consecuencia, los ensayos realizados en paralelo con los tres efluentes son considerados válidos estadísticamente, ya que los neonatos estaban en condiciones de ser utilizados en las pruebas de toxicidad.

Cuadro 11: Porcentajes de *Daphnia magna* inmovilizadas por la exposición al efluente DE-1 en 24 y 48 horas

DE-1								
Concentración (%)	24 horas				48 horas			
	R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
26	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
33	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
41	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
51	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
64	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
80	5	5	5	5.0	5	5	10	6.7
100	10	10	15	11.7	20	15	20	18.3
CE₅₀	151.95	151.95	132.18	145.36	121.51	132.18	125.27	126.32
CE₁₀	97.72	97.72	92.39	95.94	89.53	92.39	85.78	89.23
CE₅	86.23	86.23	83.47	85.31	82.11	83.47	77.05	80.88

Para las 24 horas de exposición en el efluente DE-1 se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (Ver Anexo 5A) con un nivel de confianza del 95%, siendo que la prueba de varianza indicó que sí existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones, se prosiguió a realizar la prueba Dunnett con la que se determinó el NOEC= 64% y el LOEC=80%.

En el Cuadro 11 para las 24 horas se registró inmovilización a partir de la concentración 80%, y se presentó inmovilización de 11.7% cuando se aplicó la concentración 100%. Para este periodo de tiempo la CE_{50} fue 145.4%, la CE_{10} 95.94% y la CE_5 85.31 %, lo que indica que este efluente tiene bajos efectos tóxicos ya que se tendría que verter una concentración de 145.4% del efluente DE-1 para que genere la inmovilización del 50% de los daphnidos en 24 horas.

Para las 48 horas de exposición también se realizó el ANOVA y la prueba Dunnett (Ver Anexo 5B) con la que se determinó el NOEC= 64% y el LOEC=80%, obteniéndose los mismos valores que el periodo anterior.

Para las 48 horas la inmovilización aumentó solo en las dos últimas concentraciones (80% y 100%), sin embargo, en ninguna de las concentraciones se sobrepasó el 20% de neonatos inmovilizados. La CE_{50} para este periodo de tiempo fue 126.3%; para CE_{10} 89.23% y para CE_5 80.95%, obteniéndose valores similares al periodo anterior, esto posiblemente debido a que las bajas concentraciones de contaminantes en DE-1 no afectan significativamente el movimiento de los neonatos en el tiempo transcurrido (48 horas).

Cuadro 12: Porcentajes de *Daphnia magna* inmovilizadas por la exposición al efluente DE-2 en 24 y 48 horas

DE-2								
Concentración (%)	24 horas				48 horas			
	R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0.0	5	0	0	1.7
1.5	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
3	0	0	0	0.0	0	5	0	1.7
6	0	0	0	0.0	0	5	0	1.7
12	0	0	0	0.0	0	5	0	1.7
25	5	0	0	1.7	10	10	5	8.3
50	10	5	5	6.7	35	30	25	30.0
100	40	40	35	38.3	95	95	90	93.3
CE₅₀	129.53	112.81	122.15	121.50	54.79	53.31	60.98	56.36
CE₁₀	42.62	60.52	61.96	55.03	31.39	13.36	34.38	26.38
CE₅	31.10	50.73	51.11	44.31	26.81	9.03	29.22	21.68

Para las 24 horas de exposición con DE-2, igualmente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (ver Anexo 5A), con un nivel de confianza del 95%, con la que se determinó el NOEC= 25% y el LOEC=50%. En el Cuadro 12 se observa que para las 24 horas se registró inmovilización en los neonatos a partir de la concentración 25% y aumentó progresivamente hasta la concentración 100% el que registró el valor más alto (38.3%) de neonatos inmovilizados. El valor de CE₅₀ para este periodo fue 121.50%; para CE₁₀ 55.03% y para CE₅ 44.31%.

Para las 48 horas de exposición también se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (Ver Anexo 5B), con la que se determinó el NOEC= 12% y el LOEC=25%. En el Cuadro 12 se observa que para las 48 horas también se registró un aumento considerable del número de neonatos inmovilizados en cada una de las concentraciones, incluido el blanco; sin embargo en el blanco no se sobrepasó el 10% de neonatos inmovilizados por lo que se consideró válido el experimento, y llegó hasta 95% de efecto a la concentración 100%. Para este tiempo la CE₅₀ fue 56.36%; CE₁₀ 26.38% y CE₅ 21.68%, lo que indica que la toxicidad del efluente DE-2 aumento considerablemente a las 48 horas.

Es posible que la duplicación de la toxicidad de un periodo de tiempo a otro, se deba a que el efluente DE-2 tuvo las mayores concentraciones de cloruros de sodio (NaCl) que posiblemente generaron problemas de salinidad y que indujeron alteraciones osmóticas en los neonatos, afectando su movilización, ya que Escobar (2008) y Tisler citado por Cooman *et al.*, (2003) obtuvieron similares observaciones.

El efecto tóxico del cromo trivalente en DE-2 con un pH 8.4 es mínimo o nulo, ya que se encuentra precipitado en forma de hidróxido de cromo (Cr(OH)₃) debido a que su Producto de Activación Iónica (IAP) fue igual a $10^{-29.83}$ (Ver Anexo 4), el cual fue mayor a la constante de solubilidad (K_{so})= 10^{-30} .

Cuadro 13: Porcentajes de *Daphnia magna* inmovilizadas por la exposición al efluente DE-3 en 24 y 48 horas

Concentración (%)	DE-3							
	24 horas				48 horas			
	R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
1.5	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
3	0	0	0	0.0	5	5	5	5.0
6	5	5	5	5.0	25	20	25	23.3
12	20	15	25	20.0	100	100	100	100.0
25	100	100	100	100.0	100	100	100	100.0
50	100	100	100	100.0	100	100	100	100.0
100	100	100	100	100.0	100	100	100	100.0
CE₅₀	13.94	14.41	13.50	13.95	6.68	6.90	6.68	6.75
CE₁₀	8.87	9.25	8.53	8.88	4.27	4.44	4.27	4.33
CE₅	7.80	8.15	7.49	7.82	3.76	3.91	3.76	3.81

Para las 24 horas de exposición en DE-3, igualmente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (Ver Anexo 5A) con un nivel de confianza del 95%, con lo que se determinó el NOEC = 3% y el LOEC = 6%. En el Cuadro 13 se observa que a las 24 horas se registró un aumento considerable de neonatos inmovilizados en cada uno de las concentraciones, pero en las dos primeras concentraciones no se reportó efecto alguno. En las concentraciones 6% y 12% se alcanzó un 20% de efecto tóxico y en las tres últimas concentraciones se registró el 100% de neonatos inmovilizados. La CE₅₀ fue 13.9%, para CE₁₀ 8.88% y para CE₅ 7.82%.

Para las 48 horas de exposición también se realizó el ANOVA y la prueba Dunnett (Ver Anexo 5B), con la que se determinó el NOEC = 1.5% y el LOEC = 3%. En el Cuadro

13 se observa que a las 48 horas se registró 100% de inmovilización a partir de la concentración 12%. La CE_{50} (6.8%), CE_{10} (4.33%) y CE_5 (3.81%) disminuyó a la mitad con respecto al periodo anterior, lo que evidencia mayores efectos tóxicos, ya que a las 24 horas los neonatos se encuentran en proceso de asimilación y pasado este período el efecto tóxico del efluente se evidencia con la inmovilización de los neonatos.

El mayor efecto de inmovilización en los neonatos se presentó en el efluente DE-3 a las 24 y 48 horas, esto podría atribuirse a las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, STS y SDT, debido a que en el estudio realizado por Cooman *et al.*, (2003), se llegó a la conclusión que el nitrógeno amoniacal fue la principal causa de toxicidad en el efluente de curtiembre. Además cuando se supera el valor de la CE de 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (8460 $\mu\text{S}/\text{cm}$) el responsable de la toxicidad es SDT (Dickerson citado por Cooman *et al.*, 2003), este parámetro junto con los STS pueden interferir en los mecanismos respiratorios de los neonatos (Escobar, 2008) y estos mismos compuestos pueden ocultar la presencia de sustancias tóxicas en el medio (USEPA, 1986), por ello la toxicidad podría estar relacionada con el alto contenido de sólidos y nitrógeno amoniacal, los cuales contribuirían a magnificar los efectos tóxicos presentados (inmovilización).

Por tanto a partir de los Cuadros 11, 12 y 13, los valores de las CE_{50} a las 48 horas de exposición disminuyeron respecto al periodo anterior, lo que indica que al estar los neonatos a mayor tiempo de contacto con los contaminantes de los efluentes, el efecto de inmovilización se da en mayor medida.

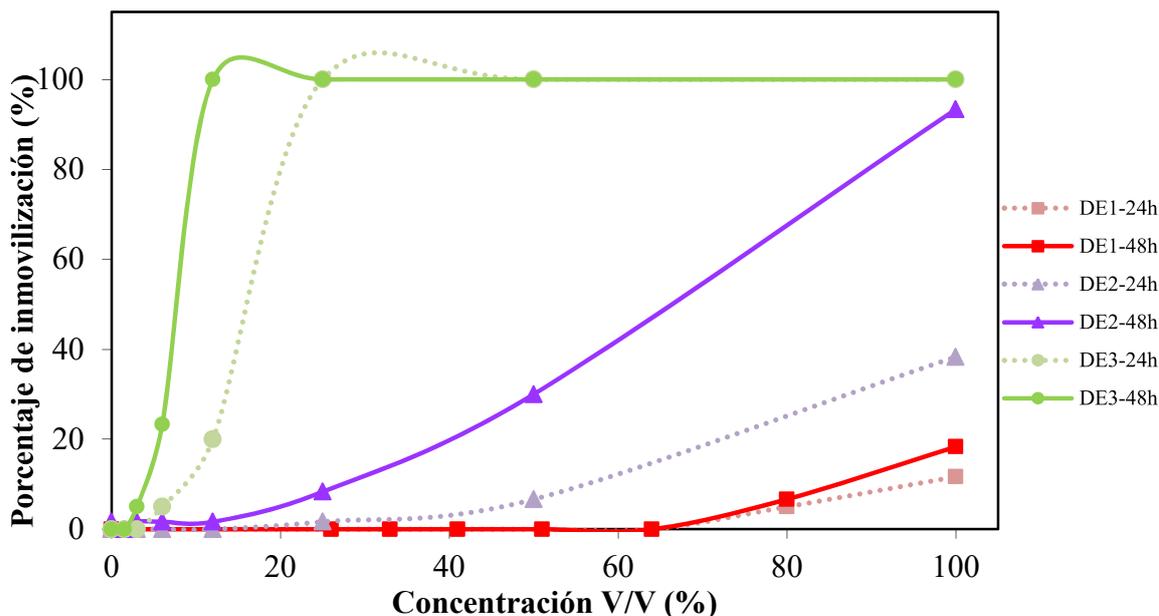


Figura 16: Curva Concentración-Respuesta de *Daphnia magna*

En la Figura 16, se observa las curvas de concentración-respuesta de los tres efluentes, en los cuales el porcentaje de inmovilización va acentuándose conforme aumenta la concentración del efluente. Las curvas de DE-1 y DE-2 mostraron una tendencia exponencial, pero las curvas de DE-1 presentaron bajos porcentajes de inmovilización y no mostraron diferencias marcadas en los dos periodos, mientras que en las curvas de DE-2 se observaron diferencias marcadas entre los periodos de exposición de 24 y 48 horas a partir de la concentración 50%, acentuándose más en la concentración 100%. Por otro lado, las curvas de DE-3 presentaron una forma sigmoidea muy pronunciada, lo que significaría que este efluente tendría efectos tóxicos más potentes que los otros dos efluentes evaluados, ya que se presentó el 100% de neonatos inmovilizados a partir de las concentraciones de 12% y 25% para 24 y 48 horas respectivamente.

4.3. BIOENSAYOS CON *Lactuca sativa*

Las pruebas de sensibilidad se hicieron con sulfato de zinc (ZnSO₄), para las cuales se elaboraron las cartas control, y se obtuvo que el promedio de la CE₅₀ para la germinación fue de 158.33 mg/l el que se encontraba dentro del rango de aceptación de 136.30 mg/l a 180.36 mg/l; el promedio de la CE₅₀ para la elongación de radícula fue de 13.22 mg/l el que se encontraba dentro del rango de 10.77 mg/l a 15.67 mg/l; y el promedio de la CE₅₀ para la elongación del hipocotilo fue de 16.74 mg/l, el que se encontraba dentro del rango de 12.05 mg/l a 21.44 mg/l, los datos se expresaron como ZnSO₄ (Ver Anexo 2).

Asimismo, en las muestras correspondientes a los blancos (semillas con agua de dilución) hubo crecimiento de todas las semillas, elongación de radículas e hipocotilos y no hubo síntomas de necrosis, es decir no mostraron efecto tóxico. Por consiguiente, todo ello indicó que las semillas, la calidad del agua de dilución y en general las condiciones de los ensayos estaban en buen estado (Borbórcuez y Campos, 2007). Además el pH en todas las concentraciones estuvieron en el rango aceptable (4-10), por ende se consideró válido los bioensayos.

