

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**



**“TOXICIDAD DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE  
ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR MEDIANTE BIOENSAYOS CON  
*Daphnia pulex* y *Lactuca sativa* L”**

**Presentada Por:**

**GRECIA ALEJANDRA HUAMÁN LENCINAS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Lima Perú**

**2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**“TOXICIDAD DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN  
EL ESPINAR MEDIANTE BIOENSAYOS CON *Daphnia pulex* y *Lactuca  
sativa L*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**GRECIA ALEJANDRA HUAMÁN LENCINAS**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dra. Marta Williams León  
**PRESIDENTE**

M.Eng. María Cristina Miglio Toledo  
**PATROCINADOR**

Mg.Quim. Lizardo Visitación Figueroa  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Rosa Miglio Toledo  
**MIEMBRO**

## DEDICATORIA

*A mi madre María Esther, por sus esfuerzos para apoyarme a lograr este triunfo, por su inmenso amor, un amor que es el único puente entre lo visible y lo invisible, es la herencia de la creación, fuerza que nos entrelaza para condensar la experiencia esparcida.*

*A mi padre Juan Carlos Omar, por ser un ejemplo de lucha constante, por enseñarme a reinventarme cuando mis recursos parecían haberse agotado, por inspirarme a apostar por la excelencia personal e incentivarme a mirar el futuro con verdadero optimismo.*

*A mi hermana Omara Lua, para que le sirva de inspiración y siga adelante investigando en el campo de la Medicina Veterinaria, enseñándole al mundo la compasión elemental hacia nuestras criaturas prójimas, buscando solucionar problemas con ese gran don que Dios le dio “el poder de curar”.*

*A mi hermana Yulia Isabel, para que persista su andar por la senda de la sabiduría; pues necesitamos a los filósofos y a la filosofía para contribuir con la protección y conservación del medio ambiente y para mantener el equilibrio de la vida en la tierra.*

*A Grecia Alejandra, por tu evolución y aprendizaje en el proceso de lograr lo que creías inalcanzable. Para que pronto estés encaminada en una nueva aventura, estudiando tu doctorado. Conserva tu espíritu implacable y “Atrapa los vientos alisios en tus velas”.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi reconocimiento y agradecimiento:*

*A la Universidad Nacional Agraria La Molina, institución líder en agricultura, agroindustria, recursos naturales y medio ambiente, con una rica tradición de servicio al agro nacional, que me hace sentir orgullosa de haberme unido a las filas de profesionales molineros.*

*Al Instituto del Mar Peruano, institución orientada a la investigación científica por haberme permitido desarrollar mi tesis en sus instalaciones y haciendo uso de los equipos de última tecnología.*

*Al Blgo. Cesar Gamarra, coordinador de IMARPE – laboratorio Continental Puno, por sus aportes en el planteamiento del proyecto de investigación y al Ing. Humberto Siguyro por el apoyo y seguimiento en el desarrollo de la ejecución del proyecto.*

*Al Ing. Fernando Bravo, responsable del área de operación y mantenimiento de la planta de tratamiento de aguas residuales de EMSA Puno.*

*A la patrocinadora de mi tesis, Mg. Eng. María Cristina Miglio Toledo, por la confianza depositada, orientación y rigurosidad en el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación. Por haberme inculcado disciplina, una de las hebras doradas de la vida de gran éxito.*

*A los miembros del jurado: Dra. Martha Williams, Mg. Sc. Rosa Miglio Toledo y Mg. Quim. Lizardo Visitación, por los valiosos aportes, correcciones y lineamientos para enriquecer la presente investigación.*

*A mis compañeros Yafet Huamaní, Luis Huamán, Fernando Nuñez, David Huanco, Pamela Cardich, Yony Laqui, Vinicio Jaramillo, Alan García, Silvia Lozada y Melisa Ponce; quienes siempre me ofrecieron su respaldo, formando equipos de trabajo que nos permitieron cumplir con nuestros objetivos académicos.*

*A la memoria de mi amigo Manuel Buendía Buendía (Q.D.G. y E.P.D.), por su magnífica amistad y compañerismo.*

*A mis amigos Jaeson Calla y Halley Rodríguez, por su apoyo constante, motivación y aportes en la redacción de este documento.*

*A mis colegas Daniel Urbiola y Kelly Quispe, quienes me apoyaron en la ejecución del proyecto de investigación.*

*A mi gran amiga Marylia Albarracín, por su constante preocupación y soporte en los momentos más críticos en los que por un momento quise quedarme en el camino.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 SITUACIÓN DEL AGUA RESIDUAL EN EL PERÚ .....	4
2.1.1 MARCO LEGAL .....	5
2.2 PROBLEMÁTICA DEL AGUA RESIDUAL EN PUNO .....	7
2.3 LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN .....	8
2.3.1 LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR .....	10
2.4 TOXICIDAD .....	16
2.4.1 TOXICIDAD CRÓNICA.....	17
2.4.2 TOXICIDAD AGUDA .....	17
2.5 ENSAYOS TOXICOLÓGICOS.....	19
2.5.1 TIPOS DE BIOENSAYO SEGÚN SU TÉCNICA.....	19
2.6 BIOENSAYOS CON <i>Lactuca sativa L.</i> .....	20
2.7 BIOENSAYOS CON <i>Daphnia pulex</i> .....	21
2.8 ÍNDICE DE EFECTO TOXICOLÓGICO POTENCIAL (IETP).....	23
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO .....	26
3.2.1 TEMPORADAS DE MONITOREO .....	27
3.3 MATERIALES Y EQUIPOS .....	28
3.4 PUNTOS DE MUESTREO .....	29
3.5 TOMA DE MUESTRAS DE AGUA, PRESERVACIÓN, ETIQUETADO, ROTULADO Y TRANSPORTE.....	30
3.6 CARACTERIZACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO.....	33
3.7 PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA RESIDUAL .....	33
3.8 REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS .....	33
3.8.1 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>Lactuca sativa L.</i> .....	34
3.8.2 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>Daphnia pulex</i> .....	39
3.9 ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP) .....	47
3.10 PROPUESTA PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN AMBIENTAL DE LOS EFLUENTES VERTIDOS A LA BAHÍA INTERIOR DE PUNO .....	47

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>48</b>
4.1 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL EFLUENTE .....	48
4.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.....	50
4.3 SCREENING TEST .....	50
4.4 EFECTO DEL AFLUENTE Y DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR, SOBRE <i>Lactuca sativa L</i> EN AGOSTO Y NOVIEMBRE DEL 2015 .....	51
4.4 EFECTO DEL AFLUENTE Y DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR, SOBRE <i>Daphnia pulex</i> EN AGOSTO Y NOVIEMBRE DEL 2015 .....	62
4.6 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP) .	76
4.7 PROPUESTAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DE LOS EFLUENTES VERTIDOS EN LA BAHÍA DE PUNO .....	81
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Límites máximos permisibles para los efluentes PTAR vertidos a cuerpos de agua .....	6
Tabla 2: Clasificación de la incidencia de las unidades tóxicas.....	24
Tabla 3: Clasificación de la carga tóxica en función del Índice de Efectos Tóxicos Potenciales ....	25
Tabla 4: Ubicación de Puntos de Muestreo.....	30
Tabla 5: Condiciones recomendadas para pruebas de toxicidad aguda para Lactuca .....	38
Tabla 6: Condiciones recomendadas para las pruebas con Daphnia.....	42
Tabla 7: Parámetros físico- químicos del afluente y efluente según meses evaluados .....	49
Tabla 8: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto.....	51
Tabla 9: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto.....	54
Tabla 10: de la laguna de estabilización El Espinar en Promedio de longitud de hipocotilo y radícula en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente noviembre.....	56
Tabla 11: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre .....	58
Tabla 12: Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto .....	63
Tabla 13: Probabilidad de mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto .....	63
Tabla 14: Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones de efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto .....	65
Tabla 15: Probabilidad de mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto .....	66
Tabla 16: Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre.....	68
Tabla 17: Probabilidad de mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre .....	68
Tabla 18: Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre.....	70
Tabla 19: Probabilidad de mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre .....	70
Tabla 20: Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) de <i>Daphnia pulex</i> según zona y mes de evaluación...	72
Tabla 21: Determinación del IETP del efluente de la laguna de estabilización El Espinar .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Lagunas primaria y secundaria El Espinar.....	11
Figura 2: Efluente de la laguna de estabilización El Espinar .....	15
Figura 3: Croquis de la laguna de estabilización El Espinar .....	15
Figura 4: Morfología de la semilla y la plántula de <i>Lactuca sativa L</i> .....	20
Figura 5: Hembra grávida de <i>Daphnia pulex</i> .....	23
Figura 6: Ubicación de la Laguna de Estabilización El Espinar .....	26
Figura 7: Ubicación de los puntos de muestreo.....	31
Figura 8: Punto de muestreo 1 (PM1) .....	31
Figura 9: Punto de muestreo 2 (PM2) .....	32
Figura 10: Punto de muestreo 3 (PM3) .....	32
Figura 11: Preparación de las diluciones para los ensayos.....	35
Figura 12: Colocación de las semillas de <i>Lactuca sativa L</i> sobre placas petri.....	37
Figura 13: Montaje de la prueba definitiva con <i>Lactuca sativa L</i> .....	37
Figura 14: Esquema de plántula de <i>Lactuca sativa</i> para medida de elongación.....	38
Figura 15: Medición del elongación de la radícula e hipocotilo de <i>Lactuca sativa L</i> .....	39
Figura 16: Acuarios con cultivos de <i>Daphnia pulex</i> .....	40
Figura 17: Selección de neonatos para ensayos de toxicidad.....	41
Figura 18: Neonatos de <i>Daphnia pulex</i> .....	41
Figura 19: Agua de dilución para pruebas de toxicidad con <i>Daphnia pulex</i> .....	43
Figura 20: Screening test para toxicidad con <i>Daphnia pulex</i> .....	44
Figura 21: Montaje de las pruebas definitivas con <i>Daphnia pulex</i> en agosto .....	45
Figura 22: Montaje de las pruebas definitivas con <i>Daphnia pulex</i> en noviembre .....	45
Figura 23: Distribución de los tratamientos para pruebas de toxicidad con <i>Daphnia</i> .....	46
Figura 24: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto.....	52
Figura 25: Inhibición de crecimiento de hipocotilo y radícula (%) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto.....	53
Figura 26: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto.....	55



Figura 27: Inhibición de crecimiento de hipocotilo y radícula (%) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto.....	55
Figura 28: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre .....	57
Figura 29: Inhibición de crecimiento de radícula (%) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre .....	57
Figura 30: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre .....	59
Figura 31: Curva de Dosis- Respuesta de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto .....	64
Figura 32: Curva de Dosis- Respuesta de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto .....	66
Figura 33: Curva de Dosis- Respuesta de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre.....	69
Figura 34: Curva Dosis- Respuesta de <i>Daphnia pulex</i> sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre.....	71
Figura 35: Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) de <i>Daphnia pulex</i> según zona y mes de evaluación.....	72

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD .....	96
ANEXO II: SCREENING TEST .....	97
ANEXO III: EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	105
ANEXO IV: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	108
ANEXO V: RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS .....	117
ANEXO VI: PANEL FOTOGRÁFICO .....	121
ANEXO VII: PLANO DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.....	128

## RESUMEN

La bahía interior de Puno en el lago Titicaca recibe descargas de aguas residuales deficientemente tratadas de la Laguna de estabilización El Espinar y aguas residuales procedentes de conexiones clandestinas. Esta fuerte presión al ambiente acuático se está viendo reflejada en una progresiva contaminación y eutrofización de las aguas, así como el deterioro de un ecosistema de importancia cultural, social y económica para el poblador puneño. El objetivo de esta investigación fue determinar el grado de toxicidad del efluente considerando los meses de agosto y noviembre del año 2015. Para *Lactuca sativa* L. se evaluó la inhibición del crecimiento del hipocotilo y la radícula durante 120 h. Para *Daphnia pulex* se evaluó la mortalidad luego de 48 h de exposición, se halló la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), a partir de la cual se calculó el índice de efecto tóxico potencial (IETP). El resultado de los ensayos con *Lactuca sativa* L, mostró mayor inhibición del crecimiento a nivel de radícula en agosto frente a noviembre. En los ensayos con *Daphnia pulex*, los niveles de toxicidad del efluente fueron CL<sub>50</sub> 78.82% (agosto) y CL<sub>50</sub> 69.20% (noviembre), lo que podría estar asociado a la alta carga orgánica, elevados niveles de nitrógeno amoniacal y bajas concentraciones de oxígeno en el efluente. El efluente presentó una carga tóxica calificada como “considerable” tanto para agosto como para noviembre del 2015, lo que indican riesgo potencial de afectación directa a organismos sensibles de la cadena trófica y de forma global al ecosistema de la bahía interior del Lago Titicaca, así como un riesgo potencial para la salud pública siendo necesarias medidas de atención prioritaria a esta problemática ambiental. Finalmente se presentan propuestas para la mejora de la gestión de los efluentes vertidos en la bahía interior de Puno.

Palabras clave: *Daphnia pulex*, efluente, IETP, *Lactuca sativa* L, lago Titicaca, toxicidad aguda.

## ABSTRACT

The inner bay of Puno on Lake Titicaca receives discharges of poorly treated wastewater stabilization pond El Espinar and waste water from illegal connections. This strong pressure to the aquatic environment is being reflected in a progressive pollution and eutrophication and deterioration of an ecosystem of cultural, social and economic importance to the puneño villager. The objective of this research was to determine the toxicity of effluent considering the months of August and November from 2015. For *Lactuca sativa* L. was evaluated the growth inhibition of the hypocotyl and root during 120 h. For *Daphnia pulex* mortality was assessed after 48 h exposure, was determined the median lethal concentration (LC50), from which the rate of potential toxic effect (IETP) was calculated. The results of the tests with *Lactuca sativa* L, showed greater inhibition of root growth level in August compared to November. In tests with *Daphnia pulex*, levels of effluent toxicity were LC50 78.82 % (August) and LC50 69.20 % (November), which could be associated with high organic load, high levels of ammonia nitrogen and low oxygen concentrations in the effluent. The effluent presented a toxic load rated as "considerable" for August as well as for November 2015, indicating potential direct concern to sensitive organisms in the food chain and comprehensively risk to the ecosystem of the inner bay of Lake Titicaca as well as a potential risk to public health, being necessary measures of priority attention to this environmental problem. Finally proposals for improving the management of effluents discharged into the inner bay of Puno are presented.

Keywords: Acute toxicity, *Daphnia pulex*, effluent, IETP, *Lactuca sativa* L, Lake Titicaca, wastewater effluent.

## I. INTRODUCCIÓN

La bahía interior de Puno (BIP) es una área del lago Titicaca que se encuentra afectada por procesos de contaminación antrópica. Ha sido clasificada como hipereutrófica, debido a la contaminación orgánica de origen externo por el vertimiento de aguas residuales municipales crudas, inadecuadamente tratadas y aguas provenientes del drenaje pluvial de la ciudad de Puno. Presenta altas concentraciones de fosfatos (1.72mg/L) y nitrógeno total (2.39mg/L) que superan los valores de los estándares de calidad ambiental para agua (ECA) categoría 4 (ANA, 2014).

El problema de contaminación de la BIP se va intensificando debido al fuerte crecimiento de la población de Puno (según el Instituto Nacional de Estadística e Informática, 141 064 habitantes al 2015). Las concentraciones de carga orgánica, coliformes totales y coliformes termotolerantes encontradas, especialmente donde existe descargas de aguas residuales de poblaciones cercanas a la orilla del lago Titicaca, superan el ECA, por lo cual es necesario poner especial atención a estas zonas e implementar un sistema de monitoreo, a fin de descartar si se trata de fuentes de contaminación permanentes, que indican procesos de contaminación en las zonas poniendo en riesgo la estabilidad del ecosistema (MINAM, 2013).

La BIP recibe descargas directas de aguas residuales sin tratamiento. Así también la descarga de la laguna de estabilización El Espinar que según estudios del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente presenta serias deficiencias de funcionamiento por recibir cargas por encima de los caudales de diseño y falta de programas de mantenimiento (PNUMA,2011).

La BIP está sufriendo una progresiva contaminación y eutrofización de sus aguas. Es así que mientras que la biomasa de especies como *Lemna gibba* “lenteja de agua” se desarrolla en grandes cantidades por los aportes de nutrientes de las aguas residuales, habiendo cubierto en años recientes gran parte de la superficie de la bahía, otras especies de

importancia ecológica, económica, cultural y social como *Schoenoplectus totora* “totora”, ha venido decreciendo (IMARPE, 2013).

En la ciudad de Puno opera la empresa prestadora de servicio (EPS) EMSA Puno, la cual cuenta con un sistema de tratamiento de aguas servidas que fue diseñado para el tratamiento de aguas domiciliarias; sin embargo, hasta el año 2015 se disponían aguas de origen industrial y comercial; generándose problemas sobre todo con los componentes químicos y los aceites y grasas que hacen que el proceso de depuración sea poco eficiente (SUNASS, 2015).

Con este trabajo de investigación no planteamos las siguientes interrogantes: ¿Qué grado de riesgo toxicológico presenta el efluente tratado de la PTAR Puno sobre *Daphnia pulex* y *Lactuca sativa* L. en agosto y noviembre del 2015?

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el grado de toxicidad del efluente de la laguna de estabilización El Espinar con el uso de bioensayos en *Daphnia pulex* y *Lactuca sativa* L. en los meses de agosto y noviembre del 2015.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto del efluente de la laguna de estabilización El Espinar, sobre *Lactuca sativa* L en agosto y noviembre del 2015.
- Evaluar el efecto del efluente de la laguna de estabilización El Espinar, sobre *Daphnia pulex* en agosto y noviembre del 2015.
- Determinar el índice de efecto toxico potencial del efluente en la laguna de estabilización El Espinar.
- Elaborar propuestas para la mejora de la gestión ambiental de los efluentes vertidos a la bahía interior de Puno.

## FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

H<sub>1</sub> El efluente de la laguna de estabilización El Espinar presenta mayor toxicidad aguda sobre *Daphnia pulex*, en meses de menor precipitación como agosto que en noviembre.

H<sub>1</sub> El efluente de la laguna de estabilización El Espinar presenta mayor toxicidad aguda sobre *Lactuca sativa* L., en meses de menor precipitación como agosto que en noviembre.

H<sub>1</sub> El efecto tóxico potencial del efluente de la laguna de estabilización el Espinar es mayor en meses de menor precipitación como agosto que en noviembre.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 SITUACIÓN DEL AGUA RESIDUAL EN EL PERÚ**

Uno de los principales problemas ambientales en el Perú es la contaminación del agua y una de las fuentes de contaminación, es el vertimiento de aguas residuales de las poblaciones sin tratamiento o con sistemas de tratamientos deficientes el mismo que requiere ser evaluado; por lo que la recolección, el transporte y el tratamiento de aguas residuales son de gran importancia para la protección de la salud pública (Flores, 2014).

La Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS, 2014), ente regulador del sector agua potable y saneamiento en el Perú, indicó que la cobertura de agua y saneamiento alcanzó el 87.6% y 68.4% respectivamente. En calidad, solo el 42.4% de la población consume agua segura. El ámbito rural la cobertura de agua y saneamiento alcanzó 68.3% y 18.5%, respectivamente. El 98.5% de la población rural consume agua con inadecuado o sin ningún tratamiento y el 28.5% aún defeca al aire libre.

La tecnología de tratamiento de aguas residuales más común en el Perú es la de lagunas de estabilización sin desinfección química. Las lagunas tienen la capacidad de remover coliformes termotolerantes cuando se asegura un tiempo de retención mínimo del agua residual en ellas. Sobre la base de la experiencia de operación de las plantas de tratamiento y mediante el uso de modelos para lagunas con flujos dispersos, se determinó que si el período de retención es menor de 20 días, no se cumple el límite máximo permisible (LMP) de coliformes termotolerantes, además que los efluentes no reciben desinfección adicional (SUNASS, 2015).

El 37.9% de las plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR) a nivel nacional, presentan sobrecarga e incumplen las normas por falta de operación adecuada: presentan acumulación de arena y exceso de lodos. Esto trae como consecuencia la reducción de la



altura útil de la laguna, menor periodo de retención y disminución de la eficiencia de remoción de demanda biológica de oxígeno, coliformes fecales, huevos de helmintos y la emanación de olores (SUNASS, 2013).

### **2.1.1 MARCO LEGAL**

- Ley N° 29338, Ley de Recursos Hídricos.
- Ley N° 28611, Ley General del Ambiente.
- Ley N° 28245, Ley Marco del Sistema Nacional de Gestión Ambiental.
- Ley N° 29325, Ley del Sistema Nacional de Evaluación y Fiscalización Ambiental.
- Decreto Supremo N° 001-2010-AG, aprueba el Reglamento de la Ley N° 29338, Ley de Recursos Hídricos.
- Decreto Supremo N° 008-2005-PCM, aprueba el Reglamento de la Ley N° 28245, Ley Marco del Sistema Nacional de Gestión Ambiental.
- Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, aprueba los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.
- Decreto Supremo N° 023-2009-MINAM, aprueba disposiciones para la implementación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.
- Resolución Jefatural N° 202-2010-ANA, aprueba la clasificación de cuerpos de aguas superficiales y marino-costeros.
- Resolución Jefatural N° 489-2010-ANA, modifica el Anexo N° 1 de la Resolución Jefatural N° 202-2010-ANA referente a la clasificación de los cuerpos de agua marino-costeros.
- Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM, aprueba los Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales.
- Decreto Supremo N° 007-2010-AG, declara de interés nacional la protección de la calidad del agua en las fuentes naturales y sus bienes asociados.
- Resolución Jefatural N° 182-2011-ANA, aprueba Protocolo Nacional de Monitoreo de la Calidad de los Cuerpos Naturales de Agua Superficial.
- Resolución Jefatural N° 274-2010-ANA, dicta medidas para la implementación del Programa de Adecuación de Vertimiento y Reúso de Agua Residual – PAVER.
- Decreto Supremo N° 014-2011-MINAM, aprueba el Plan Nacional de Acción Ambiental – PLANAA PERÚ: 2011-2021.

- Decreto Supremo N° 012-2009-MINAM, aprueba la Política Nacional del Ambiente.
- Ley N° 29906, Ley que declara de Utilidad y Necesidad Pública la Prevención y Recuperación Ambiental Integral del Lago Titicaca y sus Afluentes. promulgada el 20 de julio del 2012.

A partir del 01 de abril del 2009 entró en vigencia la Ley de Recursos Hídricos (Ley N° 29338); que establece que la Autoridad Nacional del Agua es la responsable de la protección del agua como recurso hídrico. En este sentido, controla, supervisa y fiscaliza el cumplimiento de las normas de calidad del agua sobre la base de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para el Agua (ECA-Agua). Con la aprobación del D.S. N° 003-2010-MINAM entraron en vigencia, a partir del 17 de marzo del 2010, los Límites Máximos Permisibles (LMP) para efluentes de PTAR (Tabla 1).

Este decreto establece la obligatoriedad de los titulares de las PTAR a realizar el monitoreo de sus efluentes, considerándose válido únicamente el monitoreo realizado conforme al protocolo de monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. El Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento puede disponer asimismo el monitoreo de otros parámetros que no estén regulados en el Decreto Supremo cuando existan indicios razonables de riesgo a la salud humana o al ambiente.

**Tabla 1: Límites máximos permisibles para los efluentes PTAR vertidos a cuerpos de agua**

Parámetro	Unidad	LPM de efluentes
Aceites y grasas	mg/L	20
Coliformes termotolerantes	NMP/100ml	10 000
Demanda bioquímica de oxígeno	mg/L	100
Demanda química de oxígeno	mg/L	200
pH	Unidades	6.5-8.6
Sólidos totales en suspensión	mL/L	150
Temperatura	°C	<35

FUENTE: MINAM (2010)

En la Tabla 1, se muestran los parámetros que las EPS deben monitorear en los efluentes de manera mensual, sin embargo no se consideran LMPs para otros compuestos de naturaleza tóxica para el ecosistema.

## **2.2 PROBLEMÁTICA DEL AGUA RESIDUAL EN PUNO**

Las fuentes contaminantes puntuales de la Región de Puno en su mayoría corresponden a poblados que carecen de un óptimo sistema de tratamiento o evacúan sus aguas residuales sin tratamiento a los cuerpos de agua, casos como el de las principales ciudades como Puno y Juliaca, en las que los problemas de contaminación están relacionados con las deficiencias, diseño y capacidad de los sistemas de tratamiento; resultando en la disposición de cantidades notables de contaminantes al medio ambiente (PNUMA, 2011).

Para el año 2011, se evaluaron los sistemas de tratamiento de 34 poblaciones con más de 1000 habitantes, ubicadas en la cuenca del lago Titicaca (parte peruana); donde 26 de las 34 poblaciones cuentan con sistemas de tratamiento (lagunas de oxidación en su gran mayoría). Las poblaciones de Ajoyani, Asillo, Ayaviri y Desaguadero no las utilizan, sumándose al resto de los centros urbanos que evacúan sus aguas residuales en forma directa a los cuerpos receptores. Solamente 6 de los 34 sistemas de tratamiento cumplen con las regulaciones y procedimientos operacionales básicos y disposición final de las aguas residuales, que incluyen la limpieza de los componentes y mantenimiento del sistema (MINAM, 2013).

La caracterización y monitoreo de aguas residuales solo se desarrollan en las poblaciones de Puno y Juliaca a cargo de sus respectivas empresas prestadoras de servicios (EMSA Puno y SEDA Juliaca). La contribución de carga orgánica de Juliaca y Puno acumulan un 64.13% de la carga orgánica total generada hacia el ecosistema del Lago Titicaca. Los efluentes de los sistemas de tratamiento de aguas residuales de Puno y Juliaca superan los límites máximos permisibles para efluentes (MINAM, 2013).

Según estudios del PNUMA (2011) en la región Puno existen más de 20 lagunas de estabilización en diferentes ciudades. Estas presentan problemas: unas están colapsadas y otras presentan serias deficiencias de funcionamiento por recibir cargas por encima de los caudales de diseño y falta de programas de mantenimiento.

A nivel de la región Puno existen 05 Empresas Prestadoras de Servicios de Saneamiento: EMSA Puno S.A., SEDA Juliaca S.A., EMAPAY SRL, EPS NORPUNO S.A. y EPS Aguas del Altiplano SRL, para una población de 1´415,608 habitantes distribuidos en 13 provincias, siendo su cobertura de agua potable 59.6% y alcantarillado 37.9% (IPE, 2015).