Cuadro 14: Porcentaje de inhibición de la germinación, radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa* por la exposición al efluentes DE-1

Concentración (%)	DE-1											
	Germinación				Radícula				Hipocotilo			
	R1	R2	R3	Prom	R1	R2	R3	Prom	R1	R2	R3	Prom
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	5	3	5	4	-11	-16	-12	-13
33	0	0	0	0	9	9	12	10	3	-4	-2	-1
41	0	0	0	0	13	11	14	13	15	11	13	13
51	0	0	0	0	19	15	18	17	18	15	19	17
64	0	0	0	0	22	19	19	20	20	19	20	20
80	0	5	5	3	27	24	29	26	23	21	25	23
100	10	15	10	12	34	39	39	38	27	28	27	27
CE₅₀	156	141	166	154	161	145	146	151	160	149	144	151
CE₁₀	101	92	98	97	35	40	35	37	44	50	46	47
CE₅	90	81	84	85	23	28	23	25	30	37	34	34

Para el efluente DE-1 se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (Ver Anexo 6A) con un nivel de confianza del 95%, siendo que la prueba de varianza indicó que sí existían diferencias significativas entre las concentraciones, se prosiguió a realizar la prueba Dunnett, con la que se determinó para la germinación el NOEC=80% y LOEC=100%; para la radícula NOEC=26% y LOEC=33%; y para el hipocotilo NOEC=33% y LOEC=41%.

De los resultados que se muestran en el Cuadro 14, se observa que el efluente DE-1 inhibe la germinación a concentraciones mayores e iguales al 80%, mientras que la inhibición de la elongación de la radícula se da a partir de la concentración 26%; pero la elongación del hipocotilo mostró valores negativos a bajas concentraciones, lo que indica estímulo (crecimiento) y se presenta inhibición a partir de la concentración 41%. La CE₅₀ para la germinación, elongación de radícula e hipocotilo tiene valores mayores a 100%, semejante a lo que se obtuvo con los neonatos, lo que muestra que este efluente presenta baja toxicidad, es decir, si este efluente con una poca o casi nula dilución entra en contacto con las plántulas el efecto inhibitorio en el desarrollo de éstas probablemente no sea tan significativo.

Cuadro 15: Porcentaje de inhibición de la germinación, radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa* por la exposición al efluente DE-2

DE-2												
Concentración (%)	Germinación				Radícula				Hipocotilo			
	R1	R2	R3	Prom	R1	R2	R3	Prom	R1	R2	R3	Prom
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	-20	-20	-15	-18	-23	-15	-16	-18
3	0	0	0	0	-12	-10	-7	-10	-13	-6	-5	-8
6	0	0	0	0	-6	-3	-3	-4	-5	-1	2	-1
12	0	0	0	0	13	14	15	14	2	8	6	5
25	0	0	0	0	33	38	30	34	17	17	14	16
50	20	20	15	18	55	64	57	59	26	32	30	29
100	45	45	40	43	71	75	70	72	60	63	62	62
CE₅₀	104	104	117	108	47	40	47	44	81	73	79	78
CE₁₀	41	41	46	43	12	11	11	11	23	18	18	20
CE₅	32	32	35	33	8	7	8	8	16	12	12	13

Para el efluente DE-2 también se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (Ver Anexo 6B) con un nivel de confianza del 95%, con la que se

determinó para la germinación el NOEC=6% y LOEC=12%; para la radícula NOEC=6% y LOEC=12%; y para el hipocotilo NOEC=6% y LOEC=12%.

En el Cuadro 15, se observa que el efluente DE-2 a diferencia del DE-1 presentó inhibición en la germinación a partir de la concentración 50% y de la elongación de radícula e hipocotilo a partir del 12%. Para la elongación de radícula e hipocotilo se presentaron valores negativos en las primeras concentraciones, lo que evidencio que probablemente a bajas concentraciones exista estímulo y no inhibición; pero la elongación del hipocotilo presento estímulo a diferencia de DE-1 por debajo de las concentraciones de 12%.

La CE₅₀ para la germinación fue 108%, para la elongación de radícula e hipocotilo fue 44% y 78% respectivamente, estos valores fueron menores a DE-1, lo que mostro que DE-2 tiene mayor efecto toxico que DE-1, ya que a concentraciones menores se necesita que la muestra este más diluida para no afectar al 50% de las plántulas.

Cuadro 16: Porcentaje de inhibición de la germinación, radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa* por la exposición al efluentes DE-3

DE-3												
Concentración (%)	Germinación				Radícula				Hipocotilo			
	R1	R2	R3	Prom	R1	R2	R3	Prom	R1	R2	R3	Prom
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	-24	-23	-29	-25	-10	-15	-13	-13
3	0	0	0	0	-20	-22	-24	-22	-8	-12	-9	-10
6	0	0	0	0	-13	-17	-13	-14	-1	-2	-1	-1
12	0	0	0	0	27	24	24	25	20	17	20	19
25	80	80	90	83	83	85	87	85	67	62	64	64
50	100	100	100	100	95	94	94	94	79	79	80	79
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CE₅₀	21	21	19	20	17	17	17	17	22	24	23	23
CE₁₀	15	15	15	15	9	9	9	9	9	10	10	10
CE₅	14	14	14	14	7	7	7	7	7	8	7	8

Del mismo modo, para el bioensayo con DE-3, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Dunnett (Ver Anexo 6C) con un nivel de confianza del 95%, con la que se determinó para la germinación el NOEC=12% y LOEC=25%; para la radícula NOEC=12% y LOEC=25%; y para el hipocotilo NOEC=6% y LOEC=12%.

Los resultados con la muestra DE-3 se presentan en el Cuadro 16, donde se observa que la inhibición de la germinación se dio a partir de la concentración 25%, siendo esta concentración más baja en comparación al DE-1 y DE-2. Por otro lado la inhibición de la elongación de la radícula e hipocotilo se dio a partir de la concentración 12%, y por debajo de esta concentración se obtuvo valores negativos, mostrando estímulo de crecimiento, tal como se obtuvo para DE-2, pero con valores mayores a los obtenidos en DE-2. Esto demuestra mayor inhibición y estímulo con la muestra DE-3 que con DE-1 y DE-2.

La CE_{50} para la germinación fue 20% para la elongación de radícula e hipocotilo 17% y 23% respectivamente, siendo estos valores menores en comparación a la CE_{50} de DE-1 y DE-2, lo que indicó que los efectos tóxicos del DE-3 en la inhibición de las semillas de *L. sativa* son más nocivas con respecto a los otros dos efluentes, esto se puede atribuir a la presencia de altas concentraciones de sulfatos y cloruros que al tener alta solubilidad son más fáciles de ser absorbidos por la radícula generando problemas de toxicidad.

Se observa en los Cuadros 14, 15 y 16 estímulo en la elongación de radícula e hipocotilo a bajas concentraciones de DE-2 y DE-3, mientras que en DE-1 solo se presentó crecimiento en el hipocotilo por debajo de la concentración 33%. Este estímulo puede deberse al fenómeno conocido como hormesis (Barbero *et al.*, 2001), es decir, que pudo haber un estímulo por un factor de promoción de crecimiento como el nitrógeno o la materia orgánica, el cual está ausente en el agua dura reconstituida (agua usada para las diluciones y para el blanco). Como también puede estar referido al primer signo de toxicidad, ya que para diluir las sustancias tóxicas las plántulas necesitan una masa más grande de tejidos y por tanto presenten un rápido crecimiento.

A partir del porcentaje de la cantidad de semillas germinadas y el promedio de la longitud de la elongación de las radículas en las concentraciones y los blancos se halló el porcentaje del índice de germinación (%IG) (Lallana *et al.*, 2008), los cuales se muestran en el Cuadro 17, donde se observa que a concentraciones por debajo del 6% el efluente DE-3 tuvo un %IG superior al de los otros dos efluentes (DE-1 y DE-2), porque con este efluente se presentó mayor estímulo en la elongación de radícula, esto atribuible a las elevadas concentraciones de materia orgánica e inorgánica, como también de nitrógeno amoniacal (Ver Cuadro 10), los cuales, a concentraciones óptimas contribuyeron con el

desarrollo de la radícula, y a mayores concentraciones generaron efectos tóxicos, debido a que las plántulas solo absorben cierta cantidad de estos nutrientes (Lallana *et al.*, 2008).

Cuadro 17: Porcentaje de índice de germinación de *Lactuca sativa* por la exposición a los tres efluentes

% Índice de germinación			
Concentración (%)	DE-1	DE-2	DE-3
1.5	-	118.3	125.3
3	-	109.5	121.9
6	-	104.1	114.3
12	-	85.7	75.2
26	95.6	-	-
33	90.2	-	-
41	87.2	-	-
50	82.8	33.7	0.0
64	80.1	-	-
80	71.2	-	-
100	55.2	15.9	0.0

La menor longitud de radícula registrada en los bioensayos podría deberse a la presencia de cloruro de sodio (NaCl) en los tres efluentes, ya que este es un compuesto tóxico para el crecimiento en las mayoría de vegetales (Salisbury y Ross citado por Foti *et al.*, 2005). El NaCl se utilizó para conservar las pieles antes de ingresar al proceso de curtido y conforme se fue desarrollando el proceso éste se fue eliminando en el agua, a través de los lavados.

Otros indicadores de toxicidad observados en las plántulas en la exposición aguda, fueron el desarrollo de ápices necróticos en las radículas a partir de la exposición, así como la ausencia o inhibición en la elongación de los pelos absorbentes. Esto se observó con mayor predominancia con el efluente DE-3.

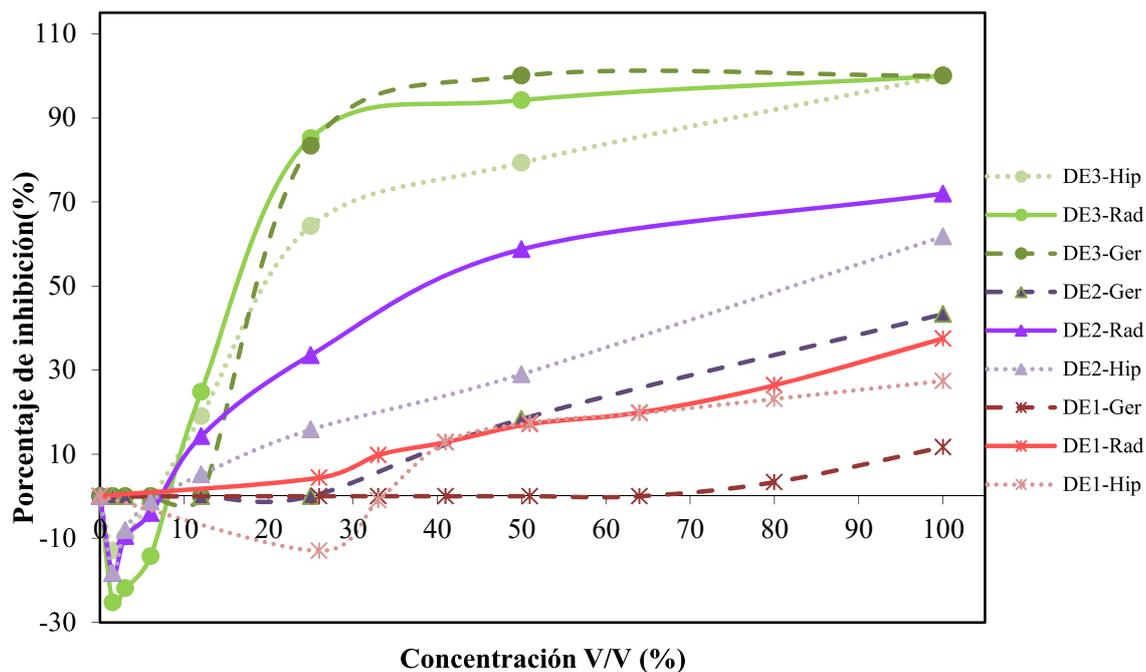


Figura 17: Curva Concentración-Respuesta de *Lactuca sativa*

En la Figura 17 se observa las curvas de concentración-respuesta de los porcentajes de inhibición de los tres efluentes, los cuales tienen la misma tendencia tanto para la germinación como para la elongación de la radícula e hipocotilo. Así también se muestran valores negativos por debajo de las concentraciones 10 % y 30%, lo que indica el estímulo que se presentó en la elongación de la radícula y el hipocotilo, esto podría deberse a que a bajas concentraciones se disminuyen los contaminantes, pero la presencia de nutrientes y de otros compuestos en concentraciones óptimas contribuyeron a mejorar y estimular el desarrollo vegetal, tal como ya se mencionó antes.

Las curvas de DE-3 presentaron una forma sigmoidea, semejante a las que se presentaron con *D. magna*, lo que significa que este efluente tiene efectos más tóxicos en el crecimiento y desarrollo de las plántulas en comparación a los otros dos efluentes.

Se observó también que las curvas del porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula fueron mayores a las del hipocotilo, esto podría deberse a la dificultad de translocación de los contaminantes como el ion Na^+ , de la radícula a los órganos aéreos de la plántula (hipocotilo). Además, para las plantas terrestres la principal vía de entrada de los metales pesados y otros contaminantes es la raíz, donde se inicia la inhibición de su crecimiento longitudinal, siendo por regla general uno de los primeros síntomas externos

del efecto tóxico, debido a que se alteran procesos de división celular y alargamiento celular que se produce en la zona apical de las raíces (Reigosa citado por CVS, 2007).

Asimismo esta inhibición pronunciada probablemente se debió a los efectos tóxicos provocados por los compuestos solubles contenidos en el efluente que pueden ser mejor percibidos por la radícula y el hipocotilo a niveles de concentraciones bajas que no necesariamente suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo (Sobrero y Ronco, 2004).

Por tanto, se concluye que el crecimiento de radícula es más sensible a la toxicidad que la germinación de la semilla, lo que destaca la importancia de medir a la vez ambos efectos, letal (porcentaje de germinación) y subletal (inhibición de elongación de la radícula), como indicadores de toxicidad, ya que complementan y explican la compleja respuesta de los contaminantes presentes, tal como fue planteado por Wang citado por Torres y Hernandez, (2009).

4.4. BIOENSAYOS CON *Chlorella vulgaris*

Las pruebas de sensibilidad se hicieron con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), para ello se elaboró una carta control como con los otros dos organismos, donde se detalla que el promedio de la CE_{50} fue 55.46 mg/l, que se encuentra en el rango de aceptación de 28.68 mg/l a 82.23 mg/l expresados como $K_2Cr_2O_7$ (Ver Anexo 3); en consecuencia los bioensayos realizados en paralelo con los tres efluentes son considerados válidos estadísticamente, ya que las algas estaban en condiciones de ser utilizadas para las pruebas de toxicidad.

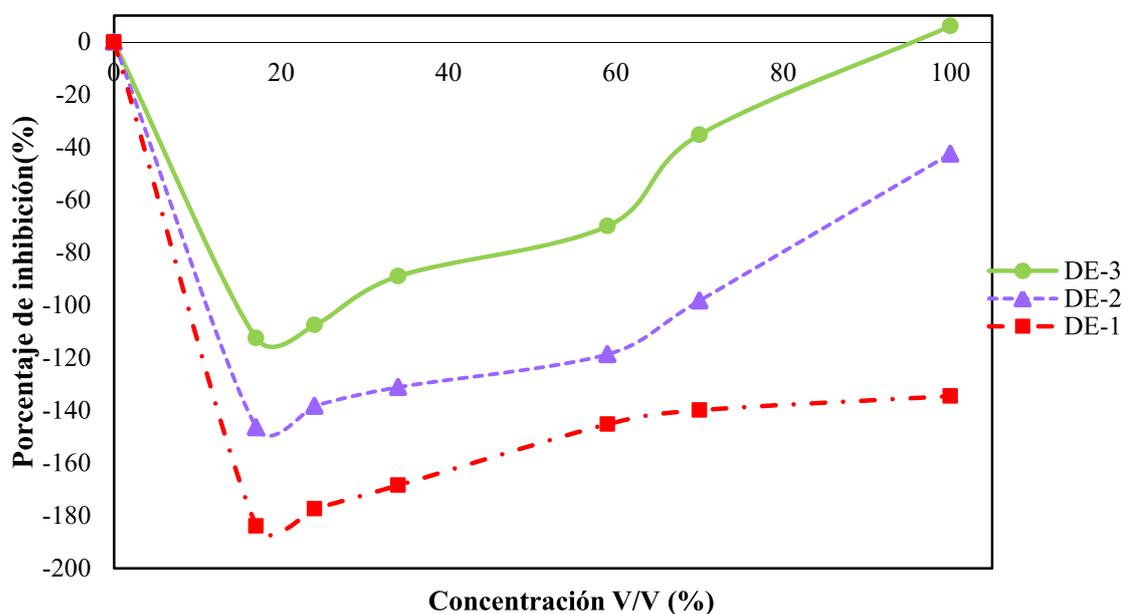


Figura 18: Curva Concentración-Respuesta de *Chlorella vulgaris*

La Figura 18 muestra que las curvas concentración vs respuesta tienen forma de “U” con valores negativos para los tres efluentes, lo que significa que a bajas concentraciones (>17%) no hubo inhibición de crecimiento sino estimulación, y al ir aumentando las concentraciones empieza el retardo de crecimiento. Tanto para DE-1 y DE-2 el crecimiento de las algas fue mayor comparado con el blanco, mientras que para DE-3, a la concentración de 100% se tuvo un valor menor al blanco (efecto inhibitorio).

La estimulación del crecimiento se podría deber a factores que provocan el crecimiento adicional de las algas en el medio de cultivo (blanco), por lo que los efluentes analizados deben de contener compuestos adicionales que favorecen el crecimiento de las algas, como el nitrógeno amoniacal o materia orgánica que son nutrientes esenciales para las algas.

La exaltación al final de los ensayos para los tres efluentes, puede deberse al efecto hormesis tal como se explicó en *L sativa*, el cual no debe ser interpretado como un factor favorable o estimulante, debido a que es posible que muchos componentes a bajas concentraciones producen exaltación por ser micronutrientes para las algas y por tanto la respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas (Slabbert y Venter citado por Bohórquez y Campos, 2007). Asimismo es probable que a través de un período de exposición de 96 horas, los efectos adversos de los tóxicos se enmascaren por la cantidad de compuestos que estimulan el crecimiento (Manusadzianas citado por Bohórquez y Campos, 2007), por esta razón no se observó los efectos tóxicos. Además un factor importante relacionado con el efecto de hormesis en las algas *C. vulgaris*, es que al desempeñarse como productores primarios en la cadena trófica, podrían estar acumulando sustancias tóxicas en su interior, sin mostrar su efecto nocivo y el riesgo estaría asociado directamente con los organismos consumidores, debido a que se podrían estar generando procesos de biomagnificación, los cuales repercutirán en la población humana (Bohórquez y Campos, 2007).

La estimulación del crecimiento de las algas podría deberse a las altas concentraciones de nitrógeno y la reducción del crecimiento a las altas concentraciones de STS, debido a que estos últimos afectan la transparencia del agua y con ello la penetración de la luz, que es un factor importante para la fotosíntesis (O'Farrel *et al.*, 2002). Así también la estimulación podría haberse generado por los altos valores de DBO que es un buen reflejo de la carga orgánica, y por tanto de la biodisponibilidad de los nutrientes a las algas (Olguín *et al.*, 2000). Pero al ir aumentando la concentración de estos nutrientes, el crecimiento fue disminuyendo, por lo que se podría deducir que existe también una limitación en el crecimiento poblacional de *C.vulgaris* al aumentar la proporción del nitrógeno amoniacal y DBO (Aguirre *et al.*, 2007).

Al comparar el crecimiento de *C.vulgaris* en los tres efluentes, se observó que DE-3 tuvo un crecimiento menor en comparación con los otros dos, debido a que tiene altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, DBO y STS, que como ya se explicó son parámetros importantes en el crecimiento de las algas.

Cuadro 18: Porcentaje de estímulo de crecimiento del alga *Chlorella vulgaris*

% ECA <i>Chlorella vulgaris</i>			
Concentración (%)	DE-1	DE-2	DE-3
0	0	0	0
17	183.99	146.5	112.5
24	177.4	138.3	107.6
34	168.5	131.2	89.0
59	145.3	118.7	70.01
70	140.0	98.3	35.2
100	134.6	42.5	-6.0

Los datos muestran que durante el periodo de prueba (96 horas), hubo estimulación del crecimiento, lo que indica entonces un potencial de eutrofización en las muestras analizadas, que es una forma “indirecta” de contaminación. El efecto de promover el crecimiento de algas determina el potencial de eutrofización de las muestras, el cual tiene un valor alto cuando el porcentaje de estímulo de crecimiento de alga (% ECA) alcanza o excede el 100%; es sustancial, cuando sobrepasa el 50% pero es menor al 100%; es leve, cuando está por debajo del 50%; y no tiene potencial de eutrofización, cuando es menor a 20% (Mayorga, 2001).

En el Cuadro 18 se observa los %ECA, en donde todas las concentraciones de DE-1 tuvieron un potencial de eutrofización alto. En el caso del efluente DE-2, para las concentraciones menores e iguales al 59% se tuvo un potencial alto de eutrofización, para la concentración 70% se tuvo un potencial sustancial, y para la concentración 100% el potencial fue leve. Para efluente DE-3, las concentraciones 17% y 24% tuvieron un potencial alto de eutrofización, las concentraciones 34% y 59 % tuvieron un potencial sustancial, la concentración 70% tuvo un potencial leve y en la concentración de 100% no se mostró efecto de eutrofización, sino de inhibición (valor negativo).

Cuadro 19: Respuesta de inhibición *Chorella vulgaris* con la dilución 17%

Respuesta de <i>Chlorella vulgaris</i>			
Concentración (%)	DE-1	DE-2	DE-3
17	0	0	0
24	2.35	3.31	2.35
34	5.48	6.19	11.07
59	13.67	11.25	19.96
70	15.53	19.52	36.38
100	17.42	42.19	55.78
CE₅₀	328.37	132.93	92.42
CE₁₀	52.87	45.24	36.65
CE₅	31.92	33.39	28.23

Como se observó que a partir de la concentración 17% hubo indicios de inhibición del crecimiento de las algas (Ver Figura 18), se eligió a esta concentración como blanco para calcular los porcentajes de inhibición de crecimiento de alga para las otras concentraciones tal como se muestra en el Cuadro 19. Se tomó la concentración 17% ya que no se podía volver a realizar los bioensayos, porque las muestras tenían varios días de haber sido colectadas y la metodología recomienda que los bioensayos se deben realizar a las 24 horas de tomada la muestra, pasado este tiempo se podría generar resultados no verídicos.

En el Cuadro 19, se observa que conforme aumenta la concentración de los efluentes la inhibición se incrementa, pero a un rango pequeño. Con estos datos de porcentaje de retardo de crecimiento se obtuvieron las CE₅₀, CE₅ y CE₁₀, las cuales presentaron valores altos para el DE-1, medios para DE-2 y bajos para el DE-3, lo que señala que DE-3 es el que presenta mayores efectos de reducción de crecimiento de los tres efluentes, tal como se obtuvo para los otros bioensayos. De lo que se concluye que si este efluente ingresara a un cuerpo de agua generaría efectos de toxicidad a los organismos que conforman este ecosistema.

4.5. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP)

El IETP es un buen indicador de la toxicidad y muestra en forma rápida el peligro potencial de los efluentes industriales, por lo que primero se determinó los valores de CE₁₀ y CE₅ que están resumidos en el Cuadro 20, donde se observa que el efluente DE-3 tiene valores bajos en comparación a los otros dos efluentes, lo que indica que este necesita tener una alta dilución para no afectar más del 5% y 10% de la población de organismos evaluados.

Se trabajó con los valores de CE₅ y CE₁₀ porque la CE₅₀ no era representativa ya que sus valores excedían el rango de evaluación de los bioensayos (0-100%).

Cuadro 20: Resumen de las concentraciones efectivas de todos los efluentes

Efluente	Especies de Ensayo											
	<i>Daphnia magna</i> (24h)		<i>Daphnia magna</i> (48h)		Germinación <i>L. sativa</i>		Elongación Radícula <i>L. sativa</i>		Elongación Hipocotilo <i>L. sativa</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀
DE-1	85.3	95.9	80.9	89.2	85.1	97	24.6	36.7	33.6	46.8	31.9	52.9
DE-2	44.3	55.0	21.7	26.4	32.8	42.7	7.7	11.3	13.4	19.7	33.4	45.2
DE-3	7.8	8.9	3.8	4.3	14	15.1	7.4	8.9	7.6	9.7	28.2	36.7

En el Cuadro 20 se observa las marcadas diferencias de CE₅ y CE₁₀ entre los efluentes, así como también entre los bioensayos de un mismo efluente. Esto último se puede comprobar al comparar los valores de CE₅ del efluente DE-3 con *D. magna* a 48 horas (3.8) y *C. vulgaris* (28.2), los cuales muestran que ambos organismos responden de forma diferente a la exposición de un mismo efluente, por lo que se concluye que los organismos de diferentes niveles tróficos tienen diferentes respuestas a los efectos tóxicos, lo que indica que los efectos tóxicos del efluente de desencele pueden ser percibidos por algunas especies (*D. magna*) y no por otras (*C. vulgaris*), ya que la sensibilidad de los organismos difiere de una especie a otra.