El departamento de Puno, pertenece a la cuenca del Lago Titicaca, que se encuentra ubicada en la parte central y meridional de la meseta de Collao, en el altiplano del Perú y Bolivia, nace en la separación de las cadenas montañosas de los Andes al Sur Este del Perú. Este lago se alimenta de las precipitaciones pluviales, ubicadas en las zonas más altas de las cordilleras y manantiales subterráneas, cuya calidad de aguas es óptimo para diversos tipos de usos que caen en gran parte del territorio peruano y que discurren en forma de cursos de agua desde la Cordillera de los Andes, y van a alimentar al espejo de agua que tiene una extensión aproximada de 8 400 Km<sup>2</sup>, de los cuales 4 966 Km<sup>2</sup>, aproximadamente pertenecen al Perú (PNUMA, 2011).

La bahía interior de Puno, situada a 3810 m.s.n.m, con 14 km<sup>2</sup> de área aproximada presenta concentraciones de demanda bioquímica de oxígeno, coliformes totales y coliformes termotolerantes que evidencian que esta zona del lago se encuentran muy por encima de los parámetros permisibles, especialmente por descargas provenientes de la ciudad de Puno con 141 064 habitantes, identificándose una fuente de contaminación permanente y procesos de contaminación en las zonas litorales del lago Titicaca, que pone en riesgo la estabilidad del ecosistema (MINAM, 2013).

### **2.3 LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN**

Las lagunas de estabilización son tanques de baja profundidad construidos en tierra, donde las aguas residuales son tratadas por procesos naturales que involucran la participación de algas y bacterias. Los sistemas de tratamiento de agua residual tienen tres objetivos principales: a) la eliminación de coliformes fecales; b) la remoción de la materia orgánica, también llamada demanda bioquímica de oxígeno (DBO), y c) disminución de nutrientes: nitrógeno y fósforo. La eficiencia de remoción de la materia orgánica tiene como límites de temperatura superior e inferior de 37 y 4 grados; es decir, fuera de este rango, la actividad de las algas que producen oxígeno decrece de sobre manera (Cortez, 2015).

Las lagunas de estabilización pueden tratar aguas residuales a un alto nivel, tanto en la remoción de patógenos como en la de compuestos orgánicos, requiriendo mínimos recursos para su diseño, construcción, operación y mantenimiento. Con apropiado diseño y operación tienen la mejor eficiencia en la remoción de virus, bacterias, y especialmente huevos de helmintos y quistes de protozoarios.

Las lagunas de estabilización son los sistemas de tratamiento más sencillos de diseñar, construir, operar y mantener. Siendo la excavación la actividad principal en la construcción, así mismo la construcción de obras civiles es mínima: requiriendo solamente estructuras de ingresos, interconexiones, salidas y el revestimiento de los taludes interiores. La operación y mantenimiento consisten en tareas de rutina como el corte de vegetación en la orilla y en el dique, remoción de natas y sólidos flotantes, la medición diaria del caudal, y el monitoreo periódico del afluente y efluente (Oakley, 2011).

Las lagunas de estabilización tienen un largo tiempo de retención hidráulica medido en días; estas lagunas además tienen mucha más resiliencia a cargas orgánicas e hidráulicas altas, y a concentraciones altas de compuestos tóxicos. La principal desventaja de las lagunas de estabilización es el área requerida. Como una regla práctica, en los climas de América Central o en climas tropicales-subtropicales, se puede estimar que se necesitaría entre 2.0 y 2.5 hectáreas mínimas de lagunas para servir a una población de 10,000 habitantes (Oakley, 2011).

Rolim (2000) clasifica las lagunas de estabilización en: anaerobias, facultativas y de maduración o pulimiento.

- **Anaerobias.**- Las bacterias presentes no requieren oxígeno disuelto necesario para la descomposición de la materia orgánica; el proceso se conoce como digestión anaeróbica y depende en gran medida del tiempo de retención hidráulico. El tratamiento se realiza sin oxígeno disuelto y la profundidad recomendada para este tipo de lagunas es de 2.5 a 5m.
- **Facultativas.**- Presenta condiciones anaerobias en la parte inferior, una zona facultativa intermedia, y una capa aerobia en la parte superior. El tratamiento del agua residual es más complejo. Influyen factores importantes en el proceso:

radiación solar, sedimentación, potencial de hidrógeno elevado, altas concentraciones de oxígeno disuelto y tiempo de retención hidráulico entre otras.

La profundidad que se recomienda para este tipo de lagunas es de 1.5 a 2 m. La existencia de nutrientes en el agua residual, por ejemplo: nitrógeno, fósforo y carbono favorecen el desarrollo de algas; éstas producen oxígeno disuelto a través de la fotosíntesis. El oxígeno es utilizado por las bacterias aerobias para realizar la oxidación de la materia orgánica. Luego, las bacterias producen gas carbónico, mismo que es utilizado por las algas. Existe pues una relación simbiótica entre bacterias y algas.

- **Maduración o pulimiento.-** La principal función eliminación de los organismos patógenos. El tratamiento se lleva a cabo en condiciones aeróbicas. La profundidad que se considera en el diseño es de 0.90 a 1.5 m.

### **2.3.1 LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR**

La laguna el Espinar, con 2 unidades (laguna primaria y secundaria) fue construida en el año 1972, en áreas inundables en el extremo sur de la ciudad de Puno, entre la Isla El Espinar y el barrio Chanu Chanu frente al cuartel Manco Cápac a una altura de 3810 m.s.n.m. La referida laguna limita por el oeste con la Isla El Espinar, por el norte y el sur con la bahía interior de Puno. Al inicio de la puesta en marcha en el año 1972, la laguna de El Espinar trataba entre el 40 a 45% de las aguas servidas de la ciudad de Puno (EMSA Puno, 2011).

La laguna estuvo operativa hasta el año 1985. Posteriormente quedó inhabilitada a causa de la inundación por las lluvias que incrementaron el nivel del lago Titicaca. El año 1995 se rehabilitó la antigua planta de Espinar ampliando su capacidad de tratamiento hasta cubrir el 70 por ciento del total de las aguas servidas producidas por la ciudad de Puno (EMSA Puno, 2011).



**Figura 1: Lagunas primaria y secundaria El Espinar**

FUENTE: Elaboración propia (2015)

Ambas unidades, laguna primaria y secundaria, están separadas por un dique de 5.50 metros de ancho en la coronación (Figura 1). Así mismo, cuentan con las siguientes estructuras:

- Estructura de llegada - cámara de rejas
- Desarenador
- Medidor Parshall
- Estructuras de ingreso a laguna primaria
- Laguna primaria
- Estructuras de interconexión entre lagunas
- Laguna secundaria
- Estructuras de salida, recolección y disposición final

**a) Cámara de rejas**

Las aguas servidas llegan a la planta de tratamiento por medio de una tubería de concreto reforzado de 900 mm de diámetro. En la parte final del emisor se cuenta con una cámara de rejas ubicada sobre el dique de acceso a la laguna primaria. Esta cámara de rejas consta de dos canales, el canal principal fue construido sobre la tubería de 900 mm de diámetro, por lo que su ancho neto tiene esta misma dimensión, aunque en la parte superior es de 1.20 m. La profundidad es de 1.10 m y tiene un largo de 6.85 m de largo. El canal aliviadero (by pass) es de 1.20 m de ancho y trabaja cuando la pérdida de carga inducida por la reja es

muy elevada. A su vez, la criba de la cámara de rejas ha sido fabricada de varillas metálicas rectangulares de 6 x 6 x 25 mm y espaciados 25 mm entre elementos. La reja hace un ángulo de 60 grados con respecto a la horizontal y es limpiado por medio de un rastrillo y los desechos son descargados a un envase plástico para su disposición final. Todo este conjunto se encuentra encerrado en un ambiente sin techo de 4.17 x 8.35 m.

#### **b) Desarenador**

El desarenador se implementó en el año 2010. Consta de 02 unidades con la finalidad de facilitar la operación y mantenimiento. La limpieza es manual, de flujo horizontal y gravedad de concreto armado con las características geométricas siguientes:

Largo: 19.30 m.

Ancho: 1.25 m.

Altura inferior: 2.09m.

Altura superior: 3.15 m.

Forma, alargada y sección rectangular

Cada ingreso y salida cuenta con compuerta metálica tipo tarjeta accionado por manubrio.

#### **c) Medidor Parshall**

Se implementó en el año 2010, con 02 unidades de medidor de régimen crítico tipo parshall de concreto armado de las siguientes características geométricas, largo 3.04 m, W 0.63 m, altura 1.34m.

#### **d) Estructura de ingreso a laguna primaria**

La cámara de rejas descarga sus aguas a una tubería de 900 mm de diámetro en donde se tiene siete derivaciones de 300 mm de diámetro que descargan sobre el espejo de agua de la laguna primaria. En la zona de descarga, como consecuencia de la disminución de la velocidad de escurrimiento se han formado montículos de material sedimentable. Adicionalmente, por deficiencias en el sistema de distribución, el caudal de entrada no se reparte uniformemente trabajando solamente las tres primeras estructuras lo que conduce a la creación de áreas muertas dentro de la laguna de estabilización.

#### **e) Laguna primaria**

Ubicada en una cota promedio de 3 810.80 msnm tiene un área de 13.4 Has, con una profundidad promedio de 2.40 m dando un volumen útil de 303 050.21 m<sup>3</sup>.



El periodo de retención promedio es de 18.08 días en época seca, disminuyendo considerablemente en época de lluvia.

El 2011 se instalaron 16 aereadores tipo jet del tipo aspirante de eje inclinado con una potencia de 2 HP cada uno de ellos y montados sobre pontones para su flotación y 02 sopladores con una línea de 30 difusores de 25 HP, a fin de mejorar su funcionamiento.

Según el Plan Maestro Optimizado (PMO) 2012-2042, La capacidad de tratamiento de la laguna primaria (evaluada hasta el 2012), a una temperatura del agua residual de 12.30 °C, fue de 53% de remoción de carga orgánica, siendo la carga orgánica de ingreso 398.50 mg/L DBO<sub>5</sub> y la de salida 210.50 mg/L DBO<sub>5</sub>.

La concentración de coliformes fue de  $1 \times 10^7$  NMP/ 100 mL al ingreso y de  $7.67 \times 10^5$  NMP/ 100 mL en la salida de la laguna primaria. La remoción de coliformes termotolerantes se estimó en 2 ciclos logarítmicos.

#### **f) Estructuras de interconexión entre laguna primaria y secundaria**

Las estructuras de interconexión están conformadas por seis módulos equipados cada uno con un vertedero rectangular y una pantalla que permite retener el material flotante y el adecuado transvase de las aguas servidas tratadas a la laguna secundaria. El diámetro de las tuberías de interconexión es de 250 mm. La diferencia de cotas entre la laguna primaria y secundaria es mínima pero a pesar de ello, permite el flujo de la masa de agua de la laguna primaria hacia la secundaria (Figura 3).

#### **g) Laguna secundaria**

Tiene un área de 7.90 Has., con una profundidad promedio de 2 m y un volumen útil de 118 350 m<sup>3</sup> y para el caudal de ingreso de 168 lps.

La laguna secundaria cuenta con tres estructuras de salida con vertedero rectangular y pantalla. Estas estructuras descargan a una tubería de recolección de 800 mm de diámetro que la conduce hasta el extremo sur de la isla Espinar para su disposición final en la bahía interior de Puno. (EMSA PUNO, 2011).

El periodo de retención promedio es de 12.40 días en época seca, disminuyendo considerablemente en época de lluvia como consecuencia de la alta precipitación, se incrementan los caudales es así que ambas lagunas llegan a colmatarse.

Según el Plan Maestro Optimizado (PMO) 2012-2042, La capacidad de tratamiento de la laguna secundaria (evaluada hasta el 2012), a una temperatura del agua residual de 12.30°C, fue de 62 % de remoción de carga orgánica, siendo la carga orgánica de ingreso 210.50 mg/L DBO<sub>5</sub> y la de salida 80.00 mg/L DBO<sub>5</sub>.

La concentración de coliformes fue de  $7.67 \times 10^5$  NMP/ 100 mL al ingreso y de  $7.82 \times 10^4$  NMP/ 100 mL en la salida de la laguna primaria. La remoción de coliformes termotolerantes se estimó en 1 ciclo logarítmico.

En el año 2009 se realizó la limpieza de la laguna secundaria, haciendo dragado y remoción del lodo con el fin de mejorar la eficiencia de tratamiento biológico.

Debido a que el tiempo de retención en la primera laguna es de  $\pm 18$  días y en la segunda laguna es de  $\pm 13$  días cuya variación depende de la época del año; está demostrado que el agua residual no varía más del 10% de la toxicidad durante un periodo de 24 h (EPA, 2002).

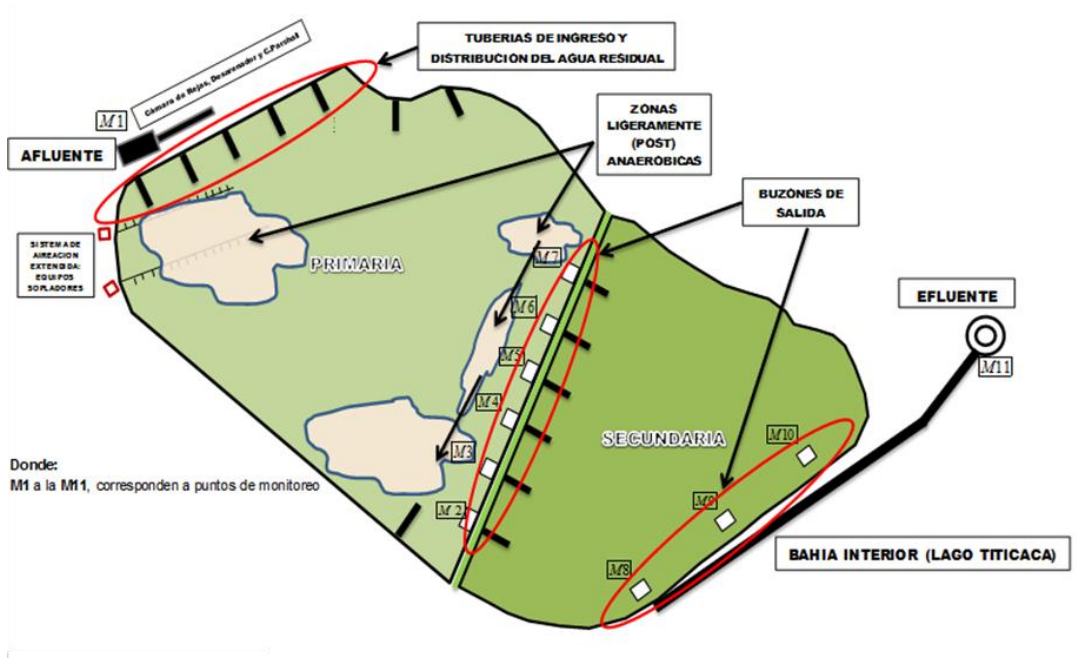
#### **h) Estructuras de salida, recolección y disposición final**

La laguna secundaria cuenta con tres estructuras de salida de características similares a las estructuras de interconexión es decir con vertedero rectangular y pantalla. Estas estructuras descargan a un emisario constituido por una tubería de recolección de 800 mm de diámetro que la conduce hasta el extremo sur de la isla Espinar para su disposición final en la bahía interior de Puno.



**Figura 2: Efluente de la laguna de estabilización El Espinar**

FUENTE: Elaboración propia (2015)



**Figura 3: Croquis de la laguna de estabilización El Espinar**

FUENTE: EMSA (2015)

## 2.4 TOXICIDAD

Se define toxicidad como los efectos adversos que causan en un organismo los contaminantes, generalmente un veneno o la mezcla de venenos. La toxicidad es el resultante de la concentración y del tiempo de exposición, modificado por variables como la temperatura, formas químicas y disponibilidad (APHA, 1992).

A nivel mundial el rápido aumento de la contaminación de origen industrial, municipal y agrícola es una importante amenaza para los hábitats acuáticos naturales, depósitos de agua para fines recreativos y suministros de agua potable. La multitud de toxinas orgánicas e inorgánicas no pueden ser ampliamente monitoreadas por el análisis químico. Como consecuencia de ello se han desarrollado una serie de bioensayos para evaluar los ecosistemas acuáticos mediante análisis de las respuestas bioquímicas y de comportamiento de los organismos como instrumentos de alerta temprana para detectar sustancias tóxicas potenciales en el agua (Häder *et al.*, 2015).

En la evaluación de la contaminación del agua los estudios de toxicidad son necesarios, ya que las pruebas físicas y químicas no resultan suficientes para la valoración de los potenciales efectos sobre la vida acuática (Tarzwell, 1971).

Es importante saber qué clase de impacto puede tener un efluente en un ecosistema receptor y los organismos asociados. Para evitar simulaciones extensas del laboratorio, algunos procedimientos estandarizados se han diseñado para probar los efectos tóxicos de compuestos o de efluentes químicos en organismos acuáticos seleccionados. Tales pruebas pueden también ser provechosas en la determinación de la toxicidad del agua de un cuerpo del agua, por ejemplo, siguiendo una descarga accidental de la contaminación (Persoone *et al.*, 2009).

Los análisis químicos son caros, requieren tiempo y a menudo no logran detectar toxinas debido a la gran cantidad de materiales potencialmente tóxicos; así mismo se puede subestimar la toxicidad de las mezclas de productos químicos que podrían actuar sinérgicamente. Además, los límites superiores de los contaminantes en los ecosistemas acuáticos varían entre lugares y condiciones climáticas y no siempre son representativas de la amenaza potencial para la biota (Häder *et al.*, 2015).

#### **2.4.1 TOXICIDAD CRÓNICA**

Es causada por las dosis muy bajas de un compuesto o de un efluente tóxico sobre un período de tiempo largo y puede ser mortal o sub-letal (no suficiente para causar la muerte). Los efectos sub-letales pueden ocurrir en el nivel bioquímico, fisiológico o del comportamiento, incluyendo mutagenicidad y genotoxicidad e interferencia con el ciclo vital normal de un organismo. Hay actualmente gran interés en los métodos para detectar toxicidad sub-letal como medios de la detección temprana para el daño ambiental (Nuñez *et al.*, 2005).

Estos bioensayos por lo general comprenden los periodos de gestación para hembras y de espermatogénesis para machos, así como tiempos pertinentes para evaluar el crecimiento individual o el aumento en biomasa de las poblaciones de organismos (Barile, 2008).

#### **2.4.2 TOXICIDAD AGUDA**

Es causada generalmente por la exposición a una dosis grande de un compuesto tóxico por un período de tiempo corto. Un efecto rápido se produce en los organismos, generalmente muerte, y esto se puede utilizar para determinar la concentración mortal de un excedente del compuesto o del efluente al período del tiempo dado. (Nuñez y Hurtado, 2005). Para controles de rutina de requisitos de descarga de vertidos permitidos se utilizan las pruebas de corta duración (APHA, 1992).

Las pruebas de muestras y de compuestos para la toxicidad bajo condiciones controladas del laboratorio son ampliamente utilizadas para la supervisión y el control de la contaminación. Las pruebas realizadas usando los efluentes indican un nivel referencial de lo dañino del efluente (Persoone *et.al.* 2009).

El tipo de prueba y la especie usada se deben elegir de acuerdo a la realidad de la zona a evaluar. Dependiendo del nivel de la información requerido para cualquier sustancia dañina, sintética, diversos acercamientos se pueden aplicar, por ejemplo: estudios de los efectos tóxicos de agentes contaminadores en organismos específicos, estudios de los efectos tóxicos de agentes contaminadores en poblaciones y biocenosis, el establecimiento de límites máximos permisibles de contaminantes (Persoone *et al.*, 2009).

El desarrollo científico y técnico de la prueba de la toxicidad es muy amplio, particularmente a pruebas que usan a organismos sensibles. Los ejemplos incluyen pruebas en los primeros ciclos de la vida con los peces y crustáceos (Tyagi *et al.*, 2007). Las pruebas de toxicidad son útiles para numerosos propósitos que incluyen toxicidad de los desechos sobre una determinada especie (APHA, 1992).

Las pruebas de toxicidad utilizan generalmente organismos vivos porque no se sabe cómo, y en qué parte del organismo puede actuar el contaminante. El uso de cultivos o de tejidos en evaluaciones de tóxicos no representa los efectos observados para el ambiente. Las sustancias que pueden afectar las células o los tejidos pueden nunca tener consecuencias significativas para el medio ambiente debido a que no penetran las barreras protectoras de los organismos vivos (Häder *et al.*, 2015).

Además los tipos particulares de células se pueden afectar solamente por compuestos específicos. El uso de organismos vivos asegura de que todos los efectos potenciales sobre el organismo puedan ser detectados y la prueba tenga una significación adecuada. Por lo tanto, para las aguas o los efluentes que contienen una mezcla de compuestos de la concentración desconocida, los bioensayos con organismos vivos son los más adecuados (Tyagi *et al.* 2007).

La toxicidad aguda es manifiesta por un efecto severo (a menudo muerte) sobre el organismo dentro de un corto plazo de exposición. Todos los contaminantes son capaces de ser tóxicos, dependiendo de su concentración, el organismo expuesto y de las condiciones ambientales de la exposición. En muchos casos, las concentraciones de las sustancias más bajas que el límite permisible pueden tener un efecto inhibitor en la capacidad reproductiva de un organismo o en el caso de cladóceros se evalúa la inmovilización (Persoone *et al.*, 2009).

#### **a. Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)**

Concentración de tóxico que produce la muerte del organismo, generalmente conocida como la concentración letal de la mediana (50 por 100) es decir la concentración que mata al 50% de los seres expuestos durante un tiempo de exposición específico (APHA, 1992).

El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como  $CL_{50}$  por concentración letal media. El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas  $DL_{50}$  (dosis letal media en 24h), esto con el fin de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo (Tyagi *et al.*, 2007).

La determinación de la  $CL_{50}$ , se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias o sustancias complejas como es el caso del agua residual, consideradas como mezclas ambientales (Nuñez *et al.*, 2005).

## **2.5 ENSAYOS TOXICOLÓGICOS**

Los ensayos de toxicidad son los ensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa, bajo condiciones experimentales específicas y controladas estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la relación de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Häder *et al.*, 2015).

En los últimos 30 años, en condiciones de laboratorio, se han utilizado ensayos de toxicidad con organismos de aguas continentales, estuarinas y marinas, con el objeto de evaluar y reconocer los efectos de xenobióticos sobre la biota acuática (Häder *et al.*, 2015).

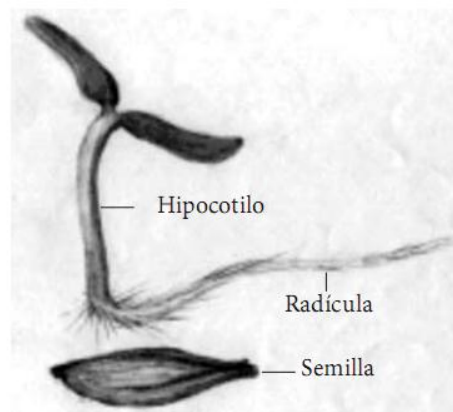
### **2.5.1 TIPOS DE BIOENSAYO SEGÚN SU TÉCNICA**

- Ensayos Estáticos: estos consisten en colocar cámaras de prueba o montajes de las soluciones que se vayan a utilizar en el ensayo y los organismos que se van a examinar. En estos ensayos, las soluciones siempre son las mismas.
- Ensayos semi-estáticos: en ellos se renueva periódicamente el medio de ensayo (ejemplo: una vez cada 24 horas).
- Ensayos de flujo continuo: en los que existe una renovación continua del medio de ensayo.

- Ensayos de reproducción: el período de exposición cubre al menos tres generaciones de los organismos de prueba. Permiten evaluar el comportamiento reproductivo como consecuencia de la exposición al tóxico.
- Ensayos de recuperación: en los que el período de exposición es seguido por la transferencia y observación de los organismos de prueba en un medio no tóxico (López, 2009).

## 2.6 BIOENSAYOS CON *Lactuca sativa* L.

La lechuga o *Lactuca sativa* L. es una planta con raíz pivotante y ramificada de unos 25 cm (Figura 4). El crecimiento se desarrolla en roseta; las hojas se disponen alrededor de un tallo central, corto y cilíndrico que gradualmente se va alargando para producir las inflorescencias, formadas por capítulos de color amarillo reunidos en corimbos. Según las variedades los bordes de las hojas pueden ser lisos, ondulados o aserrados. Las semillas están provistas de un vilano plumoso.



**Figura 4: Morfología de la semilla y la plántula de *Lactuca sativa* L**

FUENTE: Sobrero y Ronco (2004)

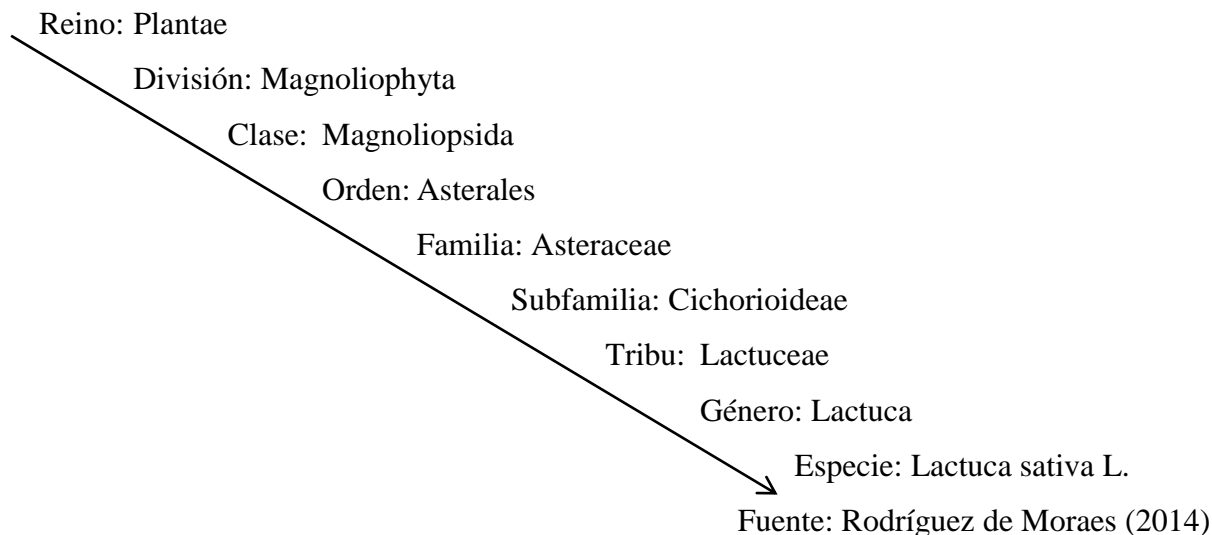
Se emplea *Lactuca sativa* L. como organismo de prueba para caracterizar el impacto de efluentes sobre el nivel trófico de las macrófitas y otras plantas tanto terrestres como acuáticas para complementar los análisis ambientales ya que los resultados se basan en la sensibilidad de las plantas cuando se exponen a muestras de suelo o sedimento, agua (aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales) (Plaza *et al.* 2005).