Cuadro 21: Unidades tóxicas para todos los efluentes

Efluente	Unidad Toxica											
	<i>Daphnia magna</i> (24 h)		<i>Daphnia magna</i> (48h)		Germinación <i>L. sativa</i>		Elongación Radícula <i>L. sativa</i>		Elongación Hipocotilo <i>L. sativa</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀
DE-1	1.2	1.0	1.2	1.1	1.2	1.0	4.1	2.7	3.0	2.1	3.1	1.9
DE-2	2.3	1.8	4.6	3.8	3.0	2.3	13.0	8.8	7.5	5.1	3.0	2.2
DE-3	12.8	11.3	26.2	23.1	7.1	6.6	13.5	11.2	13.2	10.3	3.5	2.7

En el Cuadro 21 se observa que las pruebas con *D. magna* y de elongación de radícula de *L. sativa* proporcionaron la mayor parte de la UT, 26.2 y 13.5 respectivamente, siendo la más alta UT correspondiente a DE-3 (26.2). Las UT obtenidas con *C. vulgaris* presentaron valores muy cercanos en los tres efluentes, por lo que no son valores confiables, debido a que las CE₅ y CE₁₀ se obtuvieron tomando como referencia la concentración más baja (17%) utilizada en la preparación de las diluciones de los efluentes y no el blanco como en los otros bioensayos.

Además se observa que de los tres efluentes estudiados, DE-3 reportó los niveles más altos de toxicidad en los tres bioensayos, con valores de unidad tóxica (UT) muy por encima de los estimados para los otros dos efluentes.

Cuadro 22: Índice de efecto tóxico potencial para todos los efluentes

Efluente	Impresión Tóxica		Q(m ³ /h)	Carga Tóxica		IEPT	
	CE ₅	CE ₁₀		CE ₅	CE ₁₀	CE ₅	CE ₁₀
DE-1	14.63	9.95	0.87	12.73	8.65	1.14	0.98
DE-2	34.71	24.09	1.35	46.86	32.52	1.68	1.53
DE-3	77.34	65.25	0.95	73.08	61.66	1.87	1.80

Los principales contribuyentes de la Impresión Tóxica fueron las pruebas con *D. magna* y con semillas de *L. sativa* por tener valores altos de UT, tal como ya se mencionó líneas arriba.

Se observa en el Cuadro 22 las diferencias marcadas de los valores de Carga Tóxica en los efluentes, esto principalmente debido a los valores de la impresión tóxica, ya que este integra el potencia de toxicidad de los tres efluentes en los organismos evaluados,

los cuales fueron bien diferenciables y al volumen de los residuos vertidos (Q), que para este caso no es muy representativo porque los valores no tienen diferencias marcadas. Pero si existieran mayores volúmenes y/o diferencias bien marcadas por la formulación de los procesos, este factor (Q) sí sería representativo porque haría que la carga tóxica varié.

Además se observa que la Carga Tóxica es mayor en DE-3, lo que muestra que este podría generar mayores problemas a la biota acuática si es vertido a un cuerpo de agua, pero también se debe considerar la capacidad de dispersión del medio receptor, ya que este depende de la interacción entre numerosos factores tales como la dirección de la corriente, la velocidad a diferentes profundidades, la exposición a vientos predominantes, etc.

A partir de la Carga Tóxica se obtuvo el IETP, con el cual se evaluó y comparó el riesgo de toxicidad potencial de los tres efluentes (DE-1, DE-2 y DE-3). De estos resultados el efluente que presentó el valor más alto del IETP fue DE-3 (ver Cuadro 22), por lo que si este fuese vertido a un cuerpo receptor, generaría efectos potencialmente más perjudiciales en comparación a los otros dos, por tanto se debería priorizar las acciones correctivas pertinentes para dicho efluente y así se podría reducir la entrada de los contaminantes tóxicos industriales a los cuerpos de agua (Blaise and Férard, 2005).

Sin embargo, según la clasificación del Cuadro 2 los valores del IETP obtenidos usando la CE_5 como CE_{10} , resultó que los efluentes de desecale DE-1, DE-2 y DE-3 presentaron una carga tóxica despreciables ($IETP < 1.99$), probablemente debido a la interacción de las diferentes sustancias químicas presentes, las cuales conforman mezclas complejas que podrían presentar reacciones antagónicas que disminuyen el grado de toxicidad del vertimiento y, por ende, su incidencia en la respuesta de los diferentes organismos de prueba.

La UT y el IETP, reflejan de forma integral la condición del efluente y el efecto de éste sobre la biota acuática, constituyendo una herramienta valiosa, poco costosa y efectiva para evaluar el efecto tóxico del efluente de desecale.

V. CONCLUSIONES

- El análisis de los efectos tóxicos producidos por los tres efluentes de desengale a través de bioensayos, determinó que la carga tóxica de DE-3 es mayor respecto a DE-1 y DE-2, por tanto si el efluente DE-3 fuese vertido a un cuerpo de agua se debe priorizar las acciones correctivas en este efluente y luego en DE-2 seguido de DE-1.
- A pesar que los tres efluentes tienen una carga tóxica despreciable (IETP <1.99), se prueba que el comportamiento individual de cada parámetro (evaluación físico-químico) difiere del impacto que puede ocasionar unido a otros parámetros o factores.
- El IETP sería una herramienta útil para la protección del ambiente porque ayudaría a priorizar las acciones de mitigación de las aguas residuales con alta carga tóxica.
- De los tres efluentes analizados, el que presentó mayor efecto de inmovilización en *D. magna* e inhibición en el crecimiento de *L. sativa*, y *C. vulgaris*, fue el efluente DE-3 (desengale tradicional), ya que presentó los valores de CE₅₀ más bajos en todos los bioensayos.
- El bioensayo con *D. magna* resultó ser el más sensible, económico, rápido y fácil de realizar, al ser comparada con los ensayos con *L. sativa* y *C. vulgaris*.
- En los bioensayos con *L. sativa* los efluentes DE-2 y DE-3 tuvieron una marcada estimulación en la elongación de la radícula e hipocotilo a bajas concentraciones, pero a mayores concentraciones se presentó inhibición en el crecimiento.
- En los bioensayos con *C. vulgaris* hubo efecto de estimulación en los tres efluentes, con excepción de la concentración 100% de DE-3. Pero, los resultados del % ECA muestran un alto potencial de eutrofización a bajas concentraciones en los tres efluentes, lo que podría generar procesos de eutrofización al verterse a un cuerpo de agua.

- La evaluación físico-química debe ser complementada con estudios toxicológicos para determinar la causalidad de la toxicidad, ya que la combinación de estas dos herramientas ayudaría en la protección de los cuerpos receptores y el control de los efluentes industriales.
- Los parámetros físico-químicos evaluados en los tres efluentes sobrepasan los valores de los LMP para aguas superficiales del subsector curtiembre. DE-1 cumple con los VMA, mientras que DE-2 y DE-3 no cumplen esta regulación.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar realizando este tipo de estudios tanto en el tipo de efluente evaluado como en los provenientes de otras industrias y en aquellos cuerpos de agua altamente influenciados por actividades contaminantes, con el fin de diagnosticar los posibles impactos ambientales negativos que puedan afectar los ecosistemas.
- La modificación de algunos insumos en el proceso de producción de curtido ayudaría también a disminuir los efectos tóxicos de los efluentes en el ecosistema acuático, por lo que se recomienda realizar un estudio más detallado de todo el proceso de producción que brinde una información general y no parcial como en este estudio, para tener una mejor visión y sustento de la toxicidad del efluente.
- También se recomienda hacer estudios para el posible uso de este efluente como agua de riego para plantas ornamentales o cultivos, debido a los efectos de estimulación que se presentaron en la investigación.
- Realizar más estudio para generar posteriormente las bases que permitan establecer e implementar una normatividad que considere las evaluaciones ecotoxicológicas, para complementar los análisis físico-químicos.
- La réplica de los bioensayos y la validación de la metodología implementada en la presente investigación se pueden convertir en una alternativa práctica y complementaria en el control de la contaminación de los cuerpos de agua.
- Es difícil correlacionar los valores obtenidos de la CE_{50} con los parámetros físico-químicos, ya que los efluentes son matrices muy complejas, por lo que se recomienda combinar técnicas de fraccionamiento y análisis químicos con los ensayos de toxicidad con el fin de saber que compuesto tóxico real o grupo de compuestos causan toxicidad en el efluente analizado.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre, N; Palacios, J; Correa, I; Hernández, E. 2007. Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones nitrógeno: fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Revista Ingeniería Universidad de Medellín* 6 (11):11-21.
2. APHA (American Public Health Association, US), AWWA(American Water Works Association) y WEF(Water Environmental Federation). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington DC.
3. Arias-Barreiro, C; Nishizaki, H; Okubo, K; Aoyama, I; Mori, IC.2010. Ecotoxicological characterization of tannery wastewater in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Environmental Biology* 31:471-475.
4. Baleeiro, J. 2007. Reúso de agua: una propuesta de reuso de consumo de agua en curtiembres (En portugués). Tesis de Maestría. Porto Alegre, Universidad Federal de Río Grande de Sul. 99 p.
5. Barbero, P; Beltrami, M; Baudo, R; Rossi, D. 2001. Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment. *Journal of Limnology* 60(2):269-276.
6. Bohórquez, P; Campos, C. 2008 .Evaluacion de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana* 12(2):83-98.
7. Burga, K. 2006. Evaluación toxicológica de los insecticidas Metamifos y Clorpirifos en ensayos con *Dhaphnia magna* y *Porcellio laevis*. Tesis para grado. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 196 p.
8. Burton, G; Baudo, R; Beltrami, M; Rowland C. 2001. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *Journal of Limnology* 60 (2):263-267.
9. Carballeira, C; De Orte, M; Viana, I; Carballeira, A. 2012. Implementation of a minimal set of biological tests to assess the ecotoxic effects of effluents from land-based marine fish farms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78:148-161.

10. Castro, S. 2002. Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales de Uruguay. Departamento de Normalización Técnica, Dirección Nacional del Medioambiente. Uruguay.
11. Ceresoli, N; Gagnetten, A. 2003. Efectos del efluente de curtiembre sobre ceriodaphniadubia (crustacea, cladocera) en condiciones experimentales. Interciencia 28 (8):469-475.
12. Colak, S; Ozgunay, H, Mutlu, M; Yakyuz, F. 2005. Reducing the amount of tanning materials passing into wastewater in post- tanning processes, Journal of American health chemists Association 100(3):111-119.
13. Cooman, K; Gajardo, M; Nieto, J; Bornhardt, C; Vidal, G. 2003. Tannery Wastewater Characterization and Toxicity Effects on *Daphnia spp.* Environmental Toxicology 18(1):45-21.
14. CPTS (Centro de Promoción de Tecnologías Sostenible, BO). 2003. Guía Técnica de Producción Más Limpia para curtiembres. 1 ed.
15. CVS (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca).2007.Evaluación de la presencia de sustancias tóxicas en algunos afluentes del río Cauca. Universidad del Valle, Facultad de ingeniería, Santiago de Cali Vol. 4.
16. Cueronet (Comunidad de la industria del cuero, UY).2000.Flujograma de curtiembre (en línea). Consultado 5 mayo 2013. Disponible en:
<http://www.cueronet.com/flujograma/flujomenu.htm>
17. Decreto Supremo N° 003-2002-PRODUCE del 4 oct 2002. Aprueban límites máximos permisibles y valores referenciales para las actividades industriales de cemento, cerveza, curtiembre y papel.
18. Decreto Supremo N°021-2009-VIVIENDA del 20 nov 2009. Aprueban valores máximos admisibles de las descargas de aguas residuales no domésticas al sistema de alcantarillado sanitario.
19. Díaz, M; Pica, Y; Ronco, A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero *Daphnia magna*. In Castillo Morales, G ed. Ensayos toxicológicos y métodos de

- evaluación de calidad de aguas; estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA, México. 189 p
20. Díaz Báez, M. 2008. Toxicidad: una herramienta adicional para la evaluación de la calidad del agua (diapositivas). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC.
 21. Escobar, P. 2008. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia pulex* para la evaluación de muestras ambientales. Epsilon 12: 115-133.
 22. Faria Pacheco, J. 2010. Gestión del agua en la industria de curtiembre del estado de Sao Paulo; un diagnóstico sobre los principios de producción más limpia (En portugués). Tesis de Maestría. Sao Paulo, Centro Estatal de Educación Tecnológica Paula Souza 116 p.
 23. Foti, N; Billard, C; Lallana, V. 2005. Bioensayos de germinación con semillas de rucula y lechuga para monitoreo de calidad de agua. Revista Científica Agropecuaria 9(1): 47-53.
 24. Lallana, M; Billard, C; Elizalde, J; Lallana, V. 2008. Bioensayos de germinación de *Lactuca sativa* (L.): determinación de calidad de agua en represas para riego. Revista de la facultad de ciencias agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo 40(1):29-38.
 25. Martínez Jerónimo, F. 2008. Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas. In Ramírez Romero, P; Mendoza Cantú A. eds. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo; la experiencia en México. SEMARNAT, México. 428 p.
 26. Martínez, P; Osorio, J. 1995. Análisis Probit. Revista de investigaciones de la Universidad del Quindío, Armenia-Colombia 4(2).
 27. Martins, J; Teles, L; Vasconcelos, V. 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. Environmental Internacional 33:414-425.
 28. Marzi, W. 2005. Evaluación de la Ecotoxicidad de Efluentes Industriales y Municipales. Revista de Ingeniería Sanitaria Ambiental 82:88-93.

29. Mayorga Sagastume, P. 2001. Microensayos ecotoxicológicos para monitoreo ambiental y otras aplicaciones. II Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Guatemala
30. Miller, S; Gagnet, A; Worden R. 1999. Reporte técnico para la industria de curtiembres en el Perú; informe para el Ministerio de Industria, Turismo, Integración y Comercio Internacional (MITINCI) Perú.
31. MITINCI (Ministerio de Industria, Turismo, Integración y Comercio Internacional, PE).2002. Informe Final del Subsector Curtiembre; propuesta de los Límites Máximos Permisibles.
32. Nieto, R. 2003. Caracterización ecotoxicológica de efluentes líquidos industriales; herramienta para acciones de control de contaminación del agua (En portugués).Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
33. Okeyode, C; Moshood, I. 2010, Elemental compositions of the soil of Ogun- osun river basins development authority Headquarters, Ogun- state, Nigeria. Indian Journal of Science and Technology 3(3): 335-336.
34. Oliveria, S; Banzas, A; Morales, T; Beltramini, T; Angeles, M; Takayanagui, M; Domingo, J. 2007. Heavy metals in untreated urban effluent and sludge from a Biological wastewater Treatment Plant. Environmental Science and Pollution Research 7:483-489.
35. Olgún, H; Salibián, A; Puig, A. 2002. Comparative sensitivity of *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa* as sentinel organisms for aquatic ecotoxicity assessment: Studies on a highly polluted urban river. Environmental Toxicology 15(1):14-22.
36. PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), (Organización Mundial de la Salud). 1991. Guidelines for treating, storing and disposing of tannery wastes. USA.
37. Resolución Ministerial N° 026-2000-ITINCI-DM del 28 feb 2000. Aprueban protocolos de monitoreo de efluentes líquidos y emisiones atmosféricas.

38. Sánchez, J; Pacheco, V; Pavón-Silva, T; Gutiérrez, V; Ávila-González, C; Guerrero, P. 2007. Toxicity assessment of a complex industrial wastewater using aquatic and terrestrial bioassays *Daphnia pulex* and *Lactuca sativa*. Journal of Environmental Science and Health Part A 42:1425-1431.
39. Sáenz, M; Tortorelli, M; Freyre, LR. 2003. Evaluación de la fitotoxicidad de efluentes industriales. Limnetica 22(3-4):137-146.
40. Silva, A; Figueiredo, S; Goreiti, M y Delerue, C. 2008. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* - A useful tool in hazardous effluents management. Journal of Hazardous Materials 167(2009):179-185.
41. Sobrero, M; Ronco, A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In Castillo Morales, G ed. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA, México. 189 p.
42. Sobrero, M. 2010. Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnóstico. Tesis Dr. La Plata.AR. Universidad Nacional La Plata.218 p.
43. Torres, M; Hernández, N. 2009. Determinación toxicológica en aguas de río mediante el empleo de un bioensayo con planta. Higiene y Sanidad Ambiental 9: 505-509.
44. USEPA(United States Environmental Protection Agency). 1986. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites (EPA 600/3-88/029). Washington DC.
45. USEPA(United States Environmental Protection Agency). 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Washington DC.5 ed.
46. Zárate, M; Rojas, C; Ports J. 1993. Guía técnica para la minimización de residuos de curtiembre. CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). 170 p.

VIII. ANEXOS

CARTAS CONTROL

ANEXO 1: CONTROL POSITIVO PARA *Daphnia magna*

Cuadro 23: Porcentaje de *Daphnias magna* inmovilizadas al usar dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en 24 de exposición

Concentración (mg/l)	24 horas							Prom.	Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
0.007	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
0.077	0	5	0	0	0	5	0	1	2.4
0.77	10	15	15	15	10	15	10	13	2.7
7.7	35	45	50	30	45	40	35	40	7.1
77	100	100	100	100	100	100	100	100	0.0
770	100	100	100	100	100	100	100	100	0.0
CE₅₀	7.91	4.93	5.17	7.80	6.44	5.48	7.91	6.52	1.35

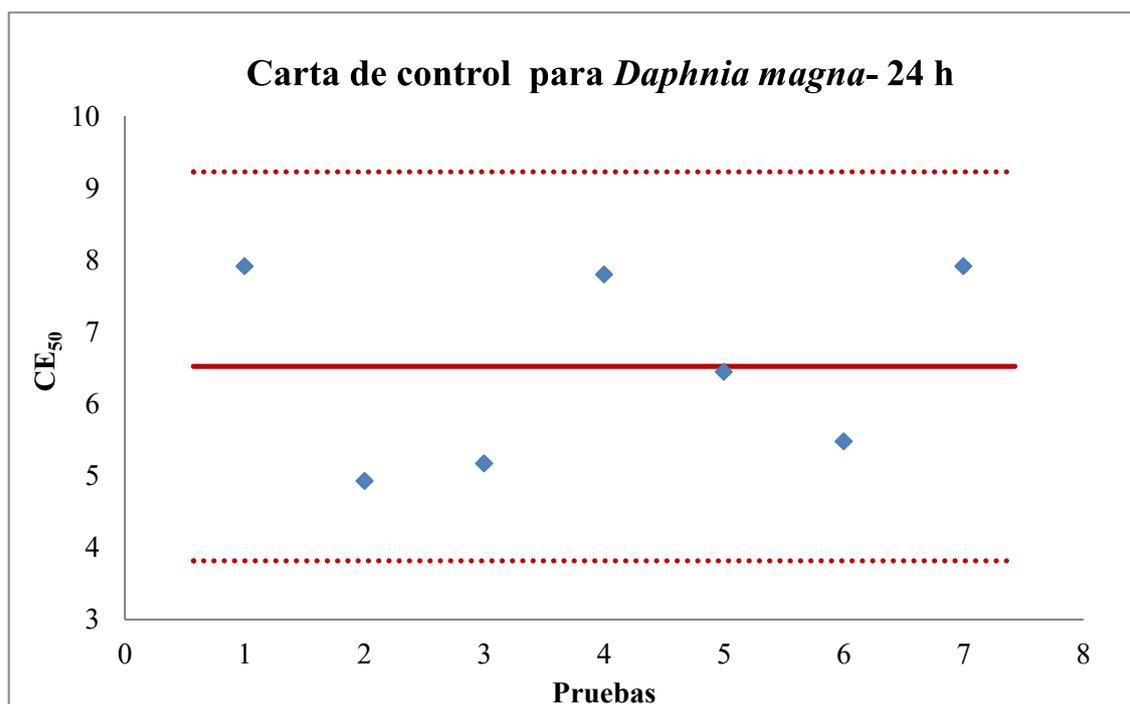


Figura 19: Carta control de *Daphnia magna* para 24 horas de exposición

Cuadro 24: Porcentaje de *Daphnias magna* inmovilizadas al usar dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en 48 de exposición

Concentración (mg/l)	48 horas							Prom.	Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
0.007	0	0	0	5	0	5	0	1	2.4
0.077	5	10	5	0	5	5	10	6	3.5
0.77	15	25	20	20	25	20	30	22	4.9
7.7	100	95	100	95	100	100	95	98	2.7
77	100	100	100	100	100	100	100	100	0.0
770	100	100	100	100	100	100	100	100	0.0
CE₅₀	1.36	0.97	1.22	1.35	1.10	1.04	1.01	1.15	0.16

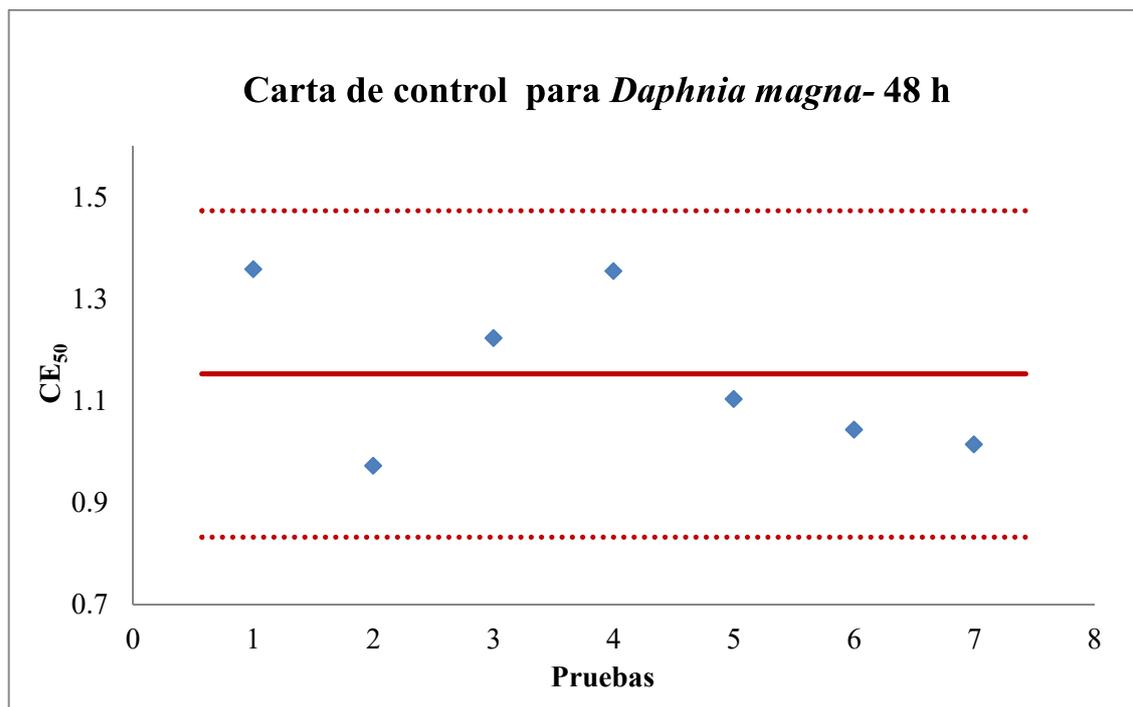


Figura 20: Carta control de *Daphnia magna* para 48 horas de exposición

ANEXO 2: CONTROL POSITIVO PARA *Lactuca sativa*

Cuadro 25: Porcentaje de inhibición de germinación de *Lactuca sativa* al aplicarles concentraciones de sulfato de zinc (ZnSO₄)

Concentración (mg/l)	Germinación						Prom	Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.021	0	0	0	0	0	0	0	0
0.21	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1	0	0	0	0	0	0	0	0
21	10	10	10	15	15	10	11.7	2.6
210	50	45	50	50	45	50	48.3	2.6
2100	100	100	100	100	100	100	100	0
CE₅₀	158.66	175.99	158.66	141.24	156.80	158.66	158.3	11.0

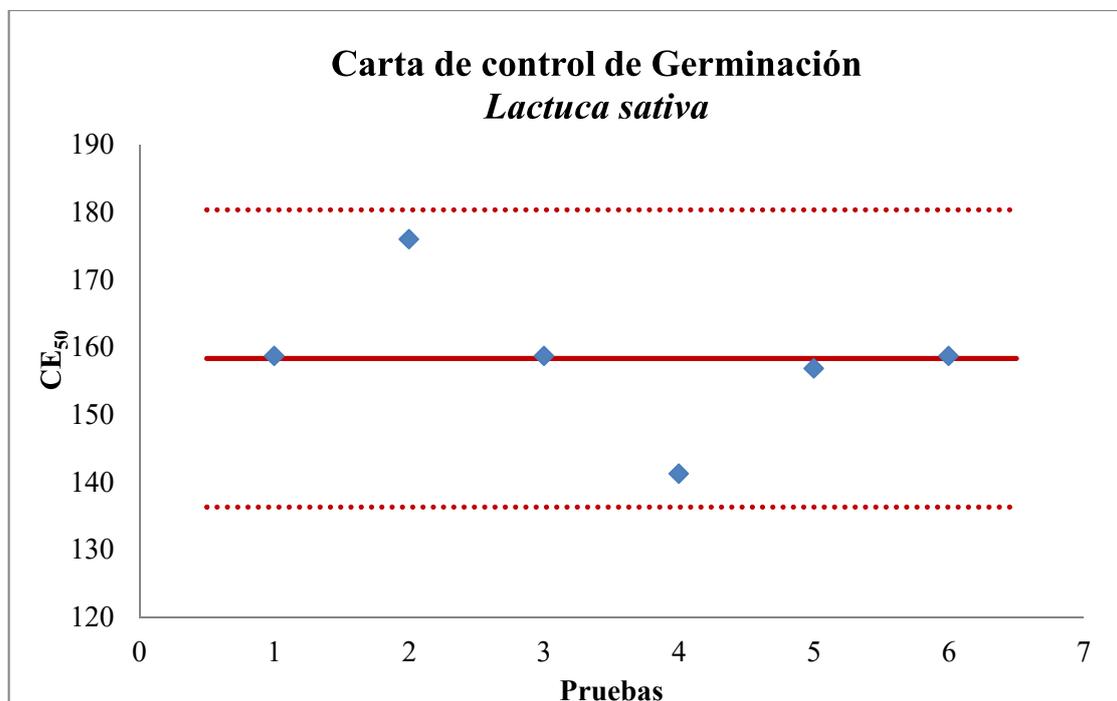


Figura 21: Carta control de Germinación de *Lactuca sativa*

Cuadro 26: Porcentaje de inhibición en radícula de *Lactuca sativa* al aplicarles concentraciones de sulfato de zinc (ZnSO₄)