Si bien *Lactuca sativa* L. no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos (Sobrero *et al.*, 2010), ni una especie nativa del ecosistema en estudio, los resultados proporcionarán datos sobre el posible efecto del efluente de la laguna de estabilización sobre las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de la bahía interior del lago Titicaca. La prueba estática de toxicidad aguda tiene 120 h de exposición del organismo (*Lactuca sativa* L), donde se evalúa los efectos toxicológicos de mezclas complejas (agua residual) en el proceso de germinación de las semillas de lechuga.

En los bioensayos se suele determinar la inhibición de la germinación y en la elongación de la raíz y el hipocotito de la planta, ya que estos últimos constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta; esto 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 hipocotito (Sobrero *et al.*, 2010).

La clasificación taxonómica de la *Lactuca sativa* L.



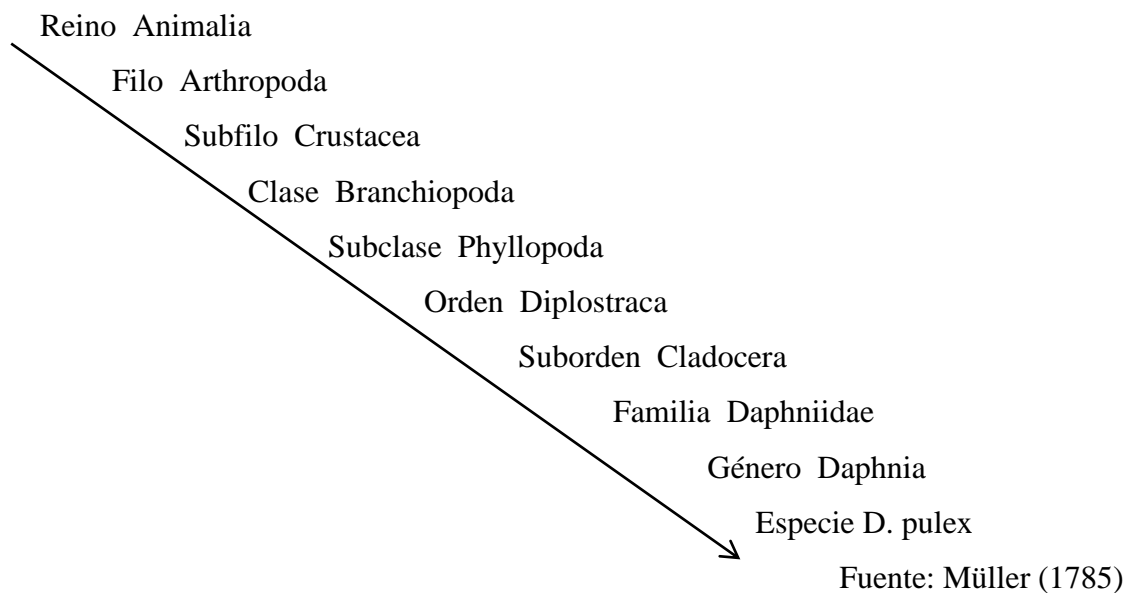
## 2.7 BIOENSAYOS CON *Daphnia pulex*

La pulga de agua o *Daphnia pulex* es un pequeño crustáceo cladócero (Figura 5). Vive en lagos y lagunas alimentándose principalmente de algas, es un organismo planctónico altamente sensible y sirviendo, a su vez, de alimento a los peces, así que una alteración en el ecosistema o un efecto en ellos afectará los demás eslabones de la cadena

trófica. Es un componente importante de las comunidades acuáticas y es sensible a un amplio rango de contaminantes. Su uso se encuentra estandarizado en numerosos protocolos y recomendado en las normas legislativas europeas y españolas, para la evaluación eco-toxicología de vertidos y residuos industriales y urbanos.

*Daphnia pulex* es el organismo ideal debido a que para estudiar los efectos de efluentes sobre los cuerpos de agua es preciso seleccionar especies representativas del área de desembocadura, especialmente especies cultivables en el laboratorio y cuyos métodos de evaluación hayan sido estandarizados (APHA, 1992).

La clasificación taxonómica de *Daphnia Pulex*:





**Figura 5: Hembra grávida de *Daphnia pulex***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

## **2.8 ÍNDICE DE EFECTO TOXICOLÓGICO POTENCIAL (IETP)**

El IETP fue desarrollado por Blaise y Férard. El índice permite la evaluación y comparación de la toxicidad potencial de los efluentes de aguas residuales como un único valor numérico que integra tanto el potencial tóxico y su flujo (Cahua *et al.*, 2014).

La estimación de las Unidades de Toxicidad (UT) para evaluar la toxicidad del vertido del efluente de la PTAR Puno, se corresponde con la siguiente fórmula:

$$UT = 100/(CL_{50})$$

Donde el valor de  $CL_{50}$  está expresado como porcentaje del efluente en agua de dilución.

La UT definida para:

$$UT_a = \text{Unidad de Toxicidad aguda}$$

El cálculo de la carga tóxica, en la que se considera, el caudal del efluente, se corresponde con la siguiente fórmula:

$$\text{Carga Tóxica (UT)} = (100/CL_{50}) Q$$

Dónde:

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media (concentración del efluente que produjo la mortalidad del 50% de los organismos expuestos en un período de 48 horas).

Q: Caudal promedio del efluente (m<sup>3</sup>/día)

CT: Carga Tóxica, expresada en unidades tóxicas.

Se expresa el Nivel de Incidencia Toxicológico (Tabla 2) basado en Unidades de Toxicidad.

**Tabla 2: Clasificación de la incidencia de las unidades tóxicas**

Nivel de Incidencia	Unidades Tóxicas
No tóxico	<1
Levemente tóxico	1-1.3
Moderadamente tóxico	1.3-2
Tóxico	2-4
Muy tóxico	>4

FUENTE: Ramírez (2003)

IETP se calcula 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

$[n(\sum T_i/N)Q]$ : Carga tóxica

n: número de bioensayos que exhiben la respuesta tóxica

T<sub>i</sub>: número de UT generada por cada bioensayo

N: número máximo de respuestas medibles

Q: caudal promedio del efluente (m<sup>3</sup>/día)

Obtenido el valor del IETP se clasifica el efluente según el Tabla 3.

**Tabla 3: Clasificación de la carga tóxica en función del Índice de Efectos Tóxicos Potenciales**

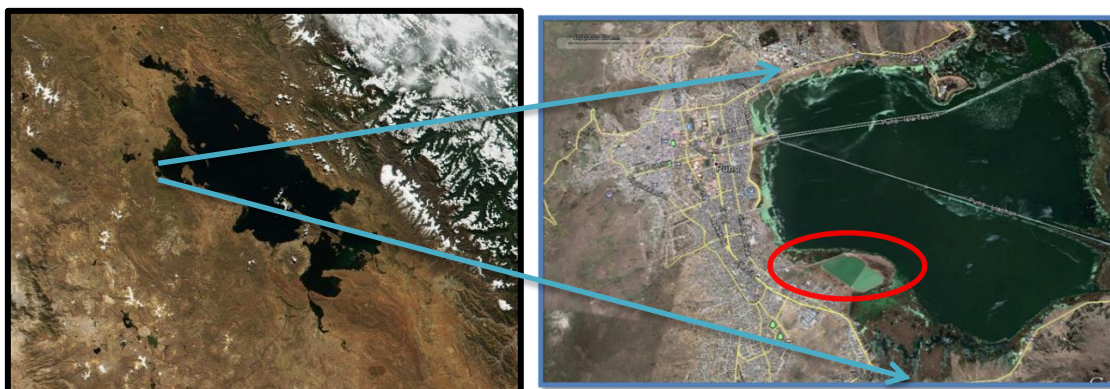
Clasificación de la carga tóxica	Valor IETP
Carga tóxica Despreciable	< 1.99
Carga tóxica Reducida	2-2.99
Carga tóxica Moderada	3-3.99
Carga tóxica Considerable	4-4.99
Carga tóxica Elevada	> 5

FUENTE: Escobar (2008)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

La Investigación se llevó a cabo en el Instituto del Mar Peruano, sede Puno. Para el estudio se recolectó muestras de agua residual de la laguna de estabilización El Espinar, la cual se ubica en el extremo sur de la ciudad de Puno, entre la Isla Espinar y los Barrios de Chanu-Chanu frente al cuartel Manco Cápac a una altura de 3810 m.s.n.m. en las coordenadas geográficas Latitud 15°51'6.03"S - Longitud 70° 0'25.05"O (Figura 6).



**Figura 6: Ubicación de la Laguna de Estabilización El Espinar**

FUENTE: Google Earth (2015)

#### 3.2 DELIMITACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL

El trabajo de investigación, se llevó a cabo durante los meses de agosto y en noviembre del 2015.

Inicialmente se tomaron muestras de agua residual, que sirvieron para los ensayos previos (screening test). Luego conjuntamente con el monitoreo de la calidad del

efluente, realizado por el personal de la empresa EMSA Puno, se recolectó el agua utilizada en los bioensayos.

Los bioensayos se realizaron en el laboratorio del Instituto del Mar Peruano IMARPE sede Puno, las pruebas preliminares duraron aproximadamente 3 semanas, tiempo necesario para hacer la calibración del experimento y definir las diluciones para cada tratamiento; en el caso de *Daphnia pulex* se realizaron ensayos de toxicidad aguda por 48 horas, para el caso de *Lactuca sativa L.* se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de radícula e hipocótilo por 120h.

### **3.2.1 TEMPORADAS DE MONITOREO**

Para la primera etapa de la investigación se consideró el mes de agosto del 2015. Agosto fue de características húmedas con presencia de cobertura de nubes y lluvias frecuentes, la precipitación acumulada se encontró ligeramente superior a su promedio histórico. Considerándose que hubo días muy lluviosos para la temporada (37.00 mm). El nivel de radiación solar fue de 390 cal/cm<sup>2</sup> (SENAMHI, 2015).

Las temperaturas ambientales máximas para el mes agosto estuvieron ligeramente por encima del promedio histórico. Dichas temperaturas oscilaron entre los 15 y 21°C en promedio en la mayoría de las estaciones en el altiplano. El promedio de temperaturas mínimas para el mes estuvieron por encima de su promedio normal. La temperatura más baja registrada en el mes fue -20.6°C. Durante el mes se presentó un evento de helada entre los días 9 al 11 y del 25 al 28 descendiendo las temperaturas mínimas (SENAMHI, 2015).

Para la segunda etapa de la investigación se consideró el mes de noviembre del 2015, en el cuál se presentaron mayores precipitaciones; cabe resaltar que noviembre fue un mes con déficit de lluvias, se presentó cobertura de nubes y lluvias frecuentes al centro y norte del altiplano. Los días con mayor precipitación generalizada en el altiplano se centraron entre el 5 al 12 (40.90 mm). Las temperaturas máximas estuvieron por encima de su promedio normal oscilando entre los 13 y 29°C. El nivel de radiación solar fue de 596 cal/cm<sup>2</sup> (SENAMHI, 2015).

Según ENFEM (2015), la influencia del fenómeno de El niño implicó reducción de las lluvias especialmente en la sierra sur. A nivel nacional hubo variabilidad climática por influencia del fenómeno de El niño generando un comportamiento anormal del clima reflejado en muchos factores como las precipitaciones.

### **3.3 MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **a. Material biológico**

- *Daphnia pulex* (neonatos)
- *Lactuca sativa L* (semillas)

#### **b. Materiales de laboratorio**

- Acuarios de 3L de capacidad
- Vaso de precipitado de 2000, 1000 y 600 mL
- Envases de plástico o vidrio (batería de 20)
- Bidones de 20 litros
- Pipetas volumétricas, peras para pipetas
- Matraz kitasato de 2L
- Platos para pesar reactivos
- Espátulas
- Hielera y hielo/ geles refrigerantes
- Puntas de micropipetas
- Matraz aforado
- Botellas de vidrio boca ancha 1L
- Papel filtro
- Embudo de vidrio
- Placas Petri
- Pinza
- Bolsa plástica
- Regla
- Papel milimetrado
- Materiales de toma de muestra
- Botellas de plástico de boca ancha de 1L
- Botellas de vidrio de boca ancha de 1L
- Guantes de latex



- Barbijo
- Botas de agua
- Ropa de campo impermeable

**c. Equipos**

- Ph-metro modelo 730 marca WTW
- Conductímetro Multiparámetro Hanna HI 9828
- Microscopio modelo CX41 marca Olympus
- Balanza analítica modelo ABK-120 marca Digital Precision
- Multiparámetro Hanna HI 9828
- Termómetro de mercurio, con precisión de 0,1 °C
- Mechero Bunsen
- GPS marca GARMIN
- Incubadora modelo FOC 225E marca Velp Científica
- Estereoscópio modelo EM28TR marca MEIJI Techno
- Refrigeradora modelo EC302NBHW marca Electrolux
- Destilador modelo 10783996J marca GFL
- Bomba al vacío modelo 326629905 marca Vacuubrand

**d. Reactivos**

- Dicromato de potasio  $K_2Cr_2O_7$
- Sulfato de Zinc  $ZnSO_4$

### **3.4 PUNTOS DE MUESTREO**

Los puntos de muestreo fueron establecidos según el protocolo de monitoreo de efluentes. Para las evaluaciones en agosto del 2015, se consideraron 3 puntos de muestreo (Tabla 4); para conocer la toxicidad del afluente (agua sin tratar) denominado PM1 (Figura 8); efluente tratado denominado PM2 (Figura 9), así mismo se consideró un tercer punto de muestreo para evaluar el efluente a 50 m del emisario (en el cuerpo receptor) denominado PM3 (Figura 10).

Se realizaron 3 muestreos durante el mes de agosto, el muestreo final se realizó el 31 de agosto a horas 12:30 pm.

Para las evaluaciones en noviembre del 2015, solo se tomaron muestras en 2 puntos de muestreo debido a que en las evaluaciones de agosto, correspondientes al punto 3 (ubicado a 50 metros de emisario) era una zona de mezcla en la que se da una dilución completa del efluente; por lo tanto los ensayos realizados con diluciones a partir de esa muestra no tuvieron respuesta de mortalidad para el caso de *Daphnia pulex*, ni respuesta de inhibición de crecimiento de radícula o hipocótilo para el caso de *Lactuca sativa L.*

Se realizaron 3 muestreos durante el mes de noviembre, el muestreo final se realizó el día 27 de noviembre a horas 11:15am.

### **3.5 TOMA DE MUESTRAS DE AGUA, PRESERVACIÓN, ETIQUETADO, ROTULADO Y TRANSPORTE**

La recolección de las muestras ambientales se realizó en recipientes plásticos de cuatro litros (4) de capacidad, que previamente fueron etiquetados y rotulados con plumón de tinta indeleble y cubiertos con cinta adhesiva. Así mismo las muestras fueron tomadas de acuerdo al protocolo de monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. Una vez tomadas las muestras, se transportaron en cajas de almacenamiento térmicas hacia el laboratorio del Instituto del Mar Peruano (IMARPE) sede Puno, donde se conservaron en una refrigeradora modelo EC302NBHW marca Electrolux a  $\pm 4^{\circ}$  C.

**Tabla 4: Ubicación de Puntos de Muestreo**

Agosto	Noviembre	Longitud	Latitud	Característica
PM1	PM1	70° 00' 24.7"O	15° 51' 04.3" S	Agua cruda- Afluente
PM2	PM2	69° 59' 54.0" O	15° 51' 09.8" S	Efluente (emisario)
PM3	-	69° 59' 51.6" O	15° 51' 10.5" S	A 50 metros del emisario

FUENTE: Elaboración propia (2015).



**Figura 7: Ubicación de los puntos de muestreo**

Fuente: Elaboración propia (2016)



**Figura 8: Punto de muestreo 1 (PM1)**

FUENTE: Elaboración propia (2015)



**Figura 9: Punto de muestreo 2 (PM2)**

FUENTE: Elaboración propia (2015)



**Figura 10: Punto de muestreo 3 (PM3)**

FUENTE: Elaboración propia (2015)

### **3.6 CARACTERIZACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO**

Los puntos de muestreo cumplieron con las siguientes características:

- Permitieron que la muestra sea representativa del flujo.
- El PM1 estuvo localizado en un punto donde existió una mejor mezcla y estuvo ubicado cerca al punto del aforo.
- El PM2 estuvo ubicado en el emisario, de acceso fácil y seguro, evitando caminos empinados, rocosos, vegetación densa y fangos.
- El PM3 estuvo ubicado en el cuerpo receptor, a 50 metros del emisario, en el área que corresponde a la bahía interior del Lago Titicaca, el acceso fue en bote motorizado (Figura 7).

### **3.7 PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA RESIDUAL**

Los parámetros sujetos al muestreo de los efluentes de la PTAR fueron los establecidos en el D.S. N°003-2010 que fija los límites máximos permisibles para efluentes de PTAR vertidos a cuerpos de agua. Se tomaron los resultados de los monitoreos mensuales que realiza la empresa EMSA Puno correspondientes a los meses de agosto y noviembre del año 2015.

La toma de muestras para las evaluaciones toxicológicas se realizó el mismo día en que se realizaron los monitoreos mensuales de la empresa EMSA Puno.

Dónde evaluaron los parámetros físico-químicos como: La demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), demanda química de oxígeno (DQO), pH, temperatura, conductibilidad eléctrica, salinidad, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos totales disueltos (TDS), oxígeno disuelto (OD), nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total, fósforo como ortofosfato, fósforo total. Así también realizaron ensayos microbiológicos, evaluando: coliformes totales y coliformes termotolerantes (Anexo III-C).

### **3.8 REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS**

Para realizar los bioensayos se siguió los lineamientos de la USEPA (2002): así como la guía de Castillo (2004).

### **3.8.1 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON *Lactuca sativa* L.**

#### **a. Organismo de prueba**

Se adquirieron las semillas de *Lactuca sativa* L. del Centro de investigación de Hidroponía y Nutrición Mineral de la Universidad Nacional Agraria la Molina; libres de fungicidas o plaguicidas. Las semillas seleccionadas se almacenaron cerradas herméticamente, en oscuridad y en un ambiente seco.

#### **b. Control del organismo de prueba**

Para establecer si los individuos del cultivo tenían las condiciones fisiológicas óptimas para el desarrollo de pruebas de toxicidad, fue necesario hacer un seguimiento de la sensibilidad de las semillas de lechuga, empleando tóxicos de referencia, el control de estas características permitió respaldar la aceptabilidad de las siguientes pruebas.

##### **- Prueba de sensibilidad**

Se realizaron pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia Sulfato de Zinc ( $ZnSO_4$ ), a diferentes concentraciones en el rango de 0.001 -10 mg/L, se evaluó la sensibilidad de las semillas simultáneamente a las pruebas preliminares.

#### **c. Pruebas preliminares (Screening test)**

##### **- Agua de dilución**

Se empleó agua destilada para el tratamiento control así como para hacer las diluciones para cada tratamiento (Gonzales, 2012).

##### **- Preparación de las diluciones**

Inicialmente se prepararon 6 diluciones de cada muestra con un factor de dilución de 0.5 para obtener valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0 por ciento (Figura 10). Posteriormente se prepararon otras diluciones en base al primer screening test (Anexo II).



Antes de los bioensayos, se verificó el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura. El pH, tanto del agua de dilución como el de los tratamientos, permaneció en un rango entre 6.3 y 7,9 unidades. El oxígeno varió de 0.0 a 6.8 mg/L y la temperatura vario de 15.6 y 18.6 °C. Los resultados se muestran en el ANEXO III.



**Figura 11: Preparación de las diluciones para los ensayos**

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### **d. Prueba definitiva**

##### **- Diseño de la prueba**

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), cada muestra (X) tuvo seis concentraciones, la variable de respuesta fue la inhibición del crecimiento de la radícula e hipocotilo (Y), el número de repeticiones por tratamiento fue de 5, haciendo un total de 30 unidades experimentales, además del control negativo sin adición de sustancia toxica alguna, el modelo lineal aditivo fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta (mortalidad)

$\mu$  = Promedio general

$\tau_i$  = Efecto de la i-ésima concentración del agua residual

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental

### - **Preparación de las diluciones**

Se prepararán 6 diluciones en base a los resultados de los screening test, se preparó 100 mL por dilución. Este volumen fue suficiente para repartir un volumen de 4 mL en cada placa petri. Las diluciones para cada tratamiento se detallan en las Tablas 8, 9, 10 y 11.

### - **Medición de parámetros físico-químicos**

Se procedió a preparar las diluciones correspondientes a las pruebas definitivas establecidas según los screening test. Se determinaron las condiciones de los ensayos con la medición de: temperatura, pH y oxígeno disuelto.

#### **pH**

Para obtener la máxima exactitud en su medición, se utilizó un pH-metro electrónico marca WTW, modelo 730

#### **Temperatura**

Se determinó la temperatura con un termómetro de mercurio (-8 a 32 °C) marca Alla France.

#### **Oxígeno disuelto**

La medición del oxígeno disuelto se realizó utilizando un oxímetro marca Mettler Toledo, modelo M-90.

### - **Desarrollo de la prueba**

Se colocó papel de filtro en cada placa Petri, se saturó el papel filtro con 4 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire, se colocaron 10 semillas empleando una pinza, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces (Figura 12). Las placas fueron tapadas, rotuladas con la hora, fecha y tratamiento (Figura 13); así mismo colocadas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad, finalmente se colocaron en una incubadora por 120 horas (5 días) a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, siguiendo las condiciones que se describen en la Tabla 5.





**Figura 12: Colocación de las semillas de *Lactuca sativa L* sobre placas petri**  
FUENTE: Elaboración propia (2015)

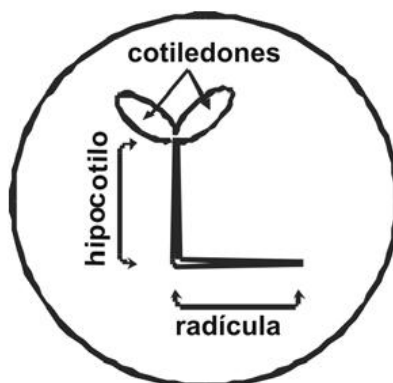


**Figura 13: Montaje de la prueba definitiva con *Lactuca sativa L***  
FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### **e. Medición de efecto toxico**

Cada punto final se evaluó comparando el efecto generado en los organismos expuestos a los diferentes tratamientos con respecto a la respuesta de los organismos del tratamiento control, sujetos a las mismas condiciones de ensayo.

Terminado el período de exposición (120 horas), se procedió a medir la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada semilla germinada utilizando papel milimetrado (Figura 15). La medida de elongación de la radícula se consideró desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se consideró desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (figura 14).



**Figura 14: Esquema de plántula de *Lactuca sativa* para medida de elongación**

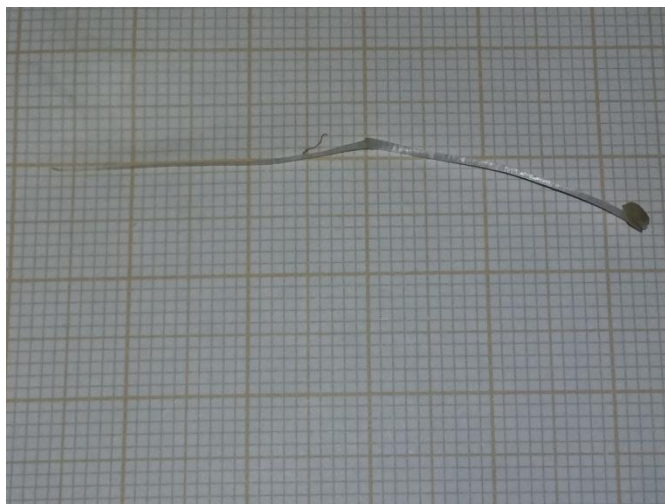
FUENTE: Sobrero y Ronco (2004)

**Tabla 5: Condiciones recomendadas para pruebas de toxicidad aguda para *Lactuca***

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de la solución de prueba	4 mL
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Duración de la prueba	120 horas
Efecto medido	Inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación
Resultado final	CL <sub>50</sub> o % inhibición
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90%
Control positivo	Zn (II) a partir de ZnSO <sub>4</sub>

FUENTE: Sobrero y Ronco (2004)

Se registraron el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.



**Figura 15: Medición del elongación de la radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa L***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### **f. Expresión de resultados**

Se obtuvieron los promedios del crecimiento tanto a nivel de hipocotilo como de radícula. Se realizó el análisis de varianza y posteriormente una prueba de rango múltiple de Duncan.

### **3.8.2 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia pulex***

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda se expusieron los neonatos a diferentes tratamientos durante un periodo de 48 h. Como resultado de dicha exposición se determinó la concentración de la muestra, que produjo la muerte al 50 por ciento de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o  $CL_{50}$ ), con un nivel de confiabilidad del 95 por ciento; empleando un programa estadístico Probit.

#### **a. Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba**

Se colectaron Daphnias en etapa adulta (estado grávido) de los acuarios del área de Cultivos Auxiliares de IMARPE sede Puno.

Se instalaron acuarios (cap 8L) con los cultivos de *Daphnia pulex* (Figura 16), los cultivos se mantuvieron en agua de lago filtrada, a temperatura ambiente, con un fotoperiodo natural de 16 h luz/8 h oscuridad (ver condiciones en la Tabla 6). Para la alimentación de los cultivos se empleó suspensiones de algas (*Chlorella sp.*). La alimentación de los cultivos fue 3 veces por semana, empleando una pipeta volumétrica de plástico.



**Figura 16: Acuarios con cultivos de *Daphnia pulex***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

Se efectuó la limpieza de los acuarios cada semana para evitar el stress de los organismos, se empleó un sifón con el cual se removió las mudas y los restos de alimento depositados en el fondo de los acuarios. Al finalizar la limpieza se adicionó agua de lago filtrada a cada acuario hasta obtener el volumen inicial.

El día previo a las pruebas se realizó selección los cultivos de Daphnias por estadios, para garantizar que los neonatos tuvieran menos de 48 h de nacidos (Figura 18), se empleó un colador para separar los individuos adultos, posteriormente se observó al estereoscópio para separar los neonatos de los juveniles en una placa Petri y con ayuda de pipetas volumétricos de plástico (Figura 17).