Concentración (mg/l)	Radícula							Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Prom	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.021	6.5	6.4	7.5	6.3	6.4	5.0	6	1
0.21	16.1	13.9	16.7	15.4	15.9	16.0	16	1
2.1	23.0	22.8	22.4	24.9	26.2	24.5	24	1
21	49.3	48.8	49.9	49.7	50.4	51.4	49.9	0.9
210	79.7	77.3	81.6	77.9	75.9	78.1	78.4	2.0
2100	95.1	94.8	95.5	95.4	95.4	96.0	95	0
CE₅₀	13.0	15.1	11.4	13.5	13.6	12.8	13.2	1.2

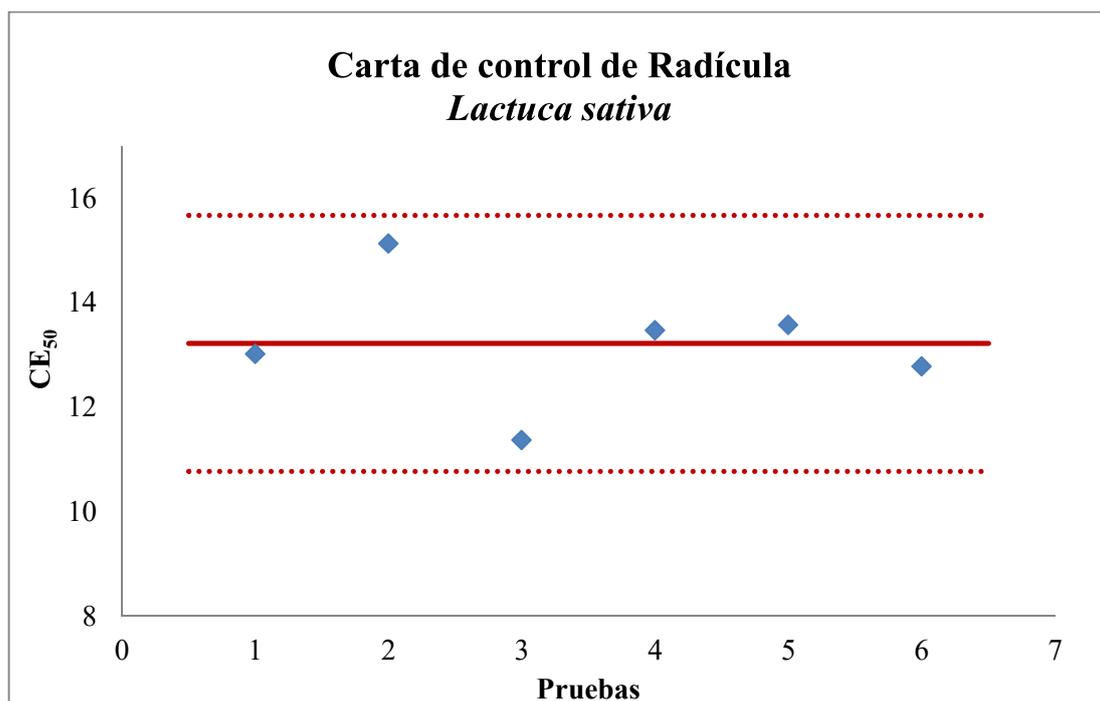


Figura 22: Carta control de Radícula de *Lactuca sativa*

Cuadro 27: Porcentaje de inhibición de hipocotilo de *Lactuca sativa* al aplicarles concentraciones de sulfato de zinc (ZnSO₄)

Concentración (mg/l)	Hipocotilo							Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Prom	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.021	10.4	8.4	8.4	9.1	12.2	9.8	10	1
0.21	16.2	14.3	14.7	19.8	21.9	20.3	18	3
2.1	24.1	25.3	25.9	25.4	28.1	24.7	26	1
21	51.4	49.8	50.2	48.6	50.7	50.4	50.2	0.9
210	70.1	68.9	72.2	67.4	69.0	70.8	69.8	1.7
2100	89.5	89.7	91.0	91.7	90.9	91.0	91	1
CE₅₀	18.2	19.9	16.9	17.2	13.2	15.1	16.7	2.3

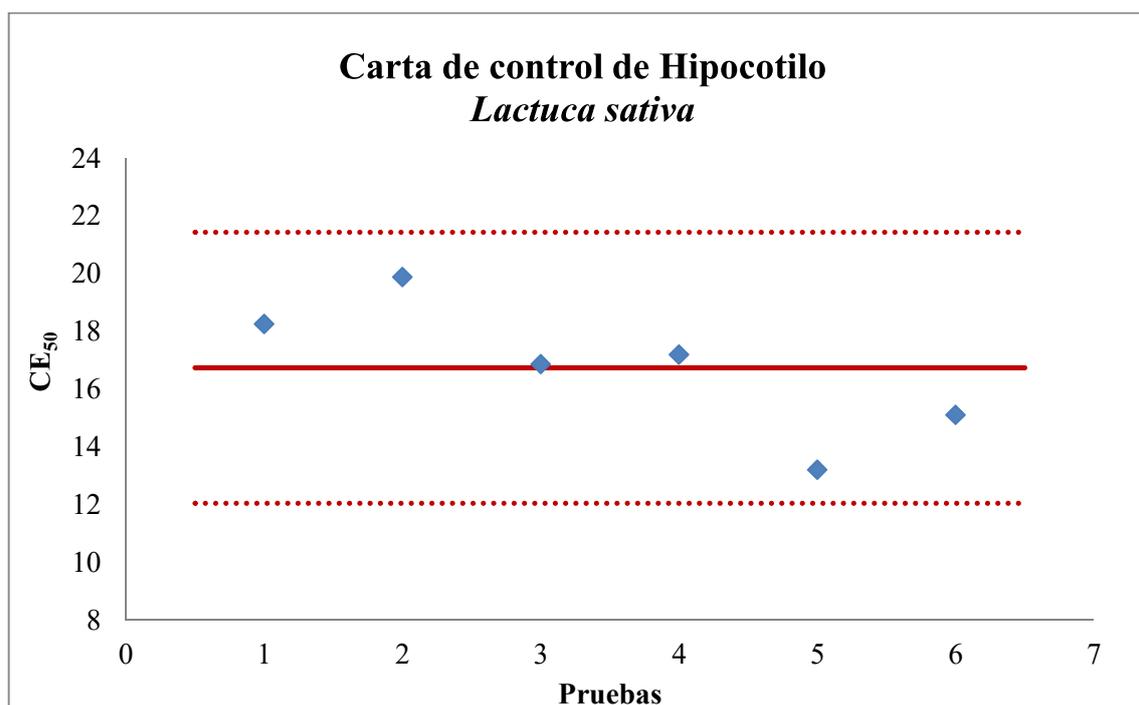


Figura 23: Carta control de Hipocotilo de *Lactuca sativa*

ANEXO 3: CONTROL POSITIVO PARA *Chlorella vulgaris*

Cuadro 28: Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Chlorella vulgaris* al usar dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Concentración V/V (%)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
0.027	-41.67	-41.73	-45.70	-32.58	-26.32	-34.63	-35.84	-52.97
0.27	-6.28	-5.66	-12.91	4.39	-0.37	-2.66	-3.75	-10.51
2.7	23.06	22.89	12.27	23.22	25.75	21.53	19.56	17.70
27	44.28	47.70	39.80	49.61	49.26	49.78	47.15	42.18
270	65.67	62.74	64.80	66.51	62.41	62.32	67.38	65.15
CE₅₀	52.99	53.53	73.75	41.56	51.26	53.70	49.71	63.561

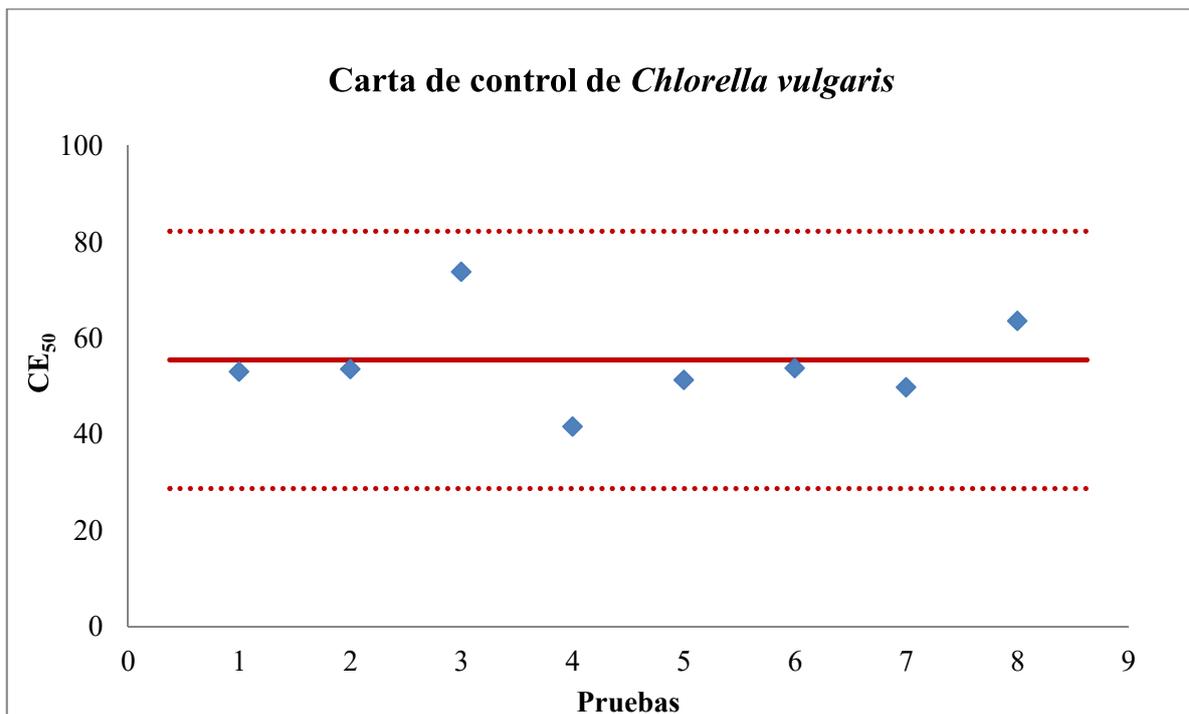
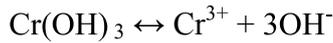


Figura 24: Carta control de *Chlorella vulgaris*

**ANEXO 4: ANÁLISIS DE LA PRECIPITACIÓN DEL HIDROXIDO DE CROMO
(Cr(OH)₃)**

Considerando que todo el cromo total esta en forma de Cr³⁺ la solubilidad es:

$$\text{Total}_{(\text{Cr})} = 1.46 \text{ mg/l}$$



$$K_{so} = [\text{Cr}^{3+}] [\text{OH}^-]^3$$

Complejos de los metales:



¿Precipitara el Cr (OH)₃ si Total_(Cr) = 1.46 mg/l = 10^{-4.553}M y pH = 8.4 ?

¿Cuál es [Cr³⁺] a pH 8.4, siendo que K_{so} = 10⁻³⁰?

$$\beta_1 = \frac{[\text{Cr(OH)}^{2+}]}{[\text{OH}^-][\text{Cr}^{3+}]} \rightarrow [\text{Cr(OH)}^{2+}] = \beta_1[\text{OH}^-][\text{Cr}^{3+}]$$

$$\beta_2 = \frac{[\text{Cr(OH)}_2^+]}{[\text{OH}^-]^2[\text{Cr}^{3+}]} \rightarrow [\text{Cr(OH)}_2^+] = \beta_2[\text{OH}^-]^2[\text{Cr}^{3+}]$$

$$\beta_3 = \frac{[\text{Cr(OH)}_3]}{[\text{OH}^-]^3[\text{Cr}^{3+}]} \rightarrow [\text{Cr(OH)}_3] = \beta_3[\text{OH}^-]^3[\text{Cr}^{3+}]$$

$$\text{Total}_{(\text{Cr})} = [\text{Cr}^{3+}] + [\text{Cr(OH)}^{2+}] + [\text{Cr(OH)}_2^+] + [\text{Cr(OH)}_3]$$

$$\text{Total}_{(\text{Cr})} = [\text{Cr}^{3+}] + \beta_1[\text{OH}^-][\text{Cr}^{3+}] + \beta_2[\text{OH}^-]^2[\text{Cr}^{3+}] + \beta_3[\text{OH}^-]^3[\text{Cr}^{3+}]$$

$$[\text{Cr}^{3+}] = \frac{\text{Total}_{(\text{Cr})}}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3}$$

$$[\text{Cr}^{3+}] = \frac{10^{-4.553}}{1 + 10^{10} \times 10^{-5.6} + 10^{18.38} \times (10^{-5.6})^2 + 10^{25.25} \times (10^{-5.6})^3}$$

$$[\text{Cr}^{3+}] = \frac{10^{-4.553}}{1 + 10^{4.4} + 10^{7.18} + 10^{8.45}}$$

$$[\text{Cr}^{3+}] = 9.427 \times 10^{-14} \text{ M}$$

$$\text{IAP} = [\text{Cr}^{3+}][(\text{OH})^{-}]^3$$

$$\text{IAP} = 9.427 \times 10^{-14} \times (10^{-5.6})^3 = 10^{-29.825}$$

IAP > K_{so} → Precipita

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA DETERMINAR EL NOEC Y LOEC

ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *Daphnia magna*

A. ANOVA para *Daphnia magna* en 24 horas de exposición

Para DE-1

H_1 : El número de daphnidos vivos en las concentraciones del efluente DE-1 es menor que el número de daphnidos vivos en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Inter-grupos	15,167	7	2,167	52,000	,000
Intra-grupos	,667	16	,042		
Total	15,833	23			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-1 en un periodo de 24 horas de exposición.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

(I) Con1	(J) Con1	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite superior
26,00	,00	,00000	,16667	,875	,4263
33,00	,00	,00000	,16667	,875	,4263
41,00	,00	,00000	,16667	,875	,4263
51,00	,00	,00000	,16667	,875	,4263
64,00	,00	,00000	,16667	,875	,4263
80,00	,00	-1,00000*	,16667	,000	-,5737
100,00	,00	-2,33333*	,16667	,000	-1,9070

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), siendo NOEC= 64% y el LOEC =80%.

Para DE-2

H_1 : El número de daphnidos vivos en las concentraciones del efluente DE-2 es menor que el número de daphnidos vivos en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	149,333	7	21,333	170,667	,000
Intra-grupos	2,000	16	,125		
Total	151,333	23			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-2 en un periodo de 24 horas de exposición.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

(I) Con2	(J) Con2	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite superior
1,50	,00	,00000	,28868	,875	,7384
3,00	,00	,00000	,28868	,875	,7384
6,00	,00	,00000	,28868	,875	,7384
12,00	,00	,00000	,28868	,875	,7384
25,00	,00	-,33333	,28868	,414	,4051
50,00	,00	-1,33333*	,28868	,001	-,5949
100,00	,00	-7,66667*	,28868	,000	-6,9283

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), siendo NOEC= 25% y el LOEC =50%.

Para DE-3

H_1 : El número de daphnidos vivos en las concentraciones del efluente DE-3 es menor que el número de daphnidos vivos en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2066,625	7	295,232	2361,857	,000
Intra-grupos	2,000	16	,125		
Total	2068,625	23			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-3 en un periodo de 24 horas de exposición.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

(I) Con2	(J) Con2	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite superior
1,50	,00	,00000	,28868	,875	,7384
3,00	,00	,00000	,28868	,875	,7384
6,00	,00	-1,00000*	,28868	,009	-,2616
12,00	,00	-4,00000*	,28868	,000	-3,2616
25,00	,00	-20,00000*	,28868	,000	-19,2616
50,00	,00	-20,00000*	,28868	,000	-19,2616
100,00	,00	-20,00000*	,28868	,000	-19,2616

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), siendo NOEC= 3% y el LOEC =6%.

B. ANOVA para *Daphnia magna* en 48 horas de exposición

Para DE-1

H_1 : El número de daphnidos vivos en las concentraciones del efluente DE-1 es menor que el número de daphnidos vivos en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	36.292	7	5.185	62.214	.000
Intra-grupos	1.333	16	.083		
Total	37.625	23			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-1 en un periodo de 48 horas de exposición.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

(I) Con1	(J)Con1	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite superior
26.00	.00	.00000	.23570	.875	.6029
33.00	.00	.00000	.23570	.875	.6029
41.00	.00	.00000	.23570	.875	.6029
51.00	.00	.00000	.23570	.875	.6029
64.00	.00	.00000	.23570	.875	.6029
80.00	.00	-1.33333*	.23570	.000	-.7304
100.00	.00	-3.66667*	.23570	.000	-3.0638

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), siendo NOEC= 64% y el LOEC =80%.

Para DE-2

H_1 : El número de daphnidos vivos en las concentraciones del efluente DE-2 es menor que el número de daphnidos vivos en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	870,000	7	124,286	331,429	,000
Intra-grupos	6,000	16	,375		
Total	876,000	23			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-2 en un periodo de 48 horas de exposición.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

(I) Con2	(J) Con2	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite superior
1,50	,00	,33333	,50000	,974	1,6123
3,00	,00	,00000	,50000	,875	1,2789
6,00	,00	,00000	,50000	,875	1,2789
12,00	,00	-,33333	,50000	,637	,9456
25,00	,00	-1,33333*	,50000	,041	-,0544
50,00	,00	-5,66667*	,50000	,000	-4,3877
100,00	,00	-18,33333*	,50000	,000	-17,0544

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), siendo NOEC=12% y el LOEC=25%.

Para DE-3

H_1 : El número de daphnidos vivos en las concentraciones del efluente DE-3 es menor que el número de daphnidos vivos en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2116,292	7	302,327	7255,857	,000
Intra-grupos	,667	16	,042		
Total	2116,958	23			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-3 en un periodo de 48 horas de exposición.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

(I) Con2	(J) Con2	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite superior
1,50	,00	,00000	,16667	,875	,4263
3,00	,00	-1,00000*	,16667	,000	-,5737
6,00	,00	-4,66667*	,16667	,000	-4,2404
12,00	,00	-20,00000*	,16667	,000	-19,5737
25,00	,00	-20,00000*	,16667	,000	-19,5737
50,00	,00	-20,00000*	,16667	,000	-19,5737
100,00	,00	-20,00000*	,16667	,000	-19,5737

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), siendo NOEC=1.5% y el LOEC=3%.

ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *Lactuca sativa*

A. Efluente DE-1

Análisis ANOVA

H_1 : La germinación, longitud de radícula y longitud de hipocotilo en las concentraciones del efluente DE-1 es menor que a germinación, longitud de radícula y longitud de hipocotilo en el control.

$$H_0 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Germina	Inter-grupos	,715	7	,102	7,792	,000
	Intra-grupos	6,183	472	,013		
	Total	6,898	479			
Radícula	Inter-grupos	8223,000	7	1174,714	25,878	,000
	Intra-grupos	21425,800	472	45,394		
	Total	29648,800	479			
Hipocotilo	Inter-grupos	8829,392	7	1261,342	27,306	,000
	Intra-grupos	21803,200	472	46,193		
	Total	30632,592	479			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-1.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

Variable dependiente	(I) Concen	(J) Concen	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
						Límite superior
Germina	26,00	,00	,00000	,02090	,875	,0491
	33,00	,00	,00000	,02090	,875	,0491
	41,00	,00	,00000	,02090	,875	,0491
	51,00	,00	,00000	,02090	,875	,0491
	64,00	,00	,00000	,02090	,875	,0491
	80,00	,00	,00000	,02090	,875	,0491
	100,00	,00	-,11667*	,02090	,000	-,0676
Radícula	26,00	,00	-1,60000	1,23009	,337	1,2874
	33,00	,00	-3,58333*	1,23009	,011	-,6959
	41,00	,00	-4,70000*	1,23009	,000	-1,8126
	51,00	,00	-6,28333*	1,23009	,000	-3,3959
	64,00	,00	-7,28333*	1,23009	,000	-4,3959
	80,00	,00	-9,65000*	1,23009	,000	-6,7626
	100,00	,00	-13,70000*	1,23009	,000	-10,8126
Hipocotilo	26,00	,00	4,23333	1,24088	1,000	7,1461
	33,00	,00	,31667	1,24088	,928	3,2294
	41,00	,00	-4,21667*	1,24088	,002	-1,3039
	51,00	,00	-5,71667*	1,24088	,000	-2,8039
	64,00	,00	-6,45000*	1,24088	,000	-3,5373
	80,00	,00	-7,56667*	1,24088	,000	-4,6539
	100,00	,00	-8,96667*	1,24088	,000	-6,0539

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y el LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto). Siendo para la germinación el NOEC=80% y LOEC=100%; para la radícula NOEC=26% y LOEC=33%; y para el hipocotilo NOEC=33% y LOEC=41%.

B. Efluente DE-2

Análisis ANOVA

H_1 : La germinación, longitud de radícula y longitud de hipocotilo en las concentraciones del efluente DE-1 es menor que a germinación, longitud de radícula y longitud de hipocotilo en el control.

$$H_0 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Germinación	Inter-grupos	101,458	7	14,494	820,943	,000
	Intra-grupos	8,333	472	,018		
	Total	109,792	479			
Radícula	Inter-grupos	84173,392	7	12024,770	730,581	,000
	Intra-grupos	7768,733	472	16,459		
	Total	91942,125	479			
Hipocotilo	Inter-grupos	44156,633	7	6308,090	621,868	,000
	Intra-grupos	4787,867	472	10,144		
	Total	48944,500	479			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-2.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

Variable dependiente	(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
						Límite superior
Germinación	1,50	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	3,00	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	6,00	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	12,00	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	25,00	,00	-,83333*	,02426	,000	-,7764
	50,00	,00	-1,00000*	,02426	,000	-,9431
	100,00	,00	-1,00000*	,02426	,000	-,9431
Radícula	1,50	,00	6,56667	,74070	1,000	8,3053
	3,00	,00	5,68333	,74070	1,000	7,4220
	6,00	,00	3,71667	,74070	1,000	5,4553
	12,00	,00	-6,45000*	,74070	,000	-4,7113
	25,00	,00	-22,11667*	,74070	,000	-20,3780
	50,00	,00	-24,66667*	,74070	,000	-22,9280
	100,00	,00	-25,96667*	,74070	,000	-24,2280
Hipocotilo	1,50	,00	2,95000	,58149	1,000	4,3149
	3,00	,00	2,23333	,58149	1,000	3,5983
	6,00	,00	,25000	,58149	,953	1,6149
	12,00	,00	-4,38333*	,58149	,000	-3,0184
	25,00	,00	-14,80000*	,58149	,000	-13,4351
	50,00	,00	-18,25000*	,58149	,000	-16,8851
	100,00	,00	-23,00000*	,58149	,000	-21,6351

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y el LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto). Siendo para la germinación el NOEC=12% y LOEC=25%; para la radícula NOEC=6% y LOEC=12%; y para el hipocotilo NOEC=6% y LOEC=12%.

C. Efluente DE-3

Análisis ANOVA

H_1 : La germinación, longitud de radícula y longitud de hipocotilo en las concentraciones del efluente DE-3 es menor que a germinación, longitud de radícula y longitud de hipocotilo es menor que en el control.

$$H_0 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Germinación	Inter-grupos	101,458	7	14,494	820,943 ,000
	Intra-grupos	8,333	472	,018	
	Total	109,792	479		
Radícula	Inter-grupos	87110,392	7	12444,342	756,073 ,000
	Intra-grupos	7768,733	472	16,459	
	Total	94879,125	479		
Hipocotilo	Inter-grupos	45140,133	7	6448,590	694,198 ,000
	Intra-grupos	4384,533	472	9,289	
	Total	49524,667	479		

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-3.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (<control)

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
	Concentración	Concentración				Límite superior
Germinación	1,50	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	3,00	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	6,00	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	12,00	,00	,00000	,02426	,875	,0569
	25,00	,00	-,83333*	,02426	,000	-,7764
	50,00	,00	-1,00000*	,02426	,000	-,9431
	100,00	,00	-1,00000*	,02426	,000	-,9431
Radícula	1,50	,00	6,56667	,74070	1,000	8,3053
	3,00	,00	5,68333	,74070	1,000	7,4220
	6,00	,00	3,71667	,74070	1,000	5,4553
	12,00	,00	-,45000	,74070	,660	1,2887
	25,00	,00	-22,11667*	,74070	,000	-20,3780
	50,00	,00	-24,66667*	,74070	,000	-22,9280
	100,00	,00	-25,96667*	,74070	,000	-24,2280
Hipocotilo	1,50	,00	2,95000	,55646	1,000	4,2562
	3,00	,00	2,23333	,55646	1,000	3,5395
	6,00	,00	,25000	,55646	,956	1,5562
	12,00	,00	-2,05000*	,55646	,001	-,7438
	25,00	,00	-14,80000*	,55646	,000	-13,4938
	50,00	,00	-18,25000*	,55646	,000	-16,9438
	100,00	,00	-23,00000*	,55646	,000	-21,6938

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y el LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto). Siendo para la germinación el NOEC=12% y LOEC=25%; para la radícula NOEC=12% y LOEC=25%; y para el hipocotilo NOEC=6% y LOEC=12%.

ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *Chlorella vulgaris*

A. Para DE-1

H_1 : La concentración de clorofila en las concentraciones del efluente DE-1 es mayor que la concentración de clorofila en el control.

$$H_0 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10486379,928	6	1747729,988	980,126	,000
Intra-grupos	24964,352	14	1783,168		
Total	10511344,280	20			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-1.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (>control)

(I) Concen	(J) Concen	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
17,00	,00	2236,86667*	34,47867	,000	2149,5590
24,00	,00	2155,28333*	34,47867	,000	2067,9757
34,00	,00	2047,00000*	34,47867	,000	1959,6924
59,00	,00	1763,68333*	34,47867	,000	1676,3757
70,00	,00	1699,90000*	34,47867	,000	1612,5924
100,00	,00	1634,63333*	34,47867	,000	1547,3257

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y el LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto). El NOEC no se pudo hallar y el LOEC= 17%.

B. Para DE-2

H_1 : La concentración de clorofila en las concentraciones del efluente DE-2 es mayor que la concentración de clorofila en el control.

$$H_0 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

$$H_1 = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6941792,778	6	1156965,463	611,630	,000
Intra-grupos	26482,543	14	1891,610		
Total	6968275,322	20			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-2.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (>control)

(I) Concen	(J) Concen	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
17,00	,00	1652,43333*	35,51160	,000	1562,5101
24,00	,00	1560,46667*	35,51160	,000	1470,5434
34,00	,00	1480,36667*	35,51160	,000	1390,4434
59,00	,00	1339,45000*	35,51160	,000	1249,5268
70,00	,00	1109,53333*	35,51160	,000	1019,6101
100,00	,00	479,11667*	35,51160	,000	389,1934

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y el LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto). El NOEC no se pudo hallar y el LOEC= 17%.

C. Para DE-3

H_a : La concentración de clorofila en las concentraciones del efluente DE-2 es mayor que la concentración de clorofila en el control.

$$H_0 = \mu_{control} > \mu_{tratamiento}$$

$$H_a = \mu_{control} < \mu_{tratamiento}$$

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6634371,225	6	1105728,537	677,800	,000
Intra-grupos	22838,883	14	1631,349		
Total	6657210,108	20			

La prueba de ANOVA indica que existe suficiente evidencia estadística a un nivel de significación de 0.05 para rechazar H_0 y aceptar H_1 . Por lo tanto se puede afirmar que existen diferencias significativas entre el control y al menos una de las concentraciones del efluente DE-3.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (>control)

(I) Concen	(J) Concen	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
17,00	,00	1388,40000*	32,97826	,000	1304,8917
24,00	,00	1326,10000*	32,97826	,000	1242,5917
34,00	,00	1097,66667*	32,97826	,000	1014,1584
59,00	,00	864,78333*	32,97826	,000	781,2751
70,00	,00	433,13333*	32,97826	,000	349,6251
100,00	,00	-75,65000	32,97826	1,000	-159,1583

A partir de la prueba POST-ANOVA se hallaron el NOEC (concentración más alta en la que no se presenta diferencia significativa con el grupo control) y el LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto). El NOEC no se pudo hallar y el LOEC= 17%.

RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS

ANEXO 8: RESULTADOS DE *Daphnia magna*

DE-1										
Concentraciones (%)	24 horas					48 horas				
	R1	R2	R3	OD (mgO₂/l)	pH	R1	R2	R3	OD (mgO₂/l)	pH
0	0	0	0	8.54	7.00	0	0	0	6.52	7.53
26	0	0	0	7.68	7.3	0	0	0	5.38	7.57
33	0	0	0	7.02	7.54	0	0	0	5.31	7.60
41	0	0	0	7.21	8.12	0	0	0	5.27	7.70
51	0	0	0	7.65	7.42	0	0	0	5.23	7.64
64	0	0	0	7.74	7.62	0	0	0	5.15	7.79
80	1	1	1	7.10	7.55	1	1	2	5.10	8.00
100	2	2	3	7.54	8.50	4	3	4	5.10	7.90

DE-2										
Concentraciones (%)	24 horas					48 horas				
	R1	R2	R3	OD (mgO₂/l)	pH	R1	R2	R3	OD (mgO₂/l)	pH
0	0	0	0	8.04	7.53	1	0	0	6.48	7.32
1.5	0	0	0	7.84	7.52	0	0	0	6.11	7.29
3	0	0	0	7.62	7.6	0	1	0	6.00	7.57
6	0	0	0	7.41	7.64	0	1	0	5.84	7.54
12	0	0	0	7.34	7.73	1	1	0	5.70	7.66
25	1	0	0	7.01	7.96	2	2	1	5.60	8.20
50	2	1	1	6.94	8.02	7	6	5	5.05	7.76
100	8	8	7	6.87	8.31	19	19	18	4.10	8.00

DE-3										
Concentraciones (%)	24 horas					48 horas				
	R1	R2	R3	OD (mgO₂/l)	pH	R1	R2	R3	OD (mgO₂/l)	pH
0	0	0	0	8.49	7.24	0	0	0	6.80	7.74
1.5	0	0	0	8.52	7.32	0	0	0	6.11	7.54
3	0	0	0	8.36	7.3	1	1	1	5.86	7.36
6	1	1	1	7.54	7.54	5	4	5	5.23	7.29
12	4	3	5	6.84	7.63	20	20	20	4.64	8.08
25	20	20	20	6.12	7.65	20	20	20	4.10	8.01
50	20	20	20	5.34	7.92	20	20	20	3.25	7.54
100	20	20	20	5.02	8.04	20	20	20	1.78	7.89

ANEXO 9: RESULTADOS DE *Lactuca sativa*

Concentración (%)	Germinación					Radicula					Hipocotilo				
	R1	R2	R3	Prom	Desv. Est.	R1	R2	R3	Prom	Desv. Est.	R1	R2	R3	Prom	Desv. Est.
	DE-1														
0	20	20	20	20	0	37	36	36.65	36.55	0.51	33.2	32.4	32.5	32.70	0.44
26	20	20	20	20	0	35	34.85	35	34.95	0.09	36.75	37.7	36.35	36.93	0.69
33	20	20	20	20	0	33.7	32.8	32.4	32.97	0.67	32.25	33.55	33.25	33.02	0.68
41	20	20	20	20	0	32.15	31.95	31.45	31.85	0.36	28.3	28.85	28.3	28.48	0.32
51	20	20	20	20	0	30.05	30.55	30.2	30.27	0.26	27.2	27.4	26.35	26.98	0.56
64	20	20	20	20	0	29	29.15	29.65	29.27	0.34	26.5	26.35	25.9	26.25	0.31
80	20	19	19	19.33	0.58	27.15	27.45	26.1	26.90	0.71	25.6	25.5	24.3	25.13	0.72
100	18	17	18	18	1	24.3	21.9	22.35	22.85	1.28	24.15	23.4	23.65	23.73	0.38
	DE-2														
0	20	20	20	20.00	0.00	21.85	22.3	22.75	22.30	0.45	24	24.7	24.6	24.43	0.38
1.5	20	20	20	20.00	0.00	26.3	26.75	26.05	26.37	0.35	29.5	28.45	28.65	28.87	0.56
3	20	20	20	20.00	0.00	24.55	24.45	24.25	24.42	0.15	27.05	26.15	25.95	26.38	0.59
6	20	20	20	20.00	0.00	23.15	23.05	23.4	23.20	0.18	25.25	25	24	24.75	0.66
12	20	20	20	20.00	0.00	18.95	19.1	19.3	19.12	0.18	23.5	22.8	23.2	23.17	0.35
25	20	20	20	20.00	0.00	14.7	13.85	15.9	14.82	1.03	19.95	20.5	21.25	20.57	0.65
50	16	16	17	16.33	0.58	9.8	7.95	9.85	9.20	1.08	17.85	16.9	17.25	17.33	0.48
100	11	11	12	11.33	0.58	6.4	5.6	6.75	6.25	0.59	9.5	9.25	9.25	9.33	0.14
	DE-3														
0	20	20	20	20.00	0.00	26	26.1	25.8	25.97	0.15	23.75	22.35	22.9	23.00	0.71
1.5	20	20	20	20.00	0.00	32.25	32.05	33.3	32.53	0.67	26.15	25.8	25.9	25.95	0.18
3	20	20	20	20.00	0.00	31.25	31.8	31.9	31.65	0.35	25.55	25.1	25.05	25.23	0.28
6	20	20	20	20.00	0.00	29.45	30.5	29.1	29.68	0.73	23.9	22.8	23.05	23.25	0.58
12	20	20	20	20.00	0.00	19.05	19.95	19.55	19.52	0.45	19	18.6	18.25	18.62	0.38
25	4	4	2	3.33	1.15	4.4	3.85	3.3	3.85	0.55	7.9	8.5	8.2	8.20	0.30
50	0	0	0	0.00	0.00	1.4	1.55	1.55	1.50	0.09	4.9	4.8	4.55	4.75	0.18
100	0	0	0	0.00	0.00	0	0	0	0.00	0.00	0	0	0	0.00	0.00

ANEXO 10: RESULTADOS DE *Chlorella vulgaris*

Concentración V/V (%)	DE1		DE2		DE3	
	Clorofila a (mg/m ³)	Promedio de Clorofila	Clorofila a (mg/m ³)	Promedio de Clorofila	Clorofila a (mg/m ³)	Promedio de Clorofila
0	1286.1		1134.8		1263.8	
0	1174.8	1217.8	1103.6	1128.8	1183.7	1235.6
0	1192.6		1148.1		1259.4	
17	3515.5		2776.8		2670.0	
17	3408.7	3454.7	2799.1	2781.3	2594.4	2624.0
17	3439.9		2767.9		2607.7	
24	3386.5		2603.3		2518.7	
24	3404.3	3373.1	2723.4	2689.3	2589.9	2558.8
24	3328.6		2741.2		2567.7	
34	3275.2		2625.5		2527.6	
34	3288.6	3264.8	2616.6	2609.2	2336.3	2400.0
34	3230.7		2585.5		2336.3	
49	2941.5		2509.8		2327.4	
49	2994.9	2981.5	2456.4	2468.3	2144.9	2165.7
49	3008.2		2438.6		2024.8	
70	2954.8		2167.2		2131.6	
70	2897.0	2917.7	2251.7	2238.4	1615.4	1812.6
70	2901.4		2296.2		1691.0	
100	2856.9		1610.9		1699.9	
100	2883.6	2852.5	1633.2	1607.9	1143.7	1335.0
100	2816.9		1579.8		1161.5	

PANEL FOTOGRAFICO

ANEXO 11: GALERÍA FOTOGRÁFICA



Figura 25: Botal donde se realizó el proceso de descencale



Figura 26: Sacado de la piel después del proceso de descencale



Figura 27: Cultivo de *Daphnia magna*



Figura 28: Diferencia de tamaño de los cultivo de *Daphnia magna*



Figura 29: Concentraciones preparadas para el ensayo con *Daphnia magna*



Figura 30: Inhibición de crecimiento (izquierda) y sin germinación (derecha)

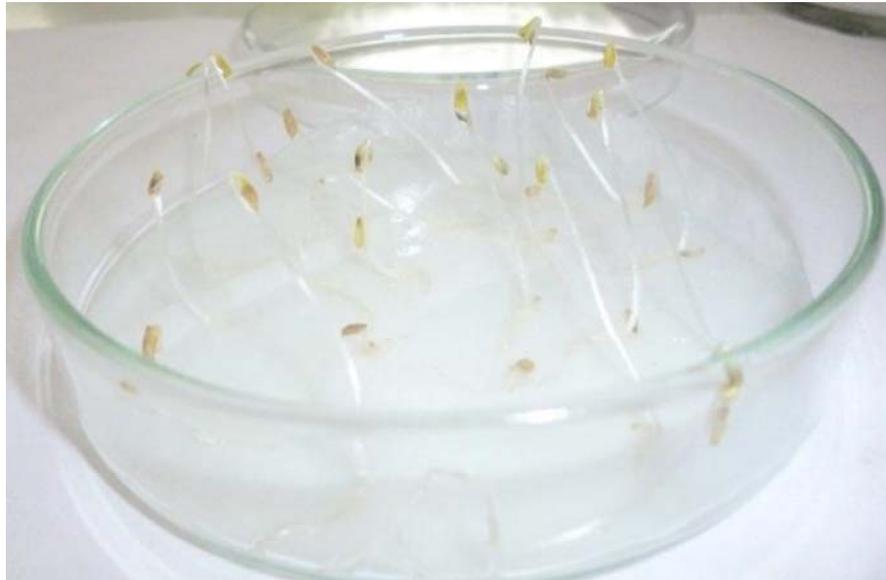


Figura 31: Crecimiento del hipocotilo y radícula de *Lactuca sativa*



Figura 32: Materiales usados para el bioensayo con *Lactuca sativa*



Figura 33: Tratamientos del efluente DE-2 y control +



Figura 34: Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en la cámara de incubación