**Figura 17: Selección de neonatos para ensayos de toxicidad**

FUENTE: Elaboración propia (2015)



**Figura 18: Neonatos de *Daphnia pulex***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

**Tabla 6: Condiciones recomendadas para las pruebas con Daphnia**

Tipo de Ensayo	Estático
Duración de la prueba	24 -48 horas
Temperatura	20 ± 2
Calidad de Luz	Fluorescente blanco y frio
Intensidad luminosa	540- 1080 luxes
Foto periodo	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 organismos por recipiente	No >1 neonato por cada 2 MI
Régimen de alimentación	No
Aireación	No
Ph	6-10
Respuesta evaluada	Inmovilización
Blanco	Sobrevivencia ≥ 90%
Control positivo	Dicromato de potasio K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>

FUENTE: USEPA (1989)

#### **b. Control del cultivo del organismo de prueba**

Para establecer si los individuos del cultivo tenían las condiciones fisiológicas óptimas para el desarrollo de pruebas de toxicidad, fue necesario hacer un seguimiento de la sensibilidad del cultivo empleando un tóxico de referencia.

##### **- Prueba de sensibilidad**

Se realizaron pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), a diferentes concentraciones para evaluar la sensibilidad del cultivo (Anexo IB).

### c. Pruebas preliminares (Screening test)

#### - Agua de dilución

Según APHA (1998), para evaluaciones de toxicidad de efluentes vertidos a un cuerpo de agua, el agua de dilución será agua natural libre de contaminación que se encuentre fuera de la zona de influencia del efluente, la cual se tomó del lago Titicaca; en la zona perteneciente al lago mayor próximo a las Islas de los Uros.

El agua de dilución, se filtró y colocó en recipientes esterilizados para su mantenimiento (Figura 19).



**Figura 19: Agua de dilución para pruebas de toxicidad con *Daphnia pulex***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### - Preparación de las diluciones

Se empleó un amplio intervalo de diluciones sin réplicas buscando los porcentajes en los cuales murieran todos los organismos expuestos (100% mortalidad), 80%, 60%, 40%, 20% y 0% de mortalidad. Se prepararon diluciones con un factor de 0.5 con las muestras de agua (Figura 19). Posteriormente otras diluciones en base a estos resultados. Se procedió a colocar 20 mL de cada una de las diluciones en los recipientes de prueba, se transfiriendo diez neonatos por un periodo de exposición de 48 h, luego del cuál se registró el número de organismos muertos.





**Figura 20: Screening test para toxicidad con *Daphnia pulex***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### **d. Prueba definitiva**

##### **- Diseño de la prueba**

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), donde cada muestra tuvo seis concentraciones, la variable de respuesta fue la mortalidad del organismo de prueba (Y), el número de repeticiones por tratamiento fue de 5, haciendo un total de 30 unidades experimentales (Figuras 21 y 22), además del control negativo sin adición de sustancia toxica alguna por muestra, el modelo lineal aditivo fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta (mortalidad)

$\mu$  = Promedio general

$\tau_i$  = Efecto de la i-ésima concentración de la muestra

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental





**Figura 21: Montaje de las pruebas definitivas con *Daphnia pulex* en agosto**

FUENTE: Elaboración propia (2015)



**Figura 22: Montaje de las pruebas definitivas con *Daphnia pulex* en noviembre**

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### - Preparación de las diluciones

Se prepararán 6 diluciones en base a los resultados de los screening test, se preparó 100 mL por dilución. Este volumen fue suficiente para repartir un volumen de 20 mL en cada recipiente acrílico. Las diluciones para cada tratamiento se detallan en las Tablas 12, 14, 16 y 18.

## - **Medición de parámetros físico-químicos**

Se determinaron las condiciones de los ensayos con la medición de: temperatura, pH y oxígeno disuelto).

### **pH**

Para obtener la máxima exactitud en su medición, se utilizó un pH-metro electrónico marca WTW, modelo 730

### **Temperatura**

Se determinó la temperatura con un termómetro de mercurio (-8 a 32 °C) marca Alla France.

### **Oxígeno disuelto**

La medición del oxígeno disuelto se realizó utilizando un oxímetro marca Mettler Toledo, modelo M-90.

## - **Desarrollo de la prueba**

Se precedió a introducir 10 neonatos de *Daphnia pulex* en los recipientes acrílicos que contenían los diferentes tratamientos (Figura 23), empleando una pipeta despuntada. El tiempo de exposición establecido fue de 48h.



**Figura 23: Distribución de los tratamientos para pruebas de toxicidad con *Daphnia***

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### **e. Medición de efecto toxico**

Finalizada la prueba se cuantificó la mortalidad de los organismos expuestos pasadas las 48 horas, finalmente se registró el número de organismos inmovilizados o muertos.

#### **f. Expresión de los resultados**

Con los valores obtenidos se aplicó la prueba Probit, utilizando el paquete estadístico SAS. El principal objetivo de este tipo de análisis fue evaluar la concentración necesaria para inmovilizar al 50% de individuos de la población.

Adicionalmente se evaluó el parámetro NOEC (Concentración de efectos no observados) mediante la prueba de rango múltiple de Dunnett.

### **3.9 ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP)**

El IETP se determinó con los resultados obtenidos en los bioensayos con *Daphnia pulex*, debido a que se observó más consistencia en los resultados. Una vez obtenidos los valores de  $CL_{50}$ , fueron convertidos a unidades toxicológicas (UT); a partir de ello se calculó la carga toxicológica (CT) y finalmente se obtuvo el IETP.

### **3.10 PROPUESTA PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN AMBIENTAL DE LOS EFLUENTES VERTIDOS A LA BAHÍA INTERIOR DE PUNO**

Se realizó un diagnóstico con la información secundaria recabada de informes y documentos técnicos de instituciones locales, se identificaron a todos los actores involucrados en base a información obtenida de documentos institucionales y entrevistas a los funcionarios locales.

Una vez realizado el análisis y la evaluación de la información, se procedió a plantear la propuesta de mejora, en base a información secundaria.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL EFLUENTE

Los resultados de las evaluaciones físico- químicas presentadas en la Tabla 7, muestran que los niveles de nitrógeno total y la carga orgánica no son reducidos significativamente luego del tratamiento en la laguna de estabilización El Espinar. Además los niveles de oxígeno disuelto fueron 0.01 -1.86 mg/L lo que significa condiciones de hipoxia, donde se da la desaparición de organismos y especies sensibles.

Para el mes de agosto del 2015, a una temperatura del agua de 14 °C, se reportó 0.02 mg/L de oxígeno disuelto, 65 mg/L de nitrógeno total y 263.15 mg/L DBO<sub>5</sub> en el afluente. A una temperatura de 14.3 °C, 1.14 mg/L de oxígeno disuelto, 57 mg/L de nitrógeno total y 92.14 mg/L DBO<sub>5</sub> en el efluente.

Así también para el mes de noviembre del 2015, a una temperatura del agua de 16.3 °C, se reportó 0.01 mg/L de oxígeno disuelto, 60 mg/L de nitrógeno total y 303.9 mg/L DBO<sub>5</sub> en el afluente. A una temperatura de 17 °C, 1.11 mg/L de oxígeno disuelto, 47 mg/L y de nitrógeno total y 101.15 mg/L DBO<sub>5</sub> en el efluente.

Los tres principales problemas ambientales generados por la presencia de compuestos de nitrógeno en el sistema acuático son: el aumento de la acidez, el desarrollo de eutroficación y el aumento de las concentraciones hasta niveles tóxicos tanto en aguas superficiales como subterráneas que limitan su uso principalmente como fuentes de agua para consumo humano o en acuicultura (Koçbaşı *et al*, 2015).

En cuanto a la demanda química de oxígeno, todos los valores superaron el valor establecido, lo cual indica que existen condiciones de oxidación-reducción sobre la materia orgánica, consumiéndose niveles elevados de oxígeno, siendo evidenciado en este parámetro.

**Tabla 7: Parámetros físico- químicos del afluente y efluente según meses evaluados**

Parámetro	Agosto			Noviembre	
	Afluente (PM1S)	Efluente (PM2S)	Cuerpo receptor (PM3S)	Afluente (PM1L)	Efluente (PM2L)
Aspecto	Agua contaminada	Agua contaminada	Agua contaminada	Agua contaminada	Agua contaminada
Olor	A descomposición				
Color	gris ligero amarillo	gris ligero amarillo	ligero verde	gris ligero amarillo	gris ligero amarillo
Temperatura del agua °C	14	14.3	15.5	16.3	17
Oxígeno disuelto (OD) mg/L	0.02	1.14	1.86	0.01	1.11
Demanda biológica de oxígeno (DBO) mg/L	263.15	92.14	84.2	303.9	101.15
Demanda química de oxígeno (DQO) mg/L	670	365	228	674	343
Ph	8.07	8.26	8.38	7.16	7.99
Conductibilidad eléctrica µs/cm	1985	1910	1955	2087	1988
Salinidad (%)	1.24	1.24	1.27	1.21	1.10
Sólidos suspendidos totales (SST) mg/L	462	378	235	469	389
Sólidos totales disueltos (TDS) mg/L	993	955	977.5	1044	994
Nitritos mg NO <sub>2</sub> -N/L	0.048	0.01	0.039	0.061	0.019
Nitratos mg NO <sub>3</sub> -N/L	1.086	1.01	0.83	1.056	1.045
Nitrógeno amoniacal mg NH <sub>3</sub> -N/L	40.78	35.42	30.1	47.1	40.45
Nitrógeno total mg/L	65	57	42.8	60	47
Fósforo como Ortofosfato mgPO <sub>4</sub> /L	43.12	38	30.62	37.47	33.95
Fósforo total mg/L	14.06	12.39	9.99	12.22	11.07
Coliformes totales UFC/100mL	6.00E+07	4.70E+05	3.20E+05	6.00E+07	5.20E+05
Coliformes termotolerantes UFC/100mL	4.50E+07	3.60E+05	2.10E+05	2.00E+07	3.20E+05

Fuente: EMSA Puno (2015)

Las concentraciones de nitritos (NO<sub>2</sub>) y nitratos (NO<sub>3</sub>) encontradas en el cuerpo receptor, alcanzaron sus mayores valores en la zona superficial, mientras que el nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N) se encontró en mayores concentraciones en la zona profunda y en las estaciones próximas a la isla Espinar, cercanas a la laguna de oxidación (IMARPE, 2013).

Antes de los bioensayos, se verificó el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura. El pH, tanto del agua de dilución como el de los tratamientos, permaneció en un rango entre 6.3

y 7,9 unidades. El oxígeno varió de 0.0 a 6.8 mg/L y la temperatura vario de 15.6 y 18.6 °C. Los resultados se muestran en el ANEXO III.

## **4.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD**

### **Prueba de sensibilidad para *Lactuca sativa* L**

En la prueba de sensibilidad de *Lactuca sativa* con sulfato de zinc se observó inhibición del crecimiento de la radícula e hipocotilo en un 100% (no se observó germinación) con las concentraciones de 1 y 10 ppm, la menor inhibición de crecimiento de radícula e hipocotilo se observó con la concentración de 0.001 ppm. Con esta prueba se verificó que los organismos expuestos presentaban elevada sensibilidad al compuesto (ANEXO I-A).

### **Prueba de sensibilidad para *Daphnia pulex***

En la prueba de sensibilidad de *Daphnia* se observó que el cultivo era sensible al dtricromato de potasio, la respuesta de los organismos expuestos a la prueba de sensibilidad fue de 100% de mortalidad para todos los tratamientos frente al tratamiento control donde no hubo mortalidad. Lo que garantizó la confiabilidad de los datos obtenidos en los ensayos con efluentes (ANEXO I-B).

## **4.3 SCREENING TEST**

Se realizaron 2 pruebas preliminares o screening test por punto de muestreo y según mes de evaluación.

La finalidad de estas pruebas fue definir las diluciones para cada tratamiento del experimento, es así que los tratamientos que tuvieron como respuesta la mortalidad de los organismos expuestos para el caso de bioensayos con *Daphnia* e inhibición de crecimiento para el caso de *Lactuca*, se utilizaron como guía para la preparación de las pruebas definitivas (Anexo II).

La importancia de estas pruebas, radicó en la complejidad para estimar las diluciones que nos mostraron las respuestas esperadas en periodos cortos, tardando semanas en lograr encontrar las diluciones que arrojaron respuestas esperadas. De otra forma los resultados

hubieran sido forzados por los paquetes estadísticos y obteniendo finalmente respuestas muy alejadas de la realidad. Es así que el tiempo es un factor importante porque a medida que transcurrieron los días la muestra cambió a pesar mantenerse conservadas a 4°C. Es así que pasadas las 36 h, se recolectó nuevas muestras de agua residual.

Respecto al punto de muestreo 3 (PM3), los resultados de los screening tests, mostraron que la muestra estaba diluida por el agua del cuerpo receptor, por lo que no hubo respuestas de mortalidad de *Daphnia*, ni inhibición del crecimiento en *Lactuca* al exponer los individuos a tratamientos con un 100% de concentración, es así que no se tomó en consideración el PM3 para los ensayos definitivos en ninguno de los meses evaluados.

#### 4.4 EFECTO DEL AFLUENTE Y DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR, SOBRE *Lactuca sativa* L EN AGOSTO Y NOVIEMBRE DEL 2015

##### a. Afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto

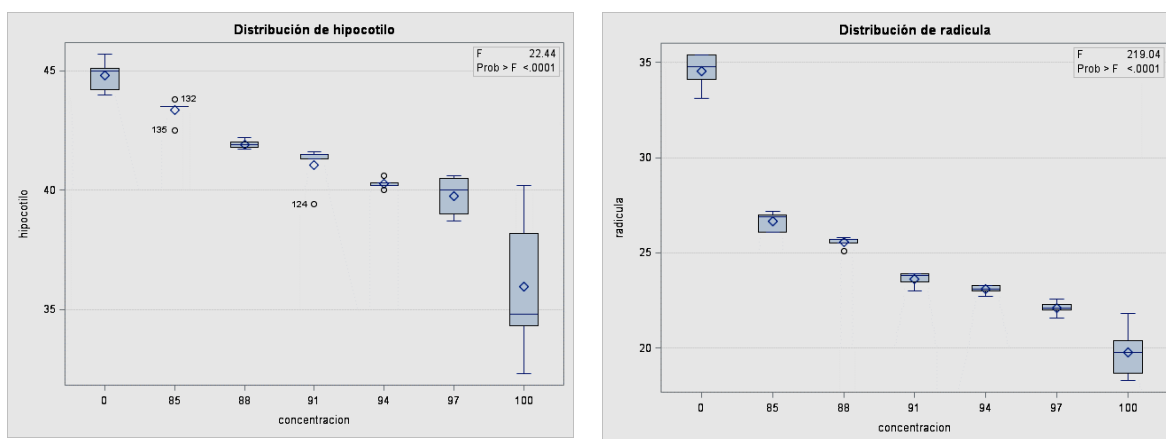
Se evaluó el crecimiento tanto del hipocotilo y radícula de semillas de lechuga, sometida a diferentes concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto, los resultados se presentan en la tabla 8.

**Tabla 8: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Grupos Duncan	Hipocotilo			Radícula			
	Media (mm)	N	Concentración (%)	Media (mm)	N	Concentración (%)	
A	44.80	5	0	A	34.56	5	0
B	43.36	5	85	B	26.66	5	85
B	41.92	5	88	C	25.56	5	88
D	41.06	5	91	D	23.62	5	91
D	40.26	5	94	D	23.08	5	94
D	39.76	5	97	E	22.12	5	97
E	35.96	5	100	F	19.80	5	100

Medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En la tabla 8 y figura 24, se muestra el efecto de las concentraciones del afluente sobre el crecimiento del hipocotilo y radícula de semillas de lechuga. Para el hipocotilo la mayor longitud se observa en el tratamiento control con 44.80 mm, y el menor crecimiento en la concentración de 100% de agua residual con 35.96 mm. Para la radícula la mayor longitud se observa para el tratamiento control con 34.56 mm, la concentración de 85% de agua residual presentó un crecimiento de 26.66 mm y el menor crecimiento se presentó en la concentración de 100% de agua residual con 19.80 mm.



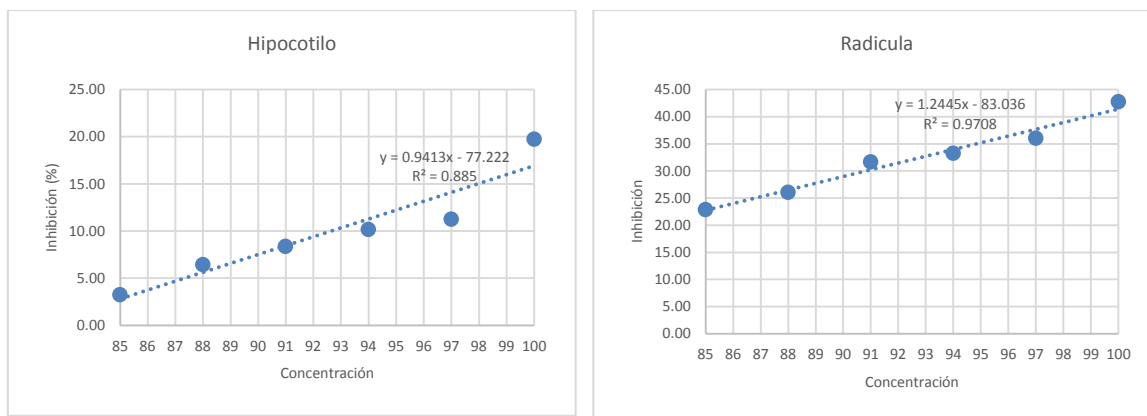
**Figura 24: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Los análisis de varianza mostraron significancia estadística ( $p < 0.01$ ); la prueba de rango múltiple de Duncan, señala que todos los tratamientos son diferentes respecto del control tanto para el crecimiento del hipocotilo como de la radícula.

Para la radícula, la prueba Duncan, señala que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos 1 y 2 cuyas longitudes en promedios son 43.36 mm y 41.92 mm respectivamente, tampoco se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos 3 y 4 cuyas longitudes en promedio son 41.06 mm y 40.26 mm.

Para el hipocotilo se encontró diferencia estadística significativa en la mayoría de los tratamientos, sin embargo para los tratamientos 3 y 4 cuyas longitudes en promedio son de 23.62 mm y 23.08 mm no se encontró diferencia estadística significativa entre tratamientos.





**Figura 25: Inhibición de crecimiento de hipocotilo y radícula (%) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

En la figura 25, se muestra los resultados de inhibición de crecimiento del hipocotilo según las seis concentraciones del afluente, el análisis de regresión lineal indica que por el incremento de 1% en la concentración de agua residual se espera 0.94% de inhibición del crecimiento del hipocotilo, mientras que para la radícula la inhibición fue de 1.30%, por lo cual la mayor inhibición en semillas de lechuga se produce a nivel de la radícula; los modelos lineales mostraron un buen ajuste, con coeficientes de determinación de 88.50 y 97.08% respectivamente.

**b. Efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Se analizó el crecimiento en longitud tanto del hipocotilo y radícula de semillas de lechuga, sometida a diferentes concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en la agosto, los resultados se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 9: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

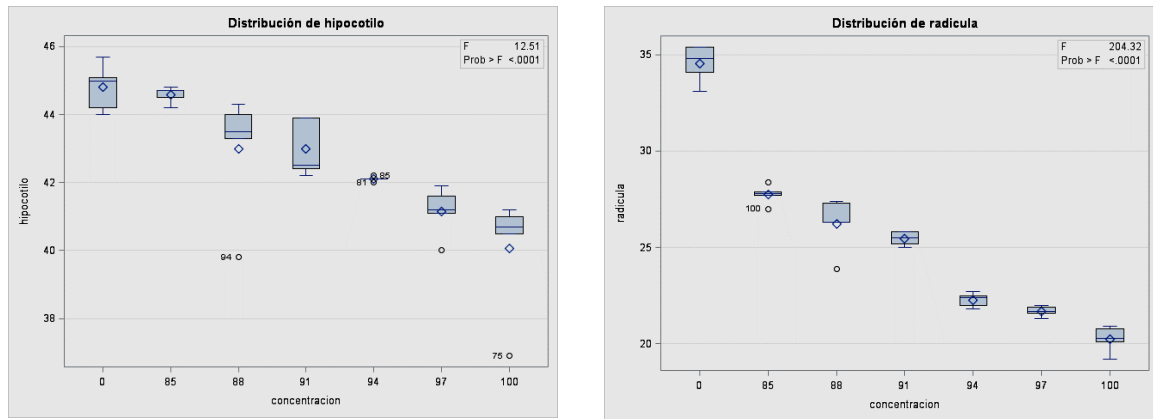
Hipocotilo				Radícula			
Grupos Duncan	Media (mm)	N	Concentración (%)	Grupos Duncan	Media (mm)	N	Concentración (%)
A	44.80	5	0	A	34.56	5	0
A	44.58	5	85	B	27.76	5	85
B	42.98	5	88	C	26.24	5	88
B	42.98	5	91	C	25.46	5	91
C	42.10	5	94	D	22.28	5	94
C	41.16	5	97	D	21.70	5	97
D	40.06	5	100	E	20.26	5	100

Medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En la tabla 9 y figura 26, se muestra el efecto de las concentraciones del efluente sobre el crecimiento del hipocotilo y radícula.

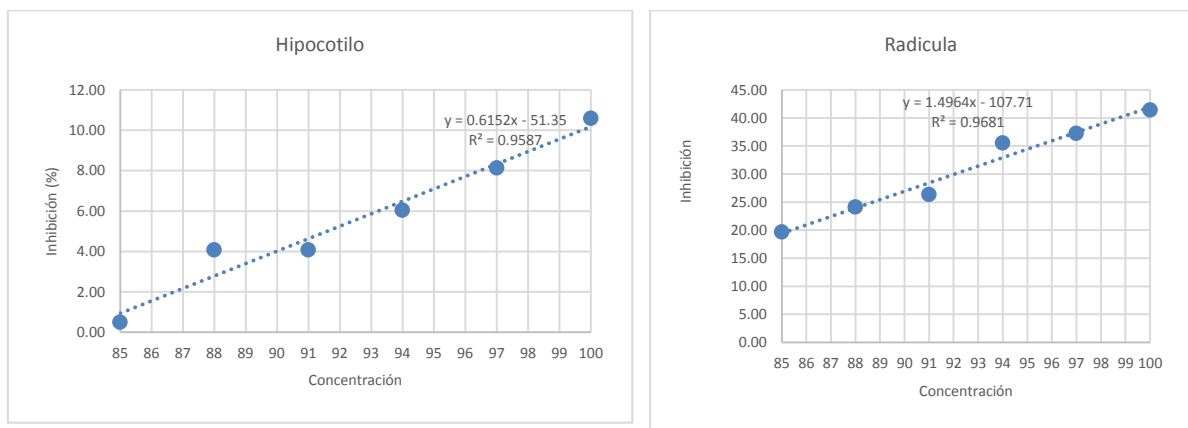
Para el hipocotilo la mayor longitud se observa en el tratamiento control con 44.8 mm, y el menor crecimiento en la concentración de 100% de agua residual con 40.06 mm.

Para la radícula la mayor longitud se observa en el tratamiento control con 34.56 mm, el menor crecimiento se presentó en la concentración de 100% con 20.26 mm, por lo tanto si hubo una inhibición del crecimiento a nivel de hipocotilo y radícula, efectos que se mostraron directamente proporcional a la concentración.



**Figura 26: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Los análisis de varianza mostraron la existencia de diferencia significativa ( $p < 0.01$ ); la prueba de rango múltiple de Duncan, señala que se observa diferencias en el crecimiento del hipocotilo entre el tratamiento control y los otros tratamientos, así mismo se observa diferencia entre tratamientos, señalando una mayor sensibilidad de la radícula a la exposición al efluente.



**Figura 27: Inhibición de crecimiento de hipocotilo y radícula (%) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

En la figura 27, se muestra la inhibición de crecimiento del hipocotilo según las seis concentraciones del efluente, el análisis de regresión lineal indica que por el incremento de 1% en la concentración de agua residual se espera 0.62% de inhibición del crecimiento del hipocotilo, mientras que para la radícula de inhibición es de 1.50%, por lo cual la mayor

inhibición se produce a nivel de la radícula de la semillas de lechuga; los modelos lineales mostraron un buen ajuste, con coeficientes de determinación de 95.87 y 96.81% respectivamente.

**c. Afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Se evaluó el crecimiento tanto del hipocotilo y radícula de semillas de lechuga, sometida a diferentes concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre, los resultados se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10: de la laguna de estabilización El Espinar en Promedio de longitud de hipocotilo y radícula en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente noviembre**

Hipocotilo				Radícula			
Grupos Duncan	Media (mm)	N	Concentración (%)	Grupos Duncan	Media (mm)	N	Concentración (%)
A	49.24	5	88	A	34.44	5	0
B	48.04	5	85	B	32.68	5	85
C	45.34	5	0	C	29.38	5	88
D	44.06	5	100	D	25.22	5	91
D	43.84	5	97	E	24.40	5	94
E	42.60	5	94	F	23.36	5	97
F	41.58	5	91	G	21.34	5	100

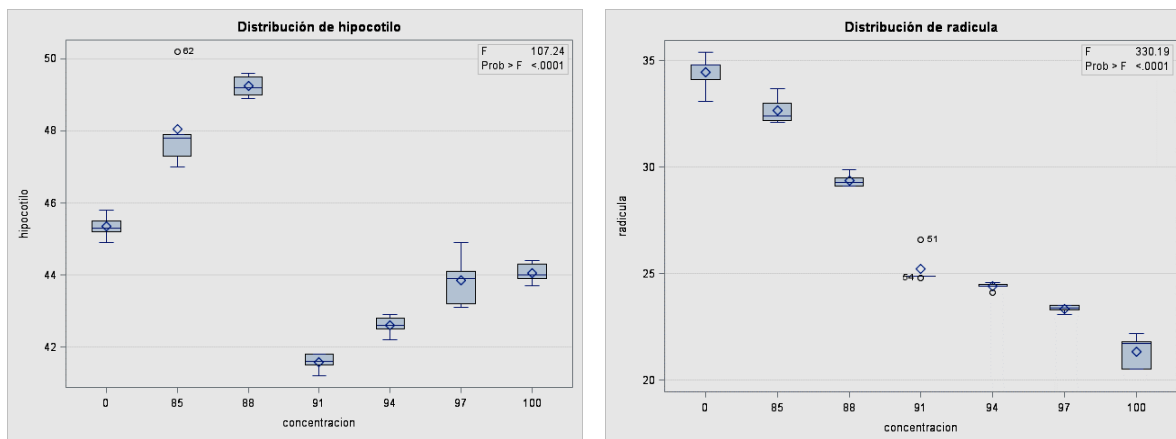
Medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En la tabla 10 y figura 28, se muestra el efecto de las concentraciones del afluente sobre el crecimiento del hipocotilo y radícula.

Para el hipocotilo las mayores longitudes se observaron en las concentraciones 88% y 85% con longitudes de 49.24 y 48.04 mm respectivamente; observándose un crecimiento irregular mayor al control que puede deberse a que a menores concentraciones del contaminante hay un estímulo de crecimiento, también se observó que hubo una reducida inhibición del crecimiento con la concentración de 100%.

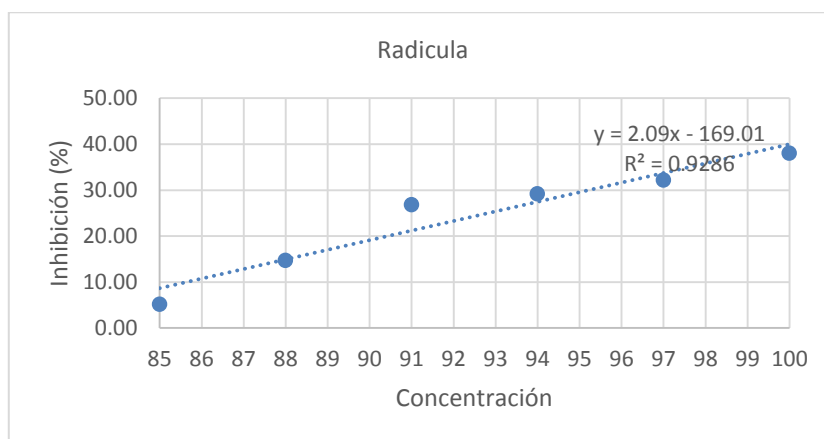
Para la radícula el tratamiento control presentó las mayores longitudes con 34.44 mm, todos los tratamientos mostraron un efecto de inhibición de la radícula, presentando

longitudes inferiores al control, el menor crecimiento se presentó en la concentración de 100% del afluente con 21.34 mm.



**Figura 28: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Los análisis de varianza mostraron diferencia significativa ( $p < 0.01$ ), la prueba de rango múltiple de Duncan, señala que se observa diferencia en el crecimiento del hipocotilo entre el tratamiento control y todos lo tratamiento; en la radícula también se observa diferencia para dichos tratamientos, señalando mayor sensibilidad a nivel de la radícula.



**Figura 29: Inhibición de crecimiento de radícula (%) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

En la figura 29, se muestra la inhibición de crecimiento de la radícula según las seis concentraciones del afluente. El análisis de regresión lineal indica que por el incremento de 1% en la concentración de agua residual se espera 2.09% de inhibición del crecimiento de

la radícula, el modelo lineal muestra un buen ajuste con coeficiente de determinación de 92.86%.

Para el hipocotilo no se muestra un patrón definido para ajustar el análisis de regresión lineal.

**d. Efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Se evaluó el crecimiento tanto del hipocotilo y radícula de semillas de lechuga, sometida a diferentes concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre, los resultados se presentan en la Tabla 11.

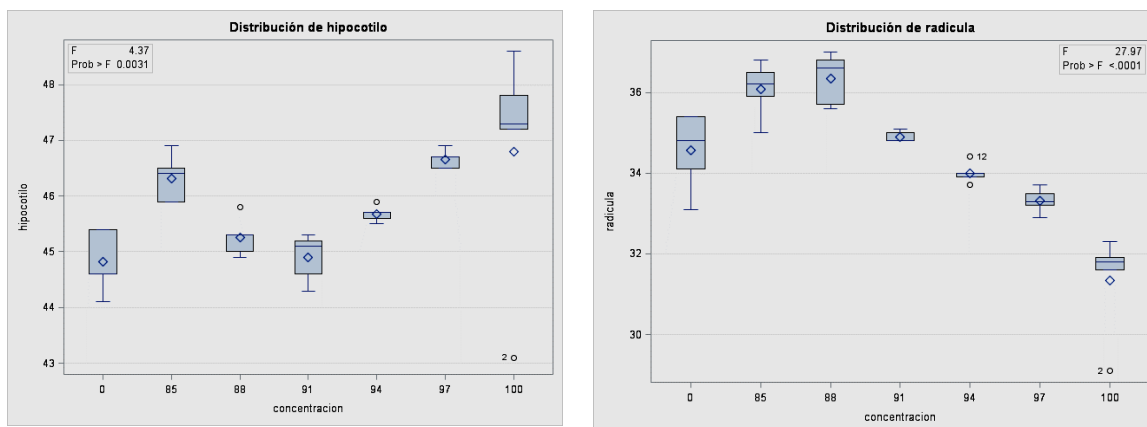
**Tabla 11: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Hipocotilo				Radícula					
Grupos Duncan	Media (mm)	N	Concentración (%)	Grupos Duncan	Media (mm)	N	Concentración (%)		
A	46.80	5	100	A	36.34	5	88		
A	46.66	5	97	A	36.08	5	85		
B	A	46.32	5	85	B	34.90	5	91	
B	A	C	45.68	5	94	B	34.56	5	0
B	C	45.26	5	88	C	B	34.00	5	94
	C	44.90	5	91	C		33.32	5	97
	C	44.82	5	0	D		31.34	5	100

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (p<0.05)

En la tabla 11 y figura 30, se muestra el efecto de las concentraciones del efluente sobre el crecimiento del hipocotilo y radícula, no se observa inhibición del crecimiento del hipocotilo frente al tratamiento control.

Para la radícula se observó inhibición del crecimiento con el 100% del efluente cuya longitud fue de 31.34 mm, frente a una longitud de 34.56 mm del tratamiento control.



**Figura 30: Promedio de longitud de hipocotilo y radícula (mm) en semillas de lechuga, sometidas a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Los resultados de los bioensayos con el efluente en el mes de noviembre mostraron que no hay un patrón definido puesto que hubo inhibición del crecimiento a nivel de radícula pero estimulación de crecimiento a nivel del hipocotilo.

En síntesis, los resultados de las evaluaciones en el mes de agosto, mostraron que tanto a nivel de afluente como efluente hubo inhibición de crecimiento de radícula e hipocotilo, el resultado que se mostró es que los niveles de toxicidad del efluente no disminuyen luego del tratamiento en la laguna de estabilización El Espinar según los bioensayos sobre *Lactuca sativa* L.

Para las evaluaciones en noviembre, se observó que tanto a nivel de afluente como efluente hubo inhibición de crecimiento de radícula e hipocotilo. Cuando los tratamientos fueron muy diluidos no hubo respuestas de inhibición del crecimiento, resultados similares fueron reportados por Bazai y colaboradores (2006). Los niveles de toxicidad del efluente no disminuyen luego del tratamiento en la laguna de estabilización El Espinar de acuerdo a los bioensayos sobre *Lactuca sativa* L.

Se halló una mayor inhibición en la radícula de las semillas de lechuga, se considera que este efecto es debido a que es la primera estructura que entra en contacto con los contaminantes, los grupos de investigación de Navarro (2006) y Gonzales (2012) y colaboradores hallaron resultados similares.

Bazai y colaboradores (2006), investigaron sobre el efecto del agua residual de 3 localidades en Pakistán, sobre la germinación y crecimiento de *Lactuca sativa* L, se reportó que la inhibición del crecimiento de la radícula fue de 28.43% y la inhibición a nivel de hipocótilo fue de 16.39% al 100% de concentración de agua residual doméstica de la ciudad de Chilltan y 12.73% de inhibición del crecimiento de la raíz, 18.18% de inhibición a nivel de hipocótilo al 100% en agua residual doméstica de la ciudad de Zarghoon.

Consideramos que de la inhibición se debe a la disminución del agua por un mayor nivel de salinidad regenerando toxicidad por la alta presión osmótica del medio. Coincidiendo con Bazai y colaboradores (2006), quienes reportaron que la salinidad no sólo afectó a la germinación de semillas, sino también redujo significativamente el crecimiento posterior de las plántulas, esto fue debido a la acumulación de iones minerales en su cápsula celular o debido a la insuficiencia de los orgánulos celulares para ajustar el alto potencial osmótico dentro de la célula.

En una investigación del afluente y efluente de 3 plantas potabilizadoras en Colombia, para el afluente *Lactuca sativa* mostró efectos de inhibición del crecimiento de la raíz en todas las muestras con valores entre 1% y 24 %. Para el efluente, también mostró efectos de inhibición del crecimiento de la raíz en todas las muestras con valores entre 24% y 100% (Bohórquez et al., 2012). Resultados similares fueron reportados por Blinova (2004) que mostró que la inhibición del crecimiento de la radícula con un 100% del agua residual sin tratamiento fue de 26%.

Las aguas residuales sin tratar son altamente tóxicas en la naturaleza y tienen un efecto inhibitorio sobre la germinación de semillas y plántulas en crecimiento. Vegetales cultivados en tierras de Tunes, fueron regados con efluentes municipales mostrando inhibición de la germinación en un 50% e inhibición en el crecimiento de la raíz en un 44% en *Avena sativa* L (Frendi et al., 2012). Así también se reportó que el número de tallos y hojas en diferentes bioensayos con plantas expuestas a aguas residuales, disminuyó en relación con las plantas que se trató con agua potable (Beg et al., 2002).

Richards y Marshall (2002) investigaron la reducción del peso en seco de soja y de girasol cuando se cultiva en diferentes concentraciones de aguas residuales municipales con altos



niveles de pH, conductividad, cloruros, carbonatos y bicarbonatos de sodio. Concluyendo que hay una disminución de la producción de estos cultivos por el uso de agua residual.

Hen y Chia (2002) reportaron los impactos del agua residual municipal en China, sobre algunos vegetales incluyendo la col, zanahoria y guisantes de olor. Los vegetales fueron afectados en mayor medida por el agua contaminada de la ciudad que otros cultivos poniendo en evidencia las pérdidas económicas relacionadas con los impactos del agua residual.

García (2006), evaluó agua residual industrial y encontró que los parámetros fisicoquímicos no son la causa directa de la toxicidad y actúan como sustratos para *Lactuca sativa*, así mismo la toxicidad encontrada podría estar referida a la presencia de determinados componentes de la mezcla o de la interacción entre ellos, los cuales están presentes en concentraciones tan bajas, que actúan inhibiendo el desarrollo normal de las estructuras de crecimiento de las semillas expuestas. Coincidiendo con Gonzales (2012) y Torres (2006) quienes concluyeron que los efectos letales y subletales encontrados en los estudios de toxicidad con lechuga, pudieran estar dados por la acción de las diferentes sustancias químicas que componen el efluente evaluado y sus interacciones, partiendo de sus propiedades físico-químicas, y analizando los posibles efectos que pueden ser aditivos o sinérgicos; antagonicos; de potenciación o inhibición.

Al respecto Chagua (2014), reportó efectos tóxicos que inhibieron el crecimiento del hipocótilo y la radícula de las semillas de Lactuca, al exponerlas a altas concentraciones de efluentes de curtiembre con contenidos de sulfatos y cloruros, sin embargo encontró estimulación del crecimiento al someter las semillas a bajas concentraciones.

Saldarriaga (2013), evaluó la toxicidad de residuos de barrido de calles en la Avenida Abancay en Lima, con contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales, encontró inhibición del crecimiento a nivel de hipocotilo y radícula directamente proporcional con la concentración del contaminante; esto en consecuencia de los contaminantes de los residuos.

En los resultados encontrados para ambos meses evaluados, se observaron algunas anomalías en el sistema radicular como raíces raquílicas y quebradizas y en el hipocotilo,

curvado formando un lazo y retorcido formando un espiral. El efecto del agua residual no solo se manifiesta en la inhibición del crecimiento de especies vegetales sino también a nivel de efectos de mutagenicidad y genotoxicidad.

Munawar (2016) encontró que las aguas residuales presentan diferentes niveles de mutagenicidad y genotoxicidad a partir de estudios con *Vicia faba*.

Según USEPA (2002), pasadas las 36 horas de conservación de las muestras, estas podrían disminuir su toxicidad por la volatilización o sorsión u otras reacciones de los tóxicos es así que durante el bioensayo de toxicidad aguda de *Lactuca sativa* cuyo tiempo de exposición es de 120 h, es así que la muestras del afluente y efluente podrían haber sufrido cambios en su composición que alterarían los resultados.

Las investigaciones muestran que el efecto real del vertimiento de aguas residuales en el ecosistema, puede ser mucho más significativo que el estimado por los bioensayos. Los bioensayos utilizando especies vegetales mostraron menor sensibilidad que las especies animales para la evaluación de la contaminación del agua por los nutrientes, así como para la evaluación de cualquier posible impacto de efluentes en la cadena trófica del ecosistema, puesto que si hay dilución los contenidos de nutrientes son un estrato adecuado para el crecimiento (Korner *et al.* 2001 y Blinova, 2004).

#### **4.4 EFECTO DEL AFLUENTE Y DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR, SOBRE *Daphnia pulex* EN AGOSTO Y NOVIEMBRE DEL 2015**

##### **a. Afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

En la tabla 12, se muestran los resultados del bioensayo con *Daphnia pulex*, señala para la concentración de 75% una mortalidad de 100% de organismos expuestos, en la concentración del 68% se determinó 72% de mortalidad, la concentración de 54% una mortalidad de 42%; mientras que para la concentración más baja de 40% del afluente se encontró un 8% de mortalidad, el tratamiento control no mostró mortalidad.

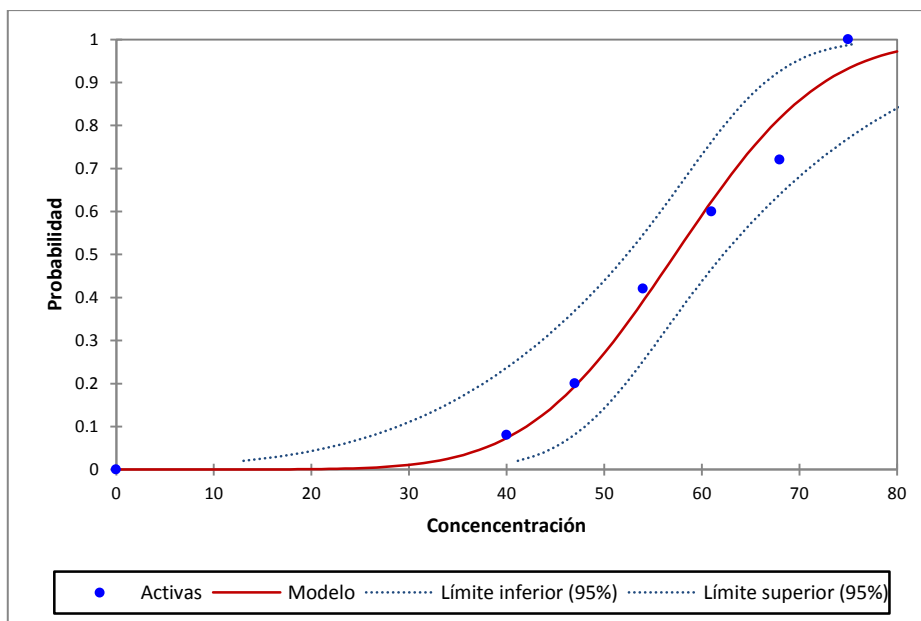
**Tabla 12: Mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Concentración	Repeticiones	Promedio	Mortalidad (%)
T6 75%	5	10	100.00
T5 68%	5	7	72.00
T4 61%	5	6	60.00
T3 54%	5	4	42.00
T2 47%	5	2	20.00
T1 40%	5	1	8.00
Control 0%	5	0	0.00

Los resultados del bioensayo fueron analizados por el método Probit, para determinar las probabilidades de mortalidad para diferentes concentraciones, los resultados se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13: Probabilidad de mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Probabilidad	Concentración	Límite inferior 95%	Límite superior 95%
0.01	29.620	7.362	38.811
0.05	37.717	21.456	44.746
0.10	42.033	28.859	48.020
0.20	47.260	37.601	52.208
0.30	51.028	43.604	55.528
0.40	54.249	48.360	58.739
<b>0.50</b>	<b>57.259</b>	<b>52.335</b>	<b>62.209</b>
0.60	60.268	55.786	66.204
0.70	63.489	58.982	70.975
0.80	67.258	62.291	76.989
0.90	72.484	66.471	85.738
0.95	76.800	69.742	93.145
0.99	84.897	75.674	107.241



**Figura 31: Curva de Dosis- Respuesta de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluyente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

En la tabla 13 y figura 31, los resultados del análisis Probit mostraron que con una concentración de 29.62% del afluyente se provocaría una mortalidad del 1% sobre *Daphnia pulex*, mientras con una concentración de 84.90% de agua residual se obtendría un 99% de mortalidad de los organismos expuestos.

La  $CL_{50}$  fue de 57.26% para un periodo de exposición de 48 horas, con esta concentración se obtendría una mortalidad del 50% de individuos expuestos.

También se realizó el ANOVA y la prueba de Dunnett (ver Anexo III): el ANOVA señaló la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluyente presentó un efecto diferente.

La prueba de Dunnett indicó que todas las concentraciones presentaron un efecto diferente al control, por lo tanto presentan algún grado de toxicidad.

Así mismo, se estimó que la concentración sin efecto adverso observable (NOEC) estaría en concentraciones menores al 40%.

Por otro lado, se determinó la concentración más baja con efectos observables (LOEC) que fue de 40%, lo que indica que a partir de esta concentración se presentan niveles de toxicidad aguda estadísticamente significativos.

**b. Efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

En la tabla 14, los resultados del bioensayo para mortalidad de *Daphnia pulex*, indican que para la concentración de 80% del efluente hubo una mortalidad de 90% de organismos expuestos, en la concentración del 77% se determinó 70% de mortalidad, mientras que la concentración más baja de 65% mostró 0% de mortalidad; el tratamiento control tampoco mostró mortalidad.

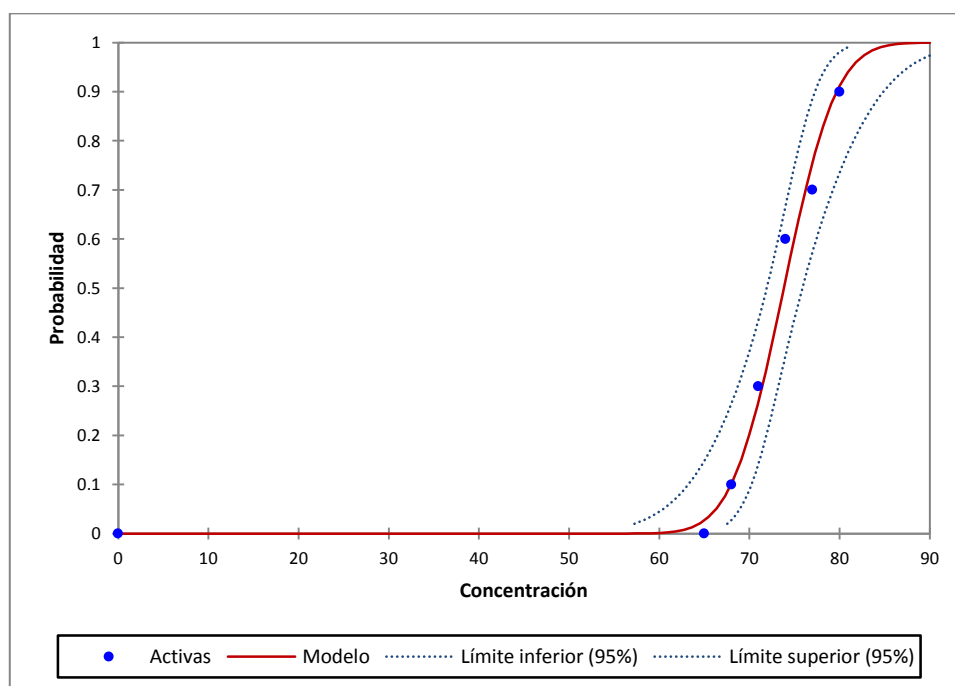
**Tabla 14: Mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones de efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Concentración	Repeticiones	Promedio	Mortalidad %
T6 80%	5	9	90.00
T5 77%	5	7	70.00
T4 74%	5	6	60.00
T3 71%	5	3	30.00
T2 68%	5	1	10.00
T1 65%	5	0	0.00
Control 0%	5	0	0.00

Los resultados del bioensayo fueron analizados por el método Probit, para determinar las probabilidades de mortalidad para las diferentes concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar, los resultados se presentan en la Tabla 15.

**Tabla 15: Probabilidad de mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

Probabilidad	Concentración	Límite inferior 95%	Límite superior 95%
0.01	63.188	55.121	66.624
0.05	66.302	60.434	68.939
0.10	67.962	63.216	70.224
0.20	69.973	66.486	71.878
0.30	71.422	68.712	73.203
0.40	72.661	70.461	74.488
<b>0.50</b>	<b>73.819</b>	<b>71.919</b>	<b>75.866</b>
0.60	74.976	73.196	77.425
0.70	76.215	74.397	79.258
0.80	77.665	75.660	81.546
0.90	79.675	77.271	84.859
0.95	81.335	78.537	87.660
0.99	84.449	80.836	92.989



**Figura 32: Curva de Dosis- Respuesta de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en agosto**

En la tabla 15 y figura 32, los resultados del análisis Probit mostraron que con una concentración de 63.19% del efluente se provocaría una mortalidad del 1% de organismos expuestos mientras que con una concentración de 84.45% del efluente se obtendría un 99% de mortalidad.

La  $CL_{50}$  fue de 73.82% para un periodo de exposición de 48 horas, con esta concentración se obtendría una mortalidad del 50% de individuos expuestos.

También se realizó el ANOVA y la prueba de Dunnett (ver Anexo III): el ANOVA señaló la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presentó un efecto diferente.

La prueba de Dunnett indica que las concentraciones a partir de 68% presentan diferencia estadística significativa frente al tratamiento control.

Así mismo se determinó que la concentración sin efecto adverso observable (NOEC) fue de 65% lo que indica que esta sería la dosis más elevada de la muestra que no presentó efectos adversos observables.

Por otro lado se determinó la concentración más baja con efectos observables (LOEC) que fue de 68%, lo que indica que a partir de esta concentración se presentan niveles de toxicidad aguda estadísticamente significativos.

### **c. Afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

En la tabla 16, los resultados del bioensayo para mortalidad de *Daphnia pulex*, indicaron que para la concentración de 100% del afluente se determinó una mortalidad de 100% de organismos expuestos, para la concentración del 85% se determinó 82% de mortalidad, mientras que la concentración más baja de 45% presentó un 18% de mortalidad, el tratamiento control no presentó mortalidad.

**Tabla 16: Mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

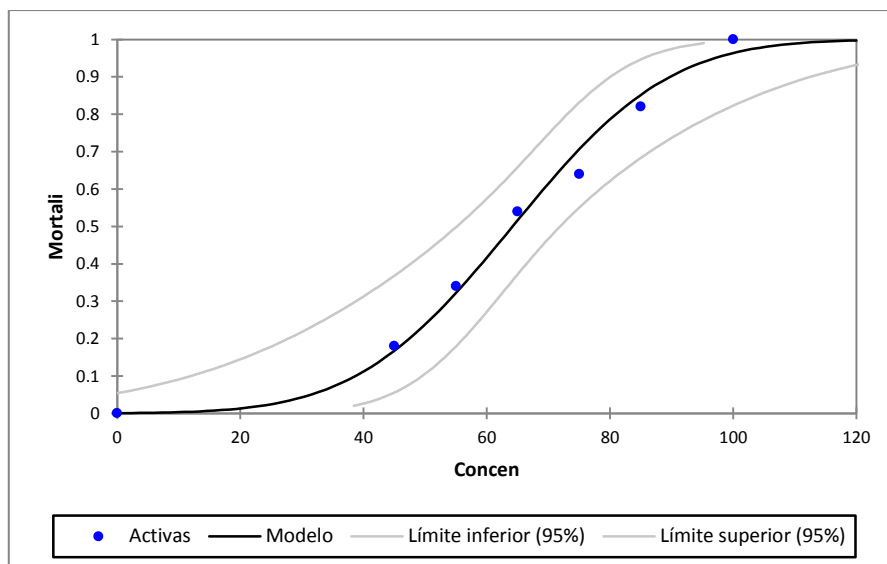
Concentraciones	Repeticiones	Promedio	Mortalidad %
T6 100%	5	10	100.00
T5 85%	5	8	82.00
T4 75%	5	6	64.00
T3 65%	5	5	54.00
T2 55%	5	3	34.00
T1 45%	5	2	18.00
Control 0%	5	0	0.00

Los resultados fueron analizados por el método Probit, para determinar las probabilidades de mortalidad para diferentes concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar, los resultados se presentan en la Tabla 17.

**Tabla 17: Probabilidad de mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Probabilidad	Concentración	Límite inferior 95%	Límite superior 95%
0.01	17.870	-26.566	34.592
0.05	31.438	-1.348	44.230
0.10	38.671	11.952	49.513
0.20	47.430	27.767	56.199
0.30	53.746	38.769	61.422
0.40	59.143	47.629	66.426
<b>0.50</b>	<b>64.187</b>	<b>55.127</b>	<b>71.887</b>
0.60	69.231	61.577	78.395
0.70	74.627	67.335	86.500
0.80	80.943	73.049	97.012
0.90	89.702	80.046	112.516
0.95	96.935	85.449	125.696
0.99	110.504	95.193	150.809





**Figura 33: Curva de Dosis- Respuesta de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

En la tabla 17 y figura 33, los resultados del análisis Probit indicaron que con una concentración de 17.87% del afluente se provocaría una mortalidad del 1% sobre *Daphnia pulex*, mientras que con una concentración de 96.94% se obtendría un 99% de mortalidad.

La  $CL_{50}$  fue de 64.19% para un periodo de exposición de 48 horas, con esta concentración del afluente se obtendría una mortalidad del 50% de organismos expuestos.

También se realizó el ANOVA y la prueba de Dunnett (ver Anexo III): el ANOVA señaló la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluente presenta un efecto diferente.

La prueba de Dunnett indicó que todas las concentraciones presentaron un efecto diferente al control, es decir presentan algún grado de toxicidad.

Así mismo, se estimó que la concentración sin efecto adverso observable (NOEC) estaría en concentraciones menores al 40%.

Por otro lado, se determinó la concentración más baja con efectos observables (LOEC) que fue de 45%, lo que indica que a partir de esta concentración se presentan niveles de toxicidad aguda estadísticamente significativos.

**d. Efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

En la tabla 18, los resultados del bioensayo para mortalidad de *Daphnia pulex*, indican que la concentración de 90% del efluente presentó una mortalidad de 100%, la concentración del 80% presentó un 74% de mortalidad, mientras que la concentración más baja de 50% presentó 1% de mortalidad, el tratamiento control no presentó mortalidad para los organismos expuestos.

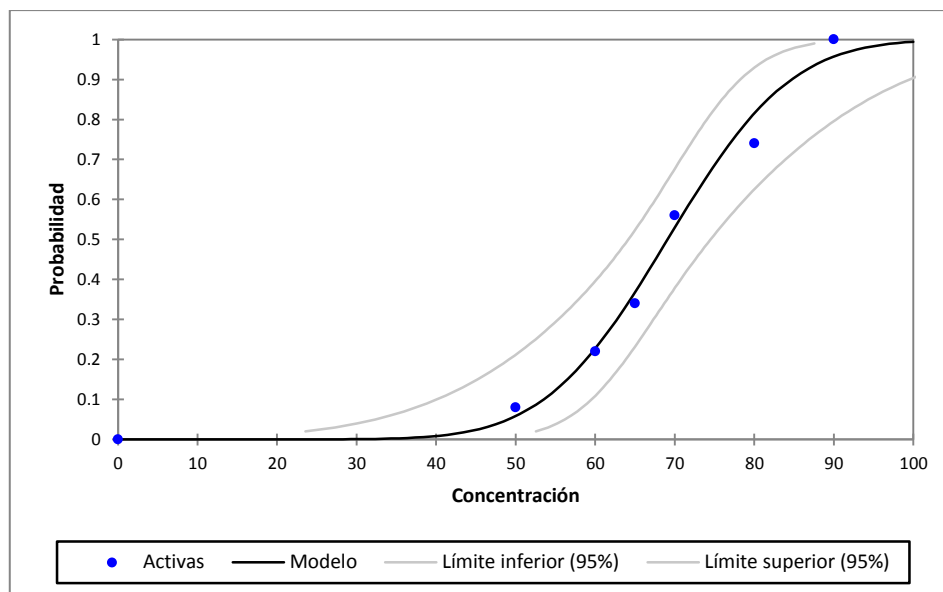
**Tabla 18: Mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Concentraciones	Repeticiones	Promedio	Mortalidad %
T6 90%	5	10	100.00
T5 80%	5	7	74.00
T4 70%	5	6	56.00
T3 65%	5	3	34.00
T2 60%	5	2	22.00
T1 50%	5	1	8.00
Control 0	5	0	0.00

Los resultados fueron analizados por el método Probit, para determinar las probabilidades de mortalidad para diferentes concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre, los resultados se presentan en la Tabla 19.

**Tabla 19: Probabilidad de mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

Probabilidad	Concentración	Límite inferior 95%	Límite superior 95%
0.01	40.807	17.634	50.127
0.05	49.096	32.357	56.177
0.10	53.514	40.080	59.529
0.20	58.865	49.167	63.852
0.30	62.723	55.356	67.332
0.40	66.019	60.192	70.759
<b>0.50</b>	<b>69.100</b>	<b>64.167</b>	<b>74.507</b>
0.60	72.182	67.580	78.817
0.70	75.478	70.740	83.918
0.80	79.336	74.038	90.290
0.90	84.686	78.237	99.501
0.95	89.105	81.539	107.273
0.99	97.393	87.545	122.040



**Figura 34: Curva Dosis- Respuesta de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en noviembre**

En la tabla 19 y figura 34, los resultados del análisis Probit indicaron que con una concentración de 40.81% del efluente provocaría una mortalidad del 1% sobre *Daphnia pulex*, mientras que con una concentración de 97.39% se obtendría un 99% de mortalidad de los individuos de esta especie.

La  $CL_{50}$  fue de 69.10% para un periodo de exposición de 48 horas, con esta concentración se obtendría una mortalidad del 50% de individuos expuestos.

También se realizó el ANOVA y la prueba de Dunnett (ver Anexo III): el ANOVA señaló la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presenta un efecto diferente.

La prueba de Dunnett indicó que todas las concentraciones presentaron un efecto diferente al control, es decir presentan algún grado de toxicidad.

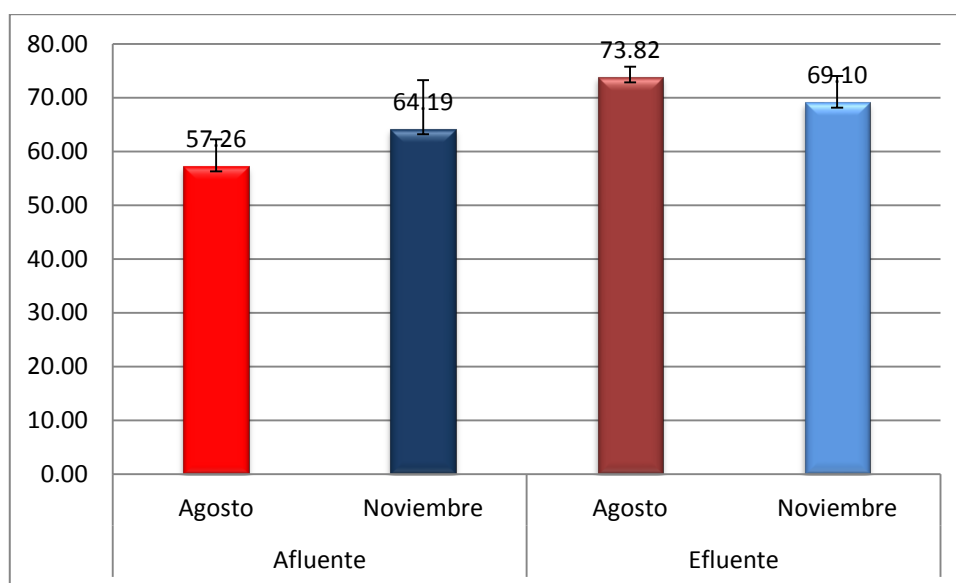
Así mismo, se estimó que la concentración sin efecto adverso observable (NOEC) estaría en concentraciones menores a 50%.

Por otro lado, se determinó la concentración más baja con efectos observables (LOEC) que fue de 50%, lo que indica que a partir de esta concentración se presentan niveles de toxicidad aguda estadísticamente significativos.

En la tabla 20, se muestra el resumen de la  $CL_{50}$  obtenidas por zona y época para las muestras de agua residual de la laguna Espinar.

**Tabla 20: Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de *Daphnia pulex* según zona y mes de evaluación**

Zona	Afluente		Efluente	
Mes	Agosto	Noviembre	Agosto	Noviembre
$CL_{50}$	57.26	64.19	73.82	69.10
ICS 95%	62.21	71.89	75.87	74.51
ICI 95%	52.34	55.13	71.92	64.17



**Figura 35: Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de *Daphnia pulex* según zona y mes de evaluación**

En la tabla 20 y figura 35, se muestra los resultados de  $CL_{50}$  para de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones de agua residual de la laguna de estabilización El Espinar, según zona y meses de evaluación; siendo la  $CL_{50}$  el indicador de toxicidad.

En el mes de agosto, la CL<sub>50</sub> del afluente la laguna de estabilización fue 57.26%, la CL<sub>50</sub> del efluente fue de 72.82%.

En el mes de noviembre, la CL<sub>50</sub> del afluente la laguna de estabilización fue de 64.19% y la CL<sub>50</sub> del efluente fue de 69.10%.

Las aguas residuales presentan una elevada carga contaminante que responde a la materia orgánica que contienen, en cuya composición se encuentran los compuestos de nitrógeno. Entre las formas de nitrógeno, unas de las de mayor interés en las aguas son el nitrógeno amoniacal y el nitrógeno total, si el medio es aerobio, el nitrógeno amoniacal se transforma en nitritos, especie altamente tóxica para la biota acuática (Sardiñas, 2004). Además la calidad y cantidad de agua residual es bastante diferente debido a la cultura, costumbres, nutrición, salud y educación de la población (Movahedian et al., 2005).

En este sentido la respuesta de mortalidad de *Daphnia pulex* podría estar asociada a las elevadas cantidades de nitrógeno total y amoniacal, ya que esta especie soporta como máximo concentraciones de 20mg/L de nitrógeno amoniacal (Sardiñas, 2004).

Para el mes de agosto, se reportó 65 mg/L de nitrógeno total, 40.78 mg/L de nitrógeno amoniacal en el afluente; 57 mg/L de nitrógeno total y 35.42 mg/L de nitrógeno amoniacal en el efluente.

Así también para el mes de noviembre se reportó 60 mg/L de nitrógeno total y 47.10 mg/L de nitrógeno amoniacal en el afluente; 47 mg/L y de nitrógeno total y 40.45 mg/L de nitrógeno amoniacal en el efluente.

García (2006), encontró una tendencia directa entre los datos de toxicidad con *Daphnia pulex* y los parámetros físico-químicos como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y el nitrógeno; concluyendo que hay condiciones que interfieren en los procesos como la nitrificación que es un paso importante en la purificación del agua residual y la eliminación de amoníaco tóxico. Así también, Coral (2012), evaluó la calidad toxicológica en el río Chillón del agua en época seca, encontrando la mayor toxicidad en la zona baja zonas con aporte excesivo de materia orgánica por las descargas domésticas e industriales que se desarrollan en estas zonas.

En la investigación del efluente de una planta de agua residual municipal sobre *Daphnia magna* en Turky, se reportó que la CL<sub>50</sub> del afluente en 48 horas de exposición fue de 15.8%, la CL<sub>50</sub> del efluente fue de 29.4%. El estudio mostró que las aguas residuales municipales podrían ser perjudiciales para la biota, incluso si cumplen con los límites máximos permisibles. Las aguas residuales municipales podrían contener tóxicos complejos, sustancias carcinogénicas y mutagénicas que son todos difíciles de determinar debido a que son mezclas complejas, es común que muestren diferentes propiedades físico-químicas basadas en el tiempo y la ubicación, por lo tanto el efecto tóxico varía de acuerdo a las condiciones medio ambientales (Koçbaşı *et al.*, 2015).

En una investigación del afluente y efluente de 3 plantas potabilizadoras en Colombia. Para el afluente la CL<sub>50</sub> estuvo entre 4% y 57 %. Para el efluente la CL<sub>50</sub> estuvo entre 23% y 100%. Concluyendo que la especie *Daphnia magna* mostró baja sensibilidad con respecto a otros organismos en la evaluación del afluente, sin embargo mostró mayor sensibilidad en la evaluación del efluente (Bohórquez *et al.*, 2012).

Se evaluaron 9 efluentes: 5 de plantas de tratamiento municipal (A, B, C, D y E) y 4 de plantas de tratamiento industrial en Korea. Las plantas de tratamiento de agua residual doméstica mostraron las siguientes CL<sub>50</sub>: A: 1000%, B: 303.03%, C: 144.92%, D: 76.34%, E: 125%. A, B y C fueron plantas de tratamiento de lodos activados; D y E fueron plantas con biodiscos o contactores biológicos rotatorios CBR. Se concluyó que la menor toxicidad se observó en efluentes de plantas de tratamiento de lodos activados (Ra *et al.*, 2007). Por lo tanto la eficiencia de remoción de contaminantes tóxicos está relacionada con la tecnología de tratamiento.

Según el estudio de evaluación de la planta de tratamiento de efluentes ubicada en Mangolpuri, en Delhi, con sistema de tratamiento de lodos activados, se concluyó que el nivel de toxicidad se reduce acumulativamente desde el afluente hasta el efluente, siendo el porcentaje de eliminación de la toxicidad 29% afluente, y 100% en el efluente final (Tyagii *et al.*, 2007).

Según un estudio del afluente y efluente de una PTAR ubicada en Portugal, sistema de tratamiento por digestión anaeróbica, que recibe agua residual doméstica e industrial, el resultado de los bioensayos con *Daphnia magna* mostró que la CL<sub>50</sub>, para el afluente

estuvo en el rango de 28.0% - 89% y para el efluente CL<sub>50</sub> estuvo en el rango de 90%-100% en un periodo de exposición de 48h; lo que demuestra la disminución del nivel de toxicidad luego del tratamiento (Mendonça *et al.*, 2012). Resultados similares fueron reportados por Blinova (2000) que reportó una CL<sub>50</sub>- 48h de agua residual sin tratamiento de 49%.

La evaluación de la posibles efectos adversos de los contaminantes como productos farmacéuticos y surfactantes presentes en el agua residual es una prioridad, debido a que son clase de compuestos biológicamente activos que tienen diferentes modos de acción; se han encontrado surfactantes en el medio ambiente acuático en niveles de 11g/L debido al su uso generalizado en el hogar, reportándose una CL<sub>50</sub> de 14 mg/L en bioensayos con *Daphnia magna* (Ying, 2006).

Smital (2010), mostró los agentes tensioactivos (surfactantes) como la clase más abundante de los compuestos presentes en muestras de aguas residuales. Los surfactantes por ejemplo los detergentes son moderadamente tóxicos para los organismos acuáticos sus concentraciones en las aguas residuales sin tratar son al menos 1000 veces mayores que las concentraciones de otros grupos de contaminantes, tales como productos farmacéuticos, pesticidas pero las tasas de eliminación son reducidas. Se concluyó que los surfactantes encontrados en efluentes tratados pueden llegar a los ecosistemas en concentraciones similares a las del agua residual sin tratamiento.

Chagua (2014) quien analizó tres efluentes de procesos de curtiembre, sobre *Daphnia magna*, reportó la CL<sub>50</sub> de 6.75% más representativa por su nivel de toxicidad; atribuyendo esta toxicidad a los contenidos de sólidos y nitrógeno amoniacal de las muestras. Igualmente Saldarriaga (2013), evaluó la toxicidad de residuos de barrido de calles en la Avenida Abancay en la ciudad de Lima con contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales, determinando una CL<sub>50</sub> de 11.25%.

El género *Daphnia* es ampliamente usado para evaluar la toxicidad de mezclas complejas de agua residual y evaluación de la eficiencia del tratamiento de agua residual tanto doméstica como industrial. Por su parte Visitación (2004), evaluó la degradación fotocatalítica de detergentes en efluentes domésticos sobre *Daphnia magna*, determinando

que la CL<sub>50</sub> fue de 7.7%. Luego del tratamiento por 8 horas se observó que la CL<sub>50</sub> para el efluente fue del 12.3%, que resultó menos tóxico.

Pintar (2004), evaluó la eficiencia del tratamiento del efluente de una planta de blanqueo de papel, con cantidades apreciables de sales contenidas, principalmente en la forma de cloruros y sulfatos, se concluyó que a pesar de una gran disminución de los compuestos químicos, el efluente tratado resultó más tóxico para *Daphnia magna*, esta observación se atribuyó a los efectos sinérgicos de ácido acético y sus sales presente en las soluciones.

#### 4.6 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EFECTO TÓXICO POTENCIAL (IETP)

El IETP es un indicador del riesgo potencial para los ecosistemas que reciben descargas directas de efluentes o vertidos. Para el cálculo del IETP se utilizó la CL<sub>50</sub> determinada (Tabla 13) y el caudal promedio diario del afluente y efluente, registrado por la empresa EMSA Puno.

Para el mes de agosto se registró un caudal promedio 24116.21 m<sup>3</sup>/día, mientras que para el mes de noviembre se registró un caudal promedio de 22056.68 m<sup>3</sup>/día (Cuadro 9).

**Tabla 21: Determinación del IETP del efluente de la laguna de estabilización El Espinar**

Mes	Punto de muestreo	Caudal promedio (m <sup>3</sup> /día)	Impresión tóxica (CL <sub>50</sub> )	Unidad Toxicológica (UT)	Carga tóxica (CT)	IETP
Agosto	PM1S	24116.21	57.26	1.75	42117.03	4.62
	PM2S	24116.21	73.82	1.35	32668.94	4.51
Noviembre	PM1L	22056.68	64.19	1.56	34363.16	4.54
	PM2S	22056.68	69.10	1.45	31919.94	4.50

En la Tabla 21, se observa que los caudales por época fueron muy parecidos debido a que fue un año atípico, por lo tanto no se observó marcada diferencia de la carga tóxica por épocas.

Las unidades toxicológicas fueron calculadas para determinar la toxicidad del afluente y efluente, en ambos meses de evaluación, según las unidades toxicológicas en todos los casos se clasifican como “moderadamente tóxicos” (Escobar, 2008).



Finalmente se calculó el IETP, para el mes de agosto, el mayor valor se observa en el afluente con 4.62, el valor en el efluente fue de 4.51; ambos resultados se clasifican como “carga toxica considerable”. Lo esperado luego del tratamiento de efluentes es que disminuya el nivel de contaminantes, es así como se concluye que la laguna de estabilización El Espinar no está operando eficientemente de acuerdo a la evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* en el mes de agosto.

Para el mes de noviembre el mayor valor del IETP fue el del afluente con 4.54, en el efluente el valor fue de 4.50 y ambos valores se clasifican como “carga toxica considerable”, es así como se concluye que la laguna de estabilización El Espinar no está operando eficientemente de acuerdo a la evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* en el mes de noviembre.

IMARPE (2014), realizó la evaluación de la calidad ecotoxicológica del agua del lago Titicaca sobre *Daphnia magna*, considerando un punto de muestreo ubicado frente a la laguna de estabilización El Espinar, encontrando una  $CL_{50}$  de 111, 714% suponiendo que la muestra pudiera concentrarse, situación hipotética a la que denominaron como moderadamente peligrosa, según su propia escala de clasificación.

Según un estudio del afluente y efluente de una PTAR ubicada en Portugal (tratamiento por digestión anaeróbica), que recibe agua residual doméstica e industrial; se concluyó que el 74% de las muestras del afluente fueron clasificadas como “tóxicos” y para el efluente todas las muestras fueron “no tóxicas”. Lo que corrobora la importancia de la eficiencia del tratamiento para asegurar la calidad toxicológica del efluente (Mendonça *et al.*, 2012).

Según Tyagi (2007), la prueba de toxicidad se puede usar como una herramienta eficaz para la evaluación la efectividad del proceso de purificación de aguas residuales en las plantas de tratamiento. Así el conocimiento de la toxicidad de los efluentes puede beneficiar a los operadores de plantas para la optimización de la operación, la protección del cuerpo receptor, el establecimiento de permisos y control de las descargas, puede dar datos de referencia más objetivos para la evaluación del riesgo medioambiental de los efluentes que se vierten en los ecosistemas naturales.

Las aguas residuales que ingresan a la laguna de estabilización El Espinar, reciben aportes de variedad de antibióticos de los desechos hospitalarios y otros centros de salud. Aun cuando no hay investigaciones de los impactos negativos de los antibióticos en los organismos acuáticos en el Perú; los efectos secundarios debido a los cambios en el equilibrio natural no son despreciables.

Atendiendo a estas consideraciones Kümmerer (2009), investigó sobre algunas sustancias como los antibióticos que no se eliminan de ninguna manera y llegar al medio ambiente con el potencial de afectar adversamente la salud pública al llegar a los seres humanos de nuevo a través del agua potable; al llegar al ecosistema acuático afectan especialmente a bacterias, hongos y microalgas; otra conclusión a la que arribó Kümmerer (2009) fue la presencia de una amplia variedad de antibióticos de los desechos hospitalarios, que presentaron efectos adversos y efectos sinérgicos en la mezcla de antibióticos contra la población microbiana de lodos de plantas de tratamiento, es así que la inhibición de las bacterias de aguas residuales puede afectar seriamente a la degradación de la materia orgánica.

Los contaminantes o compuestos tóxicos contenidos en el agua residual, tienen la capacidad de reaccionar químicamente y llegar a estar disponibles para ser incorporados a lo largo de la cadena trófica, como es el caso de los metales pesados (López, 2005).

Argota (2013), indica que las aguas del río Ramis de la cuenca del Titicaca presentaron efectos ecotoxicológicos, basado en las determinaciones de parámetros físico-químicos y de metales pesados, evaluó el efecto bioacumulativo en las branquias e hígado en *Gambusia punctata* encontrando que el plomo y el cadmio mostraron capacidad bioacumulativa en los tejidos de esta especie.

Por otro lado, las investigaciones del IETP de diferentes sectores de actividad industrial, reportan lo siguiente:

López (2009), investigó el índice de efecto toxico potencial (IETP) para el efluente de la industria tipo frigorífico con altos contenidos de hipoclorito de sodio, calculando una carga tóxica de 2,7 catalogada como reducida, así mismo demostró una reducción de los niveles de toxicidad determinando el IETP para el efluente tratado, con una carga toxica de

1, 4 catalogada como despreciable. En la investigación también evaluó efluentes de la industria de curtiembre con tratamientos con cromo, determinando un IETP de 0,6, lo cual es indicativo de una carga tóxica despreciable. Siendo el cromo particularmente peligroso por su poder de bioacumulación y biomagnificación.

López (2009), evaluó el efluente de la industria de curtiembre en la etapa de proceso de ribera en el que se emplean sulfuros, hidróxido de sodio, el hipoclorito de sodio, los agentes tensoactivos, preparaciones enzimáticas, sales de amonio, peróxido de hidrógeno, azúcares, melazas y materia orgánica que arrojó un IETP de 1.7 clasificado como carga tóxica despreciable al presentar mínimos caudales. Debido a que *Daphnia* carece de mecanismos de regulación iónica ocurre una muerte rápida al exponerse a determinados efluentes.

Se evaluó el efluente de una planta cloro-soda (industria inorgánica) obteniendo el IETP de 4,5 clasificado como carga tóxica considerable. Estos resultados se deben a la presencia de cloruros en cantidades muy elevadas que generó problemas de salinidad que inducen a alteraciones osmóticas sobre los organismos expuestos (López, 2009),

López (2009), investigó el efluente del patio de cenizas de la industria termoeléctrica con contenidos de sólidos totales de entre 120 a 1640 mg/L, determinando un IETP de 3,9, por lo que la carga tóxica del efluente se considera moderada. Al evaluar el efluente de la industria galvanoplástica con presencia de metales pesados como: aluminio, cobre, cromo, hierro y zinc; determinó un IETP DE 4,6 clasificado como carga tóxica considerable.

Es preciso señalar que los mencionados efluentes industriales que contenían especies químicas conocidas por su alta toxicidad, presentaron bajos caudales lo que fue un factor determinante para el resultado del IETP.

Chagua (2014), investigó efluentes de desecado y reportó IETP < 1.99 que se clasifica como cargas tóxicas despreciables, atribuyéndolo a reacciones antagónicas que disminuyeron el grado de toxicidad del vertimiento. Sin embargo estos resultados se pueden corresponder con los volúmenes de los efluentes. Así también señala que este efluente podría generar problemas a la biota acuática se fuera vertido a un cuerpo de agua,

es así que se debe considerar la capacidad de dispersión del medio receptor, vientos predominantes, entre otros factores.

Según Beyer (2014), evaluar los riesgos potenciales de mezclas químicas representa un reto más que difícil debido a la amplia gama de contaminantes antropogénicos. Considera que existe un alto riesgo de los organismos acuáticos expuestos no solo a los contaminantes actuando independientemente sino también a los efectos combinados. Además, los contaminantes afectan especialmente a etapas de la vida más sensibles y organismos más sensibles; estos contaminantes interactúan a lo largo de la cadena trófica bioacumulándose de tal forma que las especies que se encuentran en altas posiciones ecológicas/tróficas muestran la persistencia de los contaminantes al biomagnificarse.

Sobre la base de las ideas expuestas se concluye que el efluente de la laguna de estabilización El Espinar presentó un IETP con carga toxica considerable, en los meses de evaluación. Situación que está afectando el ecosistema de la bahía interior de Puno que en la actualidad presenta problemas de eutrofización. La tarea prioritaria sería establecer parámetros de evaluación toxicológicas complementarios a las evaluaciones físico-químicas. A este respecto Badii (2005), menciona la metodología creada por Van Leeuwen en 1990, que se basa en la concentración de los efectos no observados (NOEC) y la concentración más baja de efectos observados (LOEC) en exposiciones agudas y crónicas. En muchos países de la Unión Europea, ya existe legislación que establece parámetros toxicológicos para efluentes que son descargados en ecosistemas.

Los parámetros NOEC,  $LC_{50}$  y LOEC son dependientes del tiempo de exposición, lo que complica la evaluación de riesgo ambiental. La práctica señala que es posible estimar las concentraciones de la NOEC para construir modelos lógicos acerca de los resultados típicos de las pruebas de toxicidad (Kooijman *et al.*, 1996).

Es así que en estudios toxicológicos hay que considerar parámetros de evaluación como el NOEC (Concentración con efecto adverso no observable) y LOEC (Concentración más baja con efecto observable); pues son estos parámetros que ayudan a establecer la normatividad que considere evaluaciones toxicológicas complementarias a las evaluaciones físico-químicas.

#### **4.7 PROPUESTAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DE LOS EFLUENTES VERTIDOS EN LA BAHÍA DE PUNO**

La eficiencia del tratamiento de la laguna de estabilización El Espinar, respecto a remoción de materia orgánica. En el mes de agosto fue de 64.98% y en el mes de noviembre fue de 66.71%. Valores que se mostraron por debajo de lo establecido por la Norma OS.090, la cual referencia porcentajes de remoción de materia orgánica: 78-85 % para lagunas de estabilización.

De acuerdo con la evaluación y determinación de los impactos ambientales generados por actividades productivas en el lago Titicaca y zonas de influencia realizado por el instituto del Mar Peruano (2014), los resultados de la matriz de impactos, actividades económicas y factores ambientales en la Bahía de Puno, para octubre del 2014, mostraron que el vertimiento de aguas residuales es una de las actividades que causaron mayor impacto sobre la bahía de Puno, por lo que se debe priorizar la mitigación del impacto ambiental como medida correctiva.

Por otro lado, según el primer monitoreo participativo interinstitucional, las concentraciones de fosforo total encontradas (597 ug/L) es una consecuencia directa de la contaminación generada por la descarga continua tanto de aguas municipales crudas, la escorrentía superficial de la microcuenca de Puno, como por la descarga de aguas residuales deficientemente tratadas en la laguna de estabilización el Espinar, situación que ha afectado los componente de flora y fauna acuática (ANA, 2013).

#### **Proceso y resultados de las iniciativas de gestión ambiental**

El Ministerio del Ambiente viene realizando acciones a través de comisión multisectorial para la prevención y recuperación ambiental del Lago Titicaca y sus afluentes conformada según D.S. N° 075-2013-PCM, desde el año 2013, que está conformada por 26 instituciones de los 3 niveles de gobierno, así como por la sociedad civil.

La comisión multisectorial, ha elaborado algunos documentos como parte de su plan de trabajo 2014-2015, los cuales son:

- Informe estado de la inversión pública en la prevención y recuperación ambiental del lago Titicaca – lado peruano.
- Informe estado de la calidad ambiental de la cuenca del lago Titicaca – lado peruano.
- Proceso de elaboración de la agenda de investigación ambiental de la cuenca del Lago Titicaca.

Por otro lado la agencia de promoción de la inversión privada (Pro-Inversión) y la asociación público privada (APP) en la modalidad de concesión por un plazo de 30 años, viene impulsando el proyecto: “Sistema de tratamiento de las aguas residuales de la cuenca del Lago Titicaca – Puno” con código IP-040-2014. El objetivo general del proyecto es desarrollar una solución para el tratamiento de las aguas residuales municipales de la cuenca del Lago Titicaca en Puno, en el ámbito urbano de los principales distritos ubicados en el lado peruano de la cuenca del Lago Titicaca (Puno, San Román, Melgar, Collao, Azángaro, Yunguyo, Chucuito, Huancané, Moho, Lampa). La propuesta considera mantener en buen estado el 100% de la infraestructura durante el periodo de concesión, de modo que se asegure el cumplimiento de los niveles de servicio y se garantice la conservación del ambiente. El costo total de la inversión se calcula en un aproximado de 437 millones de dólares, el proyecto se encuentra en la etapa de evaluación.

Se considera una prioridad para la ciudad de Puno, la ejecución y puesta en marcha del proyecto en mención. Debido a las deficiencias encontradas en el actual sistema de tratamiento. Desde el año 2010, la empresa prestadora de servicios EMSA Puno no cuenta con la autorización de vertimiento, en consecuencia el 1ero de abril del 2016, el ANA multó a EMSA Puno con 25 UIT por haber realizado vertimientos sin autorización a la bahía interior de Puno en el Lago Titicaca (Resolución N° 145-2016-ANA-TNRCH).

Se hacen las siguientes propuestas para la mejora de la Gestión Ambiental del efluente vertido a la bahía interior de Puno:

Para el año 2016, los problemas de colapso de las redes de alcantarillado así como de la sobrecarga de los sistemas de tratamiento de aguas residuales en época de lluvias se han incrementado. Por lo que se identifica la necesidad de la instalación de una red de drenaje pluvial en la ciudad de Puno.

Se propone a la empresa EMSA Puno, ejecute sus proyectos de ampliación el sistema de alcantarillado de la ciudad de Puno en cumplimiento del Programa de Mejoramiento Institucional y operacional del Plan Maestro Optimizado 2012-2042.

Así también se Propone a la Municipalidad Provincial de Puno, considere la necesidad de la construcción de un sistema de colección separado, de tal manera que exista una red pluvial para evitar colmatación de las redes de alcantarillado así como recarga del sistema de tratamiento de agua residual en época de lluvia.

- Es importante que la empresa EMSA mejore los mecanismos de control y fiscalización de los valores máximos admisibles establecido por el D.S. 021-2009 VIVIENDA, debido a que los efluentes no domésticos que se descargan al sistema de alcantarillado causa daño progresivo a la red de alcantarillado y sobrecarga los sistemas de tratamiento con altas cargas orgánicas, aceites y grasas los mismos que influyen en los procesos de tratamiento del agua residual.
- Los resultados de la presente investigación mostraron que la laguna de estabilización el Espinar requiere control operacional y mantenimiento más efectivos, para que sean realizadas con eficiencia las rutinas operacionales básicas y se implemente el mantenimiento de anotaciones diarias para montar un archivo histórico del funcionamiento de la PTAR, fundamental en el mantenimiento de la calidad del efluente tratado y la protección del medio ambiente.

Se propone mejorar las condiciones de Operación y Mantenimiento:

1. Mejoras a nivel de operación básica:

- Control de Niveles del Agua
- Medición de la Profundidad de Lodos
- Mejoras a nivel del mantenimiento rutinario
- Mantenimiento de rejillas, desarenadores y otras estructuras de la PTAR
- Remoción de Natas y Sólidos Flotantes
- Control de malezas y vectores

## 2. Implementación de herramientas de Mantenimiento:

- Registros de Campo de la Operación Básica y Mantenimiento Rutinario
- Operación para el Control del Funcionamiento

3. Remoción de lodos, en el año 2009, se realizó el proyecto “Agua potable y alcantarillado para la ciudad de Puno- Kreditanstalt Fur Wiederaufbau (KfW)” dentro del componente “Limpieza de las lagunas de estabilización”, solo se realizó la primera etapa, los trabajos ejecutados dentro de la unidad de tratamiento secundaria fueron: el drenado, la remoción, acumulación, estabilizado y traslado de lodos semisecos al contorno de los diques para su carguío, transporte y disposición final al sector de Capullani. Quedando pendiente la segunda etapa del componente el Limpieza de la laguna de estabilización primaria (EMSA Puno, 2009).

Se evidencia la necesidad de la remoción de lodos de ambas unidades de tratamiento, para mejorar el funcionamiento del sistema de tratamiento.

4. Capacitación del personal, se propone un curso integral de operación y mantenimiento de los sistemas de tratamiento, a todos los técnicos y operadores de la empresa EMSA Puno debido a que estas tareas son decisivas para el buen funcionamiento del sistema.

Finalmente es importante recalcar la importancia del mantenimiento periódico de la PTAR para conservar condiciones de limpieza e higienización, debido a que las unidades de tratamiento se han convertido en un foco de proliferación de malos olores y de vectores de enfermedades que afecten la salud de la población, además de causar daños ambientales.

- Al existir una débil conciencia ambiental e indiferencia por parte de la población, así como el desconocimiento de los procedimientos de tratamiento y disposición final de las aguas residuales, se identifica la necesidad de incidir en la educación ambiental con el objetivo el cambio de las actitudes poblador frente a medio biofísico y hacia una mejor comprensión y solución de los problemas ambientales.



Desde el año 2012, está vigente el compromiso de las autoridades con la firma del “Pacto de gobernanza ambiental” de priorizar y orientar los esfuerzos de manera sincronizada y unificadamente a la dimensión ambiental en el marco de sus funciones y competencias, para preservar, proteger, conservar y promover el uso racional de los recursos naturales y medio ambiente en el marco de los lineamientos de la Política Regional Ambiental. Pero estos compromisos no se han cumplido, ya que en la ciudad de Puno, no hay promoción del uso racional de los recursos, ni trabajo interinstitucional concertado referido a la problemática.

La Municipalidad Provincial de Puno podría asumir el rol de promover y asesorar la realización de actividades para que la población tome conciencia de que la limpieza de su ciudad y la recuperación de la bahía interior de Puno, no solo mejorarán su salud y calidad de vida, sino que harán a la ciudad más atractiva y segura, con efectos en la mejorar económica por actividades con el eco-turismo.

## V. CONCLUSIONES

- El grado de toxicidad del efluente de la Laguna de Estabilización el Espinar en ambos meses evaluados, fue clasificado como “considerable”. Así mismo *Daphnia pulex* y *Lactuca sativa* L fueron organismos sensibles y respondieron a las sustancias contaminantes presentes en el efluente, siendo *Daphnia pulex* la especie que resultó con mayor grado de sensibilidad frente *Lactuca sativa* L.
- En los bioensayos con *Lactuca sativa* L, la mayor inhibición fue a nivel de la radícula. Para las evaluaciones del mes de agosto, el análisis de regresión lineal mostró que al incrementar 1% la concentración de efluente, la inhibición de crecimiento de la radícula fue de 1.50%. Para las evaluaciones en el mes de noviembre, se observó que hubo efecto de inhibición del crecimiento de la radícula con los tratamientos con mayores concentraciones pero cuando los tratamientos fueron muy diluidos no hubieron respuestas de inhibición.
- En los bioensayos con *Daphnia pulex*, la CL<sub>50</sub> del efluente en el mes de agosto fue de 73.89% con unos límites de confiabilidad del 95% (límite inferior 71.92% y límite superior 75.87%). La CL<sub>50</sub> del efluente en el mes de noviembre fue de 69.10% con unos límites de confiabilidad del 95% (límite inferior 64.17% y límite superior 74.51%).
- Según la escala de clasificación de la carga tóxica en función al índice de efecto tóxico potencial (escala del 1 al 6), el IETP del efluente en el mes de agosto fue de 4.51 y de 4.50 en el mes de noviembre. Ambos índices son catalogados como “**carga toxica considerable**” lo que indica que no hubo disminución del nivel de toxicidad luego del tratamiento según los resultados de los meses evaluados.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda que el Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento proponga al Ministerio del Ambiente considerar dentro de la evaluación de los estándares de calidad ambiental para agua, el método para la medición de toxicidad aguda, utilizando al organismo *Daphnia* para la evaluación de toxicidad aguas residuales industriales y municipales, en pro de la protección ambiental.
- Se sugiere realizar futuras investigaciones para evaluar el grado de toxicidad del efluente de la laguna de Estabilización el Espinar considerando la estacionalidad en un año normal.
- Se recomienda realizar futuras investigaciones para evaluar el grado de toxicidad de los lodos de la laguna de estabilización, evaluar el grado de toxicidad de los sedimentos de la bahía interior del Lago Titicaca.
- Es necesario que la Municipalidad Provincial de Puno y la empresa EMSA Puno y demás actores involucrados consideren la propuesta de gestión ambiental presentada en la presente investigación.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANA (Autoridad Nacional del Agua). 2013. Evaluación del estado de calidad del agua de la bahía interior del Puno y bahía de Puno- lago Titicaca. Informe primer monitoreo participativo. s.n.t. 125 p.

APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WPCF (Water Pollution Control Federation). 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Diaz de Santos S.A. Madrid SP. s.p.

Argota, G.; Miranda, E.; Argota, H.2013. Predicción ecotoxicológica de parámetros físico-químicos, plomo y cadmio en el río Ramis-Cuenca Hidrográfica Titicaca, Puno-Perú. Revista. Investig. (Esc. Post Grado) V 5, N°3, 2009.

Badii, M.; Garza, R.; Garza, V.; Landeros, J. 2005. Los indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación por agroquímicos en ecosistemas acuáticos y asociados. Año 2, No 6.

Barile, F. 2008. Principles of toxicology testing. Florida: CRC Press.

Bazai, Z.; Achakzai, K. 2006. Effect of wastewaters from Quetta city on germination and seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Appl Sci J 6:380–382

Beg, N.; Farooq, U. 2002. Water pollution impact on cereal – a case study. Water Soil 3:25–34.

Beyer, Y.; Petersen, K.; Song, Y. Ruus A.; Grung, M.; Bakke, T.; Tollefsen, K. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. Marine Environmental Research 96 (2014) 81-91p.

Blinova, I. 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environ Toxicol* 19: 425–428, 2004.

Bohórquez, P. Duarte, M.; León, N.; Caicedo, Fabian; Vásquez, M.; Campos, C. 2012. Selection of a bioassay battery to assess toxicity in the effluents and effluents of three water-treatment plants. *SICI: 2027-1352(201205/08) Vol. 17 N° 2. 152- 156pp.*

Cahua, E.; Morales, L. 2014. Análisis ecotoxicológico del efluente de encale en bioensayos con *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* y *Chorella vulgaris*. Tesis Ing. Amb. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina. 64p.

Castillo, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Canadá. 189pp.

Chen, T.; Chia, O. 2002. Vegetable growth in polluted soils in China. *Environ Sci* 2:193–195

CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente) y OPS (Organización Panamericana de la Salud). 1995. Plan estratégico para el mejoramiento ambiental de la ciudad de Puno. 50pp.

Conversatorio Perú- Bolivia. 2016. Recuperación ambiental del lago Titicaca y sus afluentes. Avances Nacionales y acuerdos binacionales. 43pp.

Comisión multisectorial para la prevención y recuperación ambiental del lago Titicaca y sus afluentes. Plan de trabajo 2014 – 2015.

Coral, L.; Dioses, R.; Paredes, C. 2012. Avances en la evaluación de riesgo ecológico de la cuenca media del río Chillón: ensayos ecotoxicológicos con *Daphnia magna* strauss (cladocera: daphniidae), y *Chironomus calligraphus* (goeldi) (díptera chironomidae) Lima- Perú. *The Biologist*, vol. 10, Suplemento Especial.

Cortés, F.; Treviño, A.; Alcorta, M.; Sáenz A.; González, J. 2015. Optimización en el diseño de lagunas de estabilización con programación no lineal. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(2), 85-100.

DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental). 2007. Protocolo de monitoreo de la calidad sanitaria de los recursos hídricos superficiales. MINSA, PE. s.n.t. 14p.

EMSA Puno (Empresa Municipal de Saneamiento Básico). 2012. Plan Maestro Optimizado. Puno-PE. s. n. t. 140p.

EMSA Puno (Empresa Municipal de Saneamiento Básico). 2011. Resumen Descriptivo del Sistema de Tratamiento de agua residual en la ciudad de Puno. s.n.t. 6p.

ENFEN (Estudio Nacional del Fenómeno El Niño). 2015. Comunicado oficial ENFEN N° 19-2015. s.n.t. 3p.

Escobar, P. 2008. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia pulex* para la evaluación de muestras ambientales. Épsilon N.º 12: 115-133.

Flores, R. 2014. Análisis del problema de agua potable y saneamiento: ciudad de Puno. Rev. Investig. Altoandin. 2014; Vol 16 N° 1: 05 – 08.

Fendri, I; Saad, R.; Khemakhem, B.; Halima, N.; Gdouraa, R.; Abdelkafid, S. 2012. Effect of treated and untreated domestic wastewater on seed germination, seedling growth and amylase and lipase activities in *Avena sativa* L. J Sci Food Agric 2013; 93: 1568–1574.

García, V.; Sánchez, J.; Pacheco, V.; Ávila, C.; Pavón, T.; Guerrero, P. 2006. Respuestas de toxicidad de bioensayos empleados en la evaluación de aguas residuales de la industria. s.n.t. Toluca MX. 11p.

González, Y.; Marcos, E.; Pérez, N.; Marin, D. y Argota G. 2012. Aplicación de un bioensayo ecotoxicológico en la evaluación de una mezcla compleja ambiental. Higiene y Sanidad Ambiental, 12 (1): 839-845 (2012).

Häder, D.; Erzinger, G. 2015. Ecotox -Monitoring of Pollution and Toxic Substances in Aquatic Ecosystems. Research & Reviews: Journal of Ecology and Environmental Sciences ISSN: 2347-7830.

IMARPE (Instituto del Mar Peruano). 2013. Mortandad de peces en la bahía interior de puno del lago Titicaca. 14p.

IMARPE (Instituto del Mar Peruano). 2014. Evaluación y determinación de los impactos ambientales generados por actividades productivas en el lago Titicaca y zonas de influencia. 80p.

IPE (Instituto Peruano de Economía). 2015. Análisis de competitividad regional. Consultado 03 may 2015. Disponible en: [ipe@ipe.org.pe](mailto:ipe@ipe.org.pe)

Koçbaş, F.; Oral, R. 2015. *Daphnia magna* as a test species for toxicity evaluation of municipal wastewater treatment plant effluents on freshwater cladoceran in Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 15: 1-2.

Korner S, Das SK, Veenstra S, Vermaat JE. 2001. The effect of pHvariation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. Aquat Bot 71:71–78.

Kooijman, S.; Bedaux, J. 1996. Analysis of toxicity test on daphnia survival and reproduction. Wat. Re5. V01. 30, N0. 7, pp. 1711-1723.

Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment. Chemosphere 75 (2009) 417–434.

López M. & Grau M. 2005. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de los pastos de la España peninsular. II Resultados por Provincias. Ministerio de Educación y Ciencia e Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria.

López, L. 2009. Determinación de la Concentración Letal Media CL50-48 del Cloro del efluente en una industria tipo mediante ensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex*. Tesis Ing. Amb. y Sanitario. Bogotá D.C. Universidad de la Salle. 102p.

Mendonça, E.; Picado, A.; Paixão, S.; Silva, L.; Barbosa, M.; Cunha, M. 2012. The role of ecotoxicological evaluation in changing the environmental paradigm of wastewater treatment management. Journal of Hazardous Materials 163, pp 665-670.

MINAM (Ministerio del Ambiente). 2013. Línea base ambiental de la cuenca del Lago Titicaca. s.n.t. 85p.

MINAM (Ministerio del Ambiente). 2010. D.S. N°003-2010-MINAM. Límites Máximos Permisibles para los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales.

MINSA (Ministerio de Salud). 2007. R.D. 2254-2007-DIGESA-SA Protocolo de Monitoreo de la calidad sanitaria de los recursos hídricos superficiales. 14p.

MVCS (Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento). 2013. Protocolo de monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales.

Movahedian, H.; Bina, B.; Asghari, G. 2005. Toxicity evaluation of wastewater treatment plant effluents using *Daphnia magna*. Iranian J Env He Iranian J Env Health Sci Eng, 2005, Vol.2, No.2, pp.1-4

Müller, O. 1785. Entomostraca seu Insecta testacae quae in aquis Daniae et Norvegiae reperit. Consultado 01 de jul 2015. Disponible en: <http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/fichataxonomica.php?id=186&nivel=Genero&nombre=Daphnia>

Munawar, I. 2016. Vicia faba bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. Chemosphere 144 (2016) 785–802

Navarro AR, Arrieta RG, Maldonado MC. 2006. Determinaciones de efectos de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga escarola y achicoria. Rev. Toxicol. 2006; (23):125-129.

Northcote, T. 1991. Contaminación del lago Titicaca, Perú: capacitación, investigación y manejo. Canada. Northburn printers. 278p.



Núñez, M.; Hurtado, 2005. Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Rev. Perú. biol. 12(1): 165-170.

Oakley, S. 1998. Lagunas de estabilización para tratamiento de aguas negras: Las experiencias de Honduras, Nicaragua, El Salvador y Guatemala, Red Regional de Agua y Saneamiento de Centro América (RRAS-CA), Tegucigalpa, Honduras.

Oakley, S. 2005. Manual de diseño, construcción, operación, mantenimiento, monitoreo y sostenibilidad de lagunas de estabilización

Oakley, S. 2011. Tratamiento de aguas residuales domésticas en Centroamérica. Un manual de experiencias, diseño, operación y sostenibilidad. s.n.t. 410p.

Plaza G., Nalecz-Jawecki G., Ulf K. y Brigmon R.L. 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. Chemosphere 59, 289-296.

Persoone, G; Baudo, R; Cotman, M; Blaise, K; Thompson, CL; Moreira-Santos, M; Vollat, B; Törökne, A; Han, T. 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test: Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs knowledge and management of aquatic ecosystems 393, 01.

PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 2011. Perspectivas del Medio Ambiente en el Sistema Hídrico Titicaca- Desaguadero- Poopó- Salar de Coipasa (TDPS) - GEO Titicaca. Panamericana Formas e Impresos S.A. CO. 184p.

Pintar, A.; Bessonb, M.; Gallezot, P.; Gibert, J.; Martin, D. 2004. Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of Kraft bleach plant effluents treated by catalytic wet-air oxidation. Water Research 38 (2004) 289–300.

Ra, J.; Kim, S.; Chang, N.; An, K. 2007. Ecological health assessments based on whole effluent toxicity tests and the index of biological integrity in temperate streams influenced by wastewater treatment plant effluents. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 26, No. 9, pp. 2010–2018.

Ramirez, P., Mendoza, A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. MX. 428p.

Richards, K., Marshall, R. 2002. Productivity and quality decline in some selected vegetables and oil-seed crops in United States due to water pollution. *Environ Res* 7:35–44.

Rodriguez de Moraes, P; Dobreff, J; Gunnar, L. 2014. The plants by Daniel Rolander in *Diarium surinamicum* (1754–1765) and herbaria. *Phytotaxa* 165 (1): 001–101.

Rolim, M. 2000. Lagunas de Estabilización. En: Como utilizar Aguas Residuales Tratadas en Sistemas de Regadío. Santa Fé de Bogotá. McGraw-Hill.

Saldarriaga, M. 2013. Análisis de toxicidad de residuos del barrido de calles en la Avenida Abancay. Tesis Ing. Amb. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina. 133p.

Sardiñas, O.; Pérez, A. 2004. Determinación de nitrógeno amoniacal y total en aguas de consumo y residuales por el método del fenato. *Rev Cubana Hig Epidemiol* v.42 n.2.

SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología). 2015. Boletín Hidrometeorológico Regional. PE. s.n.t. 13p.

Smital, T.; Terzic, S.; Zaja, R.; Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M.; Mikac, I.; Tollefsen, E.; Thomas, K.; Ahel, M. 2010. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (2011) 844–851.

Sobrero, M.; Ronco, A. 2004. Ensayo de Toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. 55-77p

Sobrero, M. 2010. Estudio de la Fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayo con plantas vasculares como organismos diagnóstico. Tesis Dr. La Plata. AR. Universidad Nacional de la Plata. 218p.

SUNASS (Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento). 2013. La EPS y su Desarrollo. PE. s.n.t. 141p.

SUNASS (Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento). 2015. Diagnóstico de las plantas de tratamiento de aguas residuales en el ámbito de operación de las entidades prestadoras de servicios de saneamiento. s.n.t. 150p.

Tyagi, V.; Chopra, A.; Durgapal, N.; Kumar, A. 2007. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of municipal sewage treatment plant, J. Appl. Sci. Environ. Mgt. March, 11 (1): 61 – 67.

Tarswell, C. 1971. Bioassays to determine allowable waste concentration in the aquatic environment: Measurement of pollution effects on living organisms. Proc. Roy. Soc. Londres B. 1971: 177: 279.

Torres, M.; García, M.; Hernández, N.; Fernández, M. 2006. Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa* L. Higiene y Sanidad Ambiental, 6: 170-172.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1986. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. US EPA 600/3-88/029. Washington DC.

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. 5th ed.

Visitación, L. 2004. Degradación fotocatalítica de detergentes en efluentes domésticos. Tesis Magíster en Química. Lima PE. Pontificia Universidad Católica del Perú. 92p.

Ying, G. 2005. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Environment International 32 (2006) 417-431.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO I: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

#### A. *Lactuca sativa L*

##### Prueba de sensibilidad de *Lactuca sativa L* con el tóxico de referencia Sulfato de Zinc ( $ZnSO_4$ )

Concentración (ppm)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
0.001	9.04	21.78	78.48	27.4
0.01	6.45	10.63	84.64	64.58
0.1	4.10	2.2	90.25	92.66
1	0	0	100	100
10	0	0	100	100
Control	42	30	0	0

FUENTE: Elaboración propia (2015)

#### B. *Daphnia pulex*

##### Parámetros físico-químicos de los tratamientos con el tóxico de referencia Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$

Tratamiento	Concentración (mg/L)	Ph	Temperatura (°C)	OD
T1	0.05	7.53	14.8	6.76
T2	0.1	7.46	14.7	6.72
T3	0.145	7.41	14.4	6.70
T4	0.16	7.46	14.1	6.69
T5	0.19	7.39	14.2	6.68
Control	0	7.75	14.5	6.87

FUENTE: Elaboración propia (2015)

##### Prueba de sensibilidad de *Daphnia pulex* con el tóxico de referencia - Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$

Tratamiento	Concentración mg/L	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
T1	0.005	10	10
T2	0.1	10	10
T3	0.145	10	10
T4	0.16	10	10
T5	0.19	10	10
Control	0	10	0

FUENTE: Elaboración propia (2015)

## ANEXO II: SCREENING TEST

### A. Screening test para bioensayos con *Lactuca sativa L.*

#### - Afluyente en el mes de agosto

Primer Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L.*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	40.2	27.89	9.91	19.97
M1D2	50	44.52	34.72	0.22	0.37
M1D3	25	44.39	34.79	0.52	0.17
M1D4	12.5	44.65	34.82	-0.07	0.09
M1D5	6.25	44.73	34.97	-0.25	-0.34
M1D6	3.13	44.63	35.01	-0.02	-0.46
Control	-	44.62	34.85	0.00	0

Segundo Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L.*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	39.28	25.99	12.11	25.42
M1D2	90	42.74	26.25	4.36	24.68
M1D3	80	44.07	32.90	1.39	5.60
M1D4	70	44.43	33.92	0.58	2.67
M1D5	60	44.41	34.34	0.63	1.46
M1D6	50	44.58	34.75	0.25	0.29
Control	-	44.69	34.85	0	0

- **Efluente en el mes de agosto**

Primer Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M2D1	100	40.55	28.91	9.12	17.04
M2D2	50	44.52	34.72	0.22	0.37
M2D3	25	44.63	34.81	-0.02	0.11
M2D4	12.5	44.94	35.54	-0.72	-1.98
M2D5	6.25	45.67	36.03	-2.35	-3.39
M2D6	3.13	45.80	35.67	-2.64	-2.35
Control	-	44.62	34.85	0.00	0.00

Segundo Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración(%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M2D1	100	41.12	29.78	7.22	14.94
M2D2	90	41.70	23.99	5.91	31.48
M2D3	80	44.12	32.42	0.45	7.40
M2D4	70	44.43	33.56	-0.25	4.14
M2D5	60	44.14	34.76	0.41	0.71
M2D6	50	44.00	35.63	0.72	-1.77
Control	-	44.32	35.01	0.00	0.00

- **Efluente a 50 metros del emisario en el mes de agosto**

Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	48.79	36.47	-7.00	-3.09
M1D2	50	50.19	37.08	-10.07	-4.81
M1D3	25	49.29	38.54	-8.09	-8.94
M1D4	12.5	51.79	38.47	-13.57	-8.74
M1D5	6.25	56.79	36.97	-24.54	-4.50
M1D6	3.13	53.96	39.47	-18.33	-11.57
Control	-	45.6	35.38	0	0

- **Afluente en el mes de noviembre**

Primer Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	43.71	27.97	5.02	20.74
M1D2	50	46.16	34.54	-0.30	2.13
M1D3	25	46.79	34.90	-1.67	1.11
M1D4	12.5	46.83	35.13	-1.76	0.45
M1D5	6.25	47.05	35.17	-2.24	0.34
M1D6	3.13	47.13	35.21	-2.41	0.23
Control	-	46.02	35.29	0	0

Segundo Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de

*Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración(%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	43.56	24.61	6.40	31.05
M1D2	90	43.78	27.03	5.93	24.26
M1D3	80	46.66	33.27	-0.26	6.78
M1D4	70	46.75	34.37	-0.45	3.70
M1D5	60	46.98	34.41	-0.95	3.59
M1D6	50	46.31	34.62	0.49	3.00
Control	-	46.54	35.69	0	0

**-Efluente en el mes de noviembre**

Primer Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de *Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	48.60	34.45	-5.61	2.38
M1D2	50	47.59	35.92	-3.41	-1.79
M1D3	25	48.32	35.67	-5.00	-1.08
M1D4	12.5	48.67	35.45	-5.76	-0.45
M1D5	6.25	48.96	36.02	-6.39	-2.07
M1D6	3.13	50.45	36.15	-9.63	-2.44
Control	-	46.02	35.29	0	0



Segundo Screening test para inhibición del crecimiento de hipocotilo y radícula (mm) de  
*Lactuca sativa L*

Tratamiento	Concentración (%)	Hipocotilo (mm)	Radícula (mm)	Inhibición crecimiento hip (%)	Inhibición crecimiento rad (%)
M1D1	100	48.6	32.55	-4.43	8.80
M1D2	90	45.56	34.75	2.11	2.63
M1D3	80	45.67	34.88	1.87	2.27
M1D4	70	46.46	35.26	0.17	1.20
M1D5	60	46.75	35.60	-0.45	0.25
M1D6	50	47.02	36.21	-1.03	-1.46
Control	-	46.54	35.69	0	0

**B. Screening test para bioensayos con *Daphnia pulex***

- **Afluente en el mes de agosto**

Primer Screening test para mortalidad de *Daphnia*

Tratamiento	Concentración %	# <i>Daphnias</i> expuestas	# <i>Daphnias</i> muertas
M1D1	100	10	10
M1D2	50	10	5
M1D3	25	10	0
M1D4	12.5	10	0
M1D5	6.25	10	0
M1D6	3.13	10	0
Control	0	10	0

Segundo Screening test para mortalidad de *Daphnia*

Tratamiento	Concentración %	# <i>Daphnias</i> expuestas	# <i>Daphnias</i> muertas
M1D1	95	10	10
M1D2	85	10	10
M1D3	75	10	10
M1D4	65	10	6
M1D5	55	10	4
M1D6	45	10	1
Control	0	10	0

**-Efluente en el mes de agosto**

Primer Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M2D1	100	10	10
M2D2	50	10	0
M2D3	25	10	0
M2D4	12.5	10	0
M2D5	6.25	10	0
M2D6	3.13	10	0
Control	0	10	0

Segundo Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M2D1	90	10	10
M2D2	85	10	10
M2D3	80	10	10
M2D4	75	10	6
M2D5	70	10	3
M2D6	65	10	0
Control	0	10	0

**- Efluente a 50 metros del emisario en el mes de agosto**

Primer Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M3D1	100	10	0
M3D2	50	10	0
M3D3	25	10	0
M3D4	12.5	10	0
M3D5	6.25	10	0
M3D6	3.13	10	0
Control	0	10	0

Segundo Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M3D1	100	10	0
M3D2	95	10	0
M3D3	90	10	0
M3D4	85	10	0
M3D5	80	10	0
M3D6	75	10	0
Control	0	10	0

- **Afluente en el mes de noviembre**

Primer Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M1D1	100	10	10
M1D2	50	10	2
M1D3	25	10	0
M1D4	12.5	10	0
M1D5	6.25	10	0
M1D6	3.13	10	0
Control	0	10	0

Segundo Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M1D1	90	10	10
M1D2	80	10	7
M1D3	70	10	5
M1D4	60	10	4
M1D5	50	10	2
M1D6	40	10	0
Control	0	10	0

## -Efluente en el mes de noviembre

### Primer Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M2D1	100	10	10
M2D2	50	10	1
M2D3	25	10	0
M2D4	12.5	10	0
M2D5	6.25	10	0
M2D6	3.13	10	0
Control	0	10	0

### Segundo Screening test para mortalidad de Daphnia

Tratamiento	Concentración %	# Daphnias expuestas	# Daphnias muertas
M2D1	95	10	10
M2D2	85	10	8
M2D3	75	10	6
M2D4	65	10	3
M2D5	55	10	1
M2D6	45	10	0
Control	0	10	0

### ANEXO III: EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

#### A. Resultados para *Lactuca sativa L*

Resultados de temperatura, pH y oxígeno disuelto del afluente, según meses de evaluación

Trat.	Concentración (%)	Agosto			Noviembre		
		Ph	T (°C)	OD (mg/L)	Ph	T (°C)	OD (mg/L)
T1	100	7.9	15.6	0	7.2	18.4	0
T2	97	7.6	15.6	0	7.1	18.4	0
T3	94	7.5	15.6	0	7.1	18.4	0
T4	91	7.3	15.6	0	7.0	18.4	0
T5	88	7.2	15.6	0	7.0	18.4	0
T6	85	7.2	15.6	0	6.9	18.4	0
Control	0	6.3	18.3	5.97	6.3	18.3	5.97

Resultados de temperatura, pH y oxígeno disuelto del efluente, según meses de evaluación

Trat.	Concentración (%)	Agosto			Noviembre		
		pH	T (°C)	OD (mg/L)	pH	T (°C)	OD (mg/L)
T1	100	8.2	15.6	1.0	7.9	18.5	1.5
T2	97	8.2	15.6	1.1	7.7	18.7	1.7
T3	94	8.1	15.6	1.1	7.7	18.7	2.1
T4	91	8.1	15.6	1.1	7.4	18.7	2.2
T5	88	8.1	15.6	1.1	7.3	18.7	2.3
T6	85	8.0	15.6	1.2	7.3	18.7	2.5
Control	0	6.3	18.3	6.0	6.3	18.3	6.0

## B. Resultados para *Daphnia pulex*

Resultados de temperatura, ph y oxígeno disuelto del afluente, en el mes de agosto

Trat.	Concentración (%)	pH	T (°C)	OD (mg/L)
T1	40	7.5	17.5	2.5
T2	47	7.5	17.4	1.6
T3	54	7.5	17.6	1.3
T4	61	7.5	17.5	1.1
T5	68	7.5	17.3	0.6
T6	75	7.7	17.5	0.0
Control	0	7.6	16.9	6.8

Resultados de temperatura, ph y oxígeno disuelto del efluente, en el mes de agosto

Trat.	Concentración (%)	pH	T (°C)	OD (mg/L)
T1	65	7.9	18.4	2.7
T2	68	7.9	18.3	1.5
T3	71	7.8	18.1	1.3
T4	74	7.8	18.2	1.2
T5	77	7.8	18.3	1.8
T6	80	7.9	18.1	1.7
Control	0	7.6	16.9	6.8

Resultados de temperatura, ph y oxígeno disuelto del afluente, en el mes de noviembre

Trat.	Concentración (%)	pH	T (°C)	OD (mg/L)
T1	45	6.7	18.5	3.4
T2	55	6.6	18.3	3.2
T3	65	6.6	18.2	2.4
T4	75	6.6	17.7	2.1
T5	85	6.5	17.7	1.6
T6	100	6.9	17.7	0.4
Control	0	6.8	17.7	6.8

Resultados de temperatura, ph y oxígeno disuelto del efluente, en el mes de noviembre

Trat.	Concentración (%)	pH	T (°C)	OD (mg/L)
T1	50	7.5	18.6	4.8
T2	60	7.5	18.6	4.6
T3	65	7.6	18.6	4.6
T4	70	7.6	18.6	4.5
T5	80	7.6	18.5	4.3
T6	90	7.6	18.5	2.2
Control	0	6.8	17.7	6.8

### C. Metodología de las evaluaciones de calidad físico-química y microbiológica del efluente.

Parámetro	Metodología	Referencia
Demanda biológica de oxígeno (DBO) mg/L	Método de winkler	Hach, 2000
pH	Potenciometría	Hach, 2000
Conductibilidad eléctrica $\mu\text{s}/\text{cm}$	Método electrométrico	Hach, 2000
Salinidad (%)	Método electrométrico	Hach, 2000
Sólidos suspendidos totales (SST) mg/L	Método gravimétrico	Hach, 2000
Sólidos totales disueltos (TDS) mg/L	Método gravimétrico	Hach, 2000
Nitritos mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$	Método de diazotización	Hach, 2000
Nitratos mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$	Método de reducción de cadmio	Hach, 2000
Nitrógeno amoniacal mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$	Método colorimétrico	Hach, 2000
Nitrógeno total mg/L	Método colorimétrico	Hach, 2000
Fósforo como Ortofosfato mg $\text{PO}_4\text{/L}$	Método colorimétrico	Hach, 2000
Fósforo total mg/L	Método colorimétrico	Hach, 2000
Coliformes totales UFC/100mL	Método filtro de membrana	Hach, 2000
Coliformes termotolerantes UFC/100mL	Método filtro de membrana	Hach, 2000

Fuente: Adaptado de EMSA Puno (2015)

## ANEXO IV: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### A. ANOVA para *Lactuca sativa*, afluyente en el mes de agosto

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: hipocotilo

Mes =ago zona=afluyente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	241.7217143	40.2869524	22.44	<.0001
Error	28	50.2680000	1.7952857		
Total corregido	34	291.9897143			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	hipocotilo Media
0.827843	3.266641	1.339883	41.01714

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concentración	6	241.7217143	40.2869524	22.44	<.0001

El análisis de varianza para el hipocotilo en el mes de agosto, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluyente presenta un efecto diferente.

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: radícula

Mes=ago zona=afluyente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	740.1040000	123.3506667	330.19	<.0001
Error	28	10.4600000	0.3735714		
Total corregido	34	750.5640000			



R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	radícula Media
0.986064	2.242131	0.611205	23.51000

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
concentración	6	740.1040000	123.3506667	330.19	<.0001

El análisis de varianza para la radícula en el mes de agosto, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluente presenta un efecto diferente.

### B. ANOVA para *Lactuca sativa*, efluente en el mes de agosto

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: hipocotilo

Mes=ago zona=Efluente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	88.9708571	14.8284762	12.51	<.0001
Error	28	33.1880000	1.1852857		
Total corregido	34	122.1588571			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	hipocotilo Media
0.728321	2.551717	1.088708	42.66571

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
concentración	6	88.97085714	14.82847619	12.51	<.0001

El análisis de varianza para el hipocotilo en el mes de agosto, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presenta un efecto diferente.

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: radícula

Mes=ago zona=Efluente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	87.7097143	14.6182857	27.97	<.0001
Error	28	14.6320000	0.5225714		
Total corregido	34	102.3417143			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	radícula Media
0.857028	2.103699	0.722891	23.953333

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concentración	6	87.70971429	14.61828571	27.97	<.0001

El análisis de varianza para la radícula en el mes de agosto, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presenta un efecto diferente.

### C. ANOVA para *Lactuca sativa*, afluyente en el mes de noviembre

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: hipocotilo

Mes= nov zona=Afluente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	235.0377143	39.1729524	107.24	<.0001
Error	28	10.2280000	0.3652857		
Total corregido	34	245.2657143			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	hipocotilo Media
0.958298	1.344366	0.604389	44.95714

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
--------	----	----------	----------------------	---------	--------

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
concentración	6	235.0377143	39.1729524	107.24	<.0001

El análisis de varianza para el hipocotilo en el mes de noviembre, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluyente presenta un efecto diferente.

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: radícula

Mes=nov zona=afluyente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	740.1040000	123.3506667	330.19	<.0001
Error	28	10.4600000	0.3735714		
Total corregido	34	750.5640000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	radícula Media
0.986064	2.242131	0.611205	27.26000

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
concentración	6	740.1040000	123.3506667	330.19	<.0001

El análisis de varianza para la radícula en el mes de noviembre, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluyente presenta un efecto diferente.

#### **D. ANOVA para *Lactuca sativa*, efluente en el mes de noviembre**

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: hipocotilo

Mes=nov zona=Efluente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	20.41371429	3.40228571	4.37	0.0031
Error	28	21.78800000	0.77814286		

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Total corregido	34	42.20171429			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	hipocotilo Media
0.483718	1.926997	0.882124	45.77714

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
concentración	6	20.41371429	3.40228571	4.37	0.0031

El análisis de varianza para el hipocotilo en el mes de noviembre, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presenta un efecto diferente.

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: radícula

Mes=nov zona=Efluente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	87.7097143	14.6182857	27.97	<.0001
Error	28	14.6320000	0.5225714		
Total corregido	34	102.3417143			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	radícula Media
0.857028	2.103699	0.722891	34.36286

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concentración	6	87.70971429	14.61828571	27.97	<.0001

El análisis de varianza para la radícula en el mes de noviembre, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presenta un efecto diferente.

### E. ANOVA y prueba de Dunnett para *Daphnia pulex*, afluyente en el mes de agosto

Análisis de varianza para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluyente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de agosto.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concentraciones	6	10.75486857	1.79247810	680.44	<.0001
Error	28	0.07376000	0.00263429		
Total corregido	34	10.82862857			

CV=1.7%

(transformación de datos raíz (Y+5))

El análisis de varianza para la mortalidad, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluyente presenta un efecto diferente. Al salir significativo se procedió a utilizar la prueba de rango múltiple de Dunnett para comparaciones pareadas con el control, los resultados fueron los siguientes:

Prueba de Dunnett para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluyente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de agosto

Concentración Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
75 - 0	1.63000	1.54134	1.71866	***
68 - 0	1.25000	1.16134	1.33866	***
61 - 0	1.08000	0.99134	1.16866	***
54 - 0	0.79200	0.70334	0.88066	***
47 - 0	0.41000	0.32134	0.49866	***
40 - 0	0.16800	0.07934	0.25666	***

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por \*\*\*

Los resultados de la prueba de Dunnett indican que todas las concentraciones presentan un efecto diferente al control, es decir todas las concentraciones presentan un grado de toxicidad, siendo la dosis más baja con efecto toxico diferente al control la de 40% de agua residual.

## F. ANOVA y prueba de Dunnett para *Daphnia pulex*, efluente en el mes de agosto

Análisis de varianza para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de agosto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concentración	6	11.44859429	1.90809905	374.98	<.0001
Error	28	0.14248000	0.00508857		
Total corregido	34	11.59107429			

CV=2.4%

(transformación de datos raíz (Y+5))

El análisis de varianza para la mortalidad, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones de agua residual presenta un efecto diferente. Al salir significativo se procedió a utilizar la prueba de rango múltiple de Dunnett para comparaciones pareadas con el control, los resultados fueron los siguientes:

Prueba de Dunnett para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de agosto

Concentración Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
80 - 0	1.52600	1.40278	1.64922	***
77 - 0	1.28000	1.15678	1.40322	***
74 - 0	1.08000	0.95678	1.20322	***
71 - 0	0.65800	0.53478	0.78122	***
68 - 0	0.25000	0.12678	0.37322	***
65 - 0	0.04200	-0.08122	0.16522	

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por \*\*\*

Los resultados de la prueba de Dunnett indican que las concentraciones a partir de 68% presentan un efecto diferente al control, es decir todas estas concentraciones presentan algún grado de toxicidad, siendo la dosis más baja de 65% presenta un efecto similar al control, por lo cual se la puede considerar la concentración con efecto adverso no observable, mientras que la concentración de 68% es la mínima que si presenta efecto toxicológico en muestras del efluente de la laguna Espinar.

### G. ANOVA y prueba de Dunnett para *Daphnia pulex*, afluyente en el mes de noviembre

Análisis de varianza para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluyente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de noviembre

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	9.94432000	1.65738667	345.19	<.0001
Error	28	0.13444000	0.00480143		
Total corregido	34	10.07876000			
CV=2.2%		(transformación de datos raíz (Y+5))			

El análisis de varianza para la mortalidad, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del afluyente presenta un efecto diferente. Al salir significativo se procedió a utilizar la prueba de rango múltiple de Dunnett para comparaciones pareadas con el control, los resultados fueron los siguientes:

Prueba de Dunnett para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del afluyente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de noviembre

Concentración Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
100 - 0	1.63000	1.51030	1.74970	***
85 - 0	1.39600	1.27630	1.51570	***
75 - 0	1.13600	1.01630	1.25570	***
65 - 0	0.98400	0.86430	1.10370	***
55 - 0	0.65800	0.53830	0.77770	***
45 - 0	0.37000	0.25030	0.48970	***

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por \*\*\*

Los resultados de la prueba de Dunnett indican que todas las concentraciones presentan un efecto diferente al control, es decir todas estas concentraciones presentan algún grado de toxicidad, la concentración de 45% es la mínima que presenta efecto toxicológico en muestras del afluyente.

## H. ANOVA y prueba de Dunnett para *Daphnia pulex*, efluente en el mes de noviembre

Análisis de varianza para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de noviembre

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	10.63886857	1.77314476	323.23	<.0001
Error	28	0.15360000	0.00548571		
Total corregido	34	10.79246857			

CV=2.5%

(transformación de datos raíz (Y+5))

El análisis de varianza para la mortalidad, señala la existencia de diferencia estadística significativa ( $p=0.001$ ), indicando que por lo menos una de las concentraciones del efluente presenta un efecto diferente. Al salir significativo se procedió a utilizar la prueba de rango múltiple de Dunnett para comparaciones pareadas con el control, los resultados fueron los siguientes:

Prueba de Dunnett para mortalidad de *Daphnia pulex* sometida a seis concentraciones del efluente de la laguna de estabilización El Espinar en el mes de noviembre

Concentración Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
90 - 0	1.63000	1.50206	1.75794	***
80 - 0	1.28000	1.15206	1.40794	***
70 - 0	1.01600	0.88806	1.14394	***
65 - 0	0.65800	0.53006	0.78594	***
60 - 0	0.44600	0.31806	0.57394	***
50 - 0	0.16800	0.04006	0.29594	***

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por \*\*\*

Los resultados de la prueba de Dunnett indican que todas las concentraciones presentan un efecto diferente al control, es decir todas estas concentraciones presentan algún grado de toxicidad, la concentración de 50% es la mínima que presenta efecto toxicológico en muestras del efluente.



## ANEXO V: RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS

### A. Resultado de los bioensayos con *Daphnia pulex*, afluyente en agosto

Mortalidad de *Daphnia pulex*, según tratamientos

	%	R1	R2	R3	R4	R5
T1	75	10	10	10	10	10
T2	68	7	7	7	8	7
T3	61	6	6	6	6	6
T4	54	4	4	4	4	5
T5	47	2	2	2	2	2
T6	40	1	0	1	1	1
Control	0	0	0	0	0	0

(T: tratamientos, R: Número de repeticiones)

### B. Resultado de los bioensayos con *Daphnia pulex*, efluente en agosto

Mortalidad de *Daphnia pulex*, según tratamientos

	%	R1	R2	R3	R4	R5
T1	80	9	9	10	9	9
T2	77	7	7	7	8	8
T3	74	6	6	6	6	6
T4	71	3	3	3	4	4
T5	68	1	1	1	2	1
T5	65	1	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0

(T: tratamientos, R: Número de repeticiones)

### C. Resultado de los bioensayos con *Daphnia pulex*, afluente en noviembre

Mortalidad de *Daphnia pulex*, según tratamientos

	%	R1	R2	R3	R4	R5
T1	100	10	10	10	10	10
T2	85	8	8	8	9	8
T3	75	6	6	7	7	6
T4	65	6	6	5	5	5
T5	55	3	3	4	4	3
T6	45	1	2	2	2	2
Control	0	0	0	0	0	0

(T: tratamientos, R: Número de repeticiones)

### D. Resultado de los bioensayos con *Daphnia pulex*, efluente en noviembre

Mortalidad de *Daphnia pulex*, según tratamientos

	%	R1	R2	R3	R4	R5
T1	90	10	10	10	10	10
T2	80	7	7	7	8	8
T3	70	6	6	5	5	6
T4	65	3	4	3	4	3
T5	60	2	3	2	2	2
T6	50	0	1	1	1	1
Control	0	0	0	0	0	0

(T: tratamientos, R: Número de repeticiones)

**E. Resultados de Bioensayos con *Lactuca sativa L*, afluyente en agosto**

Concentración (%)	Hipocotilo						Radícula					
	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
0%	44.60	44.60	44.10	45.40	45.40	44.80	34.8	34.10	33.10	35.40	35.40	34.56
85%	43.50	43.80	43.50	43.50	42.50	43.36	26.9	27.00	27.20	26.10	26.10	26.66
88%	42.20	41.90	42.00	41.80	41.70	41.92	25.5	25.70	25.10	25.80	25.70	25.56
91%	41.60	41.50	41.50	39.40	41.30	41.06	23.9	23.80	23.90	23.00	23.50	23.62
94%	40.20	40.60	40.00	40.30	40.20	40.26	23.3	23.10	23.00	23.30	22.70	23.08
97%	40.50	40.00	40.60	39.00	38.70	39.76	22.6	22.30	22.10	21.60	22.00	22.12
100%	40.20	38.20	34.30	34.80	32.30	35.96	21.8	20.40	18.70	19.80	18.30	19.80

**F. Resultados de Bioensayos con *Lactuca sativa L*, efluente en agosto**

Concentración (%)	Hipocotilo						Radícula					
	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
0%	44.60	44.60	44.10	45.40	45.40	44.82	34.80	34.10	33.10	35.40	35.40	34.56
85%	44.80	44.50	44.20	44.70	44.70	44.58	27.70	27.80	28.40	27.90	27.00	27.76
88%	43.30	43.50	44.00	39.80	44.30	42.98	27.30	27.40	26.30	23.90	26.30	26.24
91%	42.20	43.90	43.90	42.50	42.40	42.98	25.80	25.80	25.50	25.20	25.00	25.46
94%	42.00	42.10	42.10	42.10	42.20	42.10	22.50	22.70	21.80	22.40	22.00	22.28
97%	41.10	41.60	41.20	41.90	40.00	41.16	21.60	21.30	21.90	22.00	21.70	21.70
100%	40.50	40.70	41.20	41.00	36.90	40.06	20.90	20.30	20.10	20.80	19.20	20.26

**G. Resultados de Bioensayos con *Lactuca sativa L*, afluyente en noviembre**

Concentración (%)	Hipocotilo						Radícula					
	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
0%	45.20	45.50	44.90	45.80	45.30	45.34	34.80	34.10	33.10	35.40	34.80	34.44
85%	47.80	50.20	47.90	47.30	47.00	48.04	33.70	32.10	33.00	32.40	32.20	32.68
88%	49.00	49.60	49.20	49.50	48.90	49.24	29.10	29.10	29.50	29.90	29.30	29.38
91%	41.20	41.60	41.80	41.80	41.50	41.58	26.60	24.90	24.90	24.80	24.90	25.22
94%	42.90	42.80	42.60	42.50	42.20	42.60	24.40	24.10	24.60	24.40	24.50	24.40
97%	43.10	44.10	43.90	43.20	44.90	43.84	23.10	23.50	23.40	23.30	23.50	23.36
100%	44.30	43.70	44.00	44.40	43.90	44.06	20.50	21.80	21.70	22.20	20.50	21.34

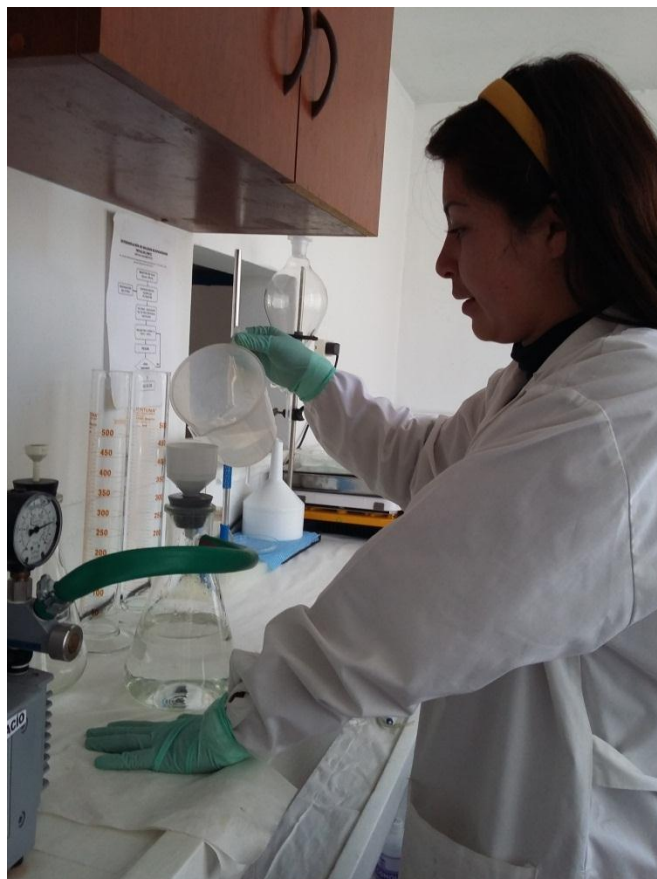
**H. Resultados de Bioensayos con *Lactuca sativa L*, efluente en noviembre**

Concentración (%)	Hipocotilo						Radícula					
	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
0%	44.60	44.60	44.10	45.40	45.40	44.82	34.80	34.10	33.10	35.40	35.40	34.56
85%	46.50	46.90	45.90	46.40	45.90	46.32	35.00	36.20	36.50	36.80	35.90	36.08
88%	45.00	44.90	45.30	45.80	45.30	45.26	35.60	35.70	36.60	36.80	37.00	36.34
91%	45.30	45.20	45.10	44.60	44.30	44.90	34.80	35.00	34.80	35.10	34.80	34.90
94%	45.70	45.90	45.70	45.50	45.60	45.68	34.00	34.40	34.00	33.90	33.70	34.00
97%	46.70	46.50	46.50	46.90	46.70	46.66	33.70	33.50	33.30	32.90	33.20	33.32
100%	48.60	43.10	47.20	47.80	47.30	46.80	32.30	29.10	31.60	31.90	31.80	31.34

## ANEXO VI: PANEL FOTOGRÁFICO



**Muestras colectadas de agua residual**



**Preparación del agua de dilución**



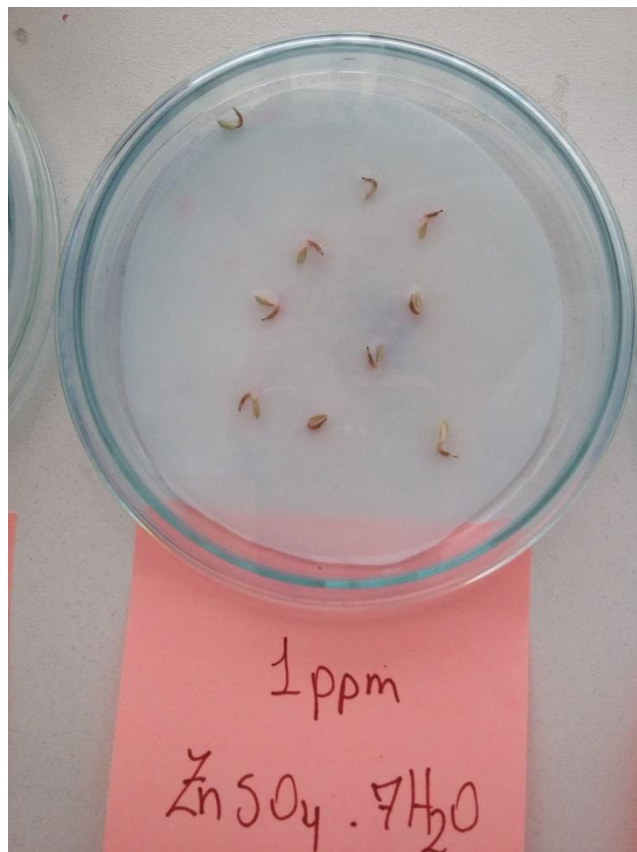
**Preparación de pruebas preliminares con *Lactuca sativa* L**



**Incubación de la batería de ensayo a 20 °C**



**Inhibición de crecimiento de *Lactuca sativa* L con efluente**



**Inhibición de crecimiento de *Lactuca sativa* L con el tóxico de referencia**





**Laboratorio de cultivos auxiliares IMARPE Puno**



**Preparación de pruebas de sensibilidad con *Daphnia pulex***





**Vista panorámica de la Laguna de Estabilización El Espinar**



**Equipo de trabajo con el personal de EMSA Puno**



**Vista de la Laguna Primaria**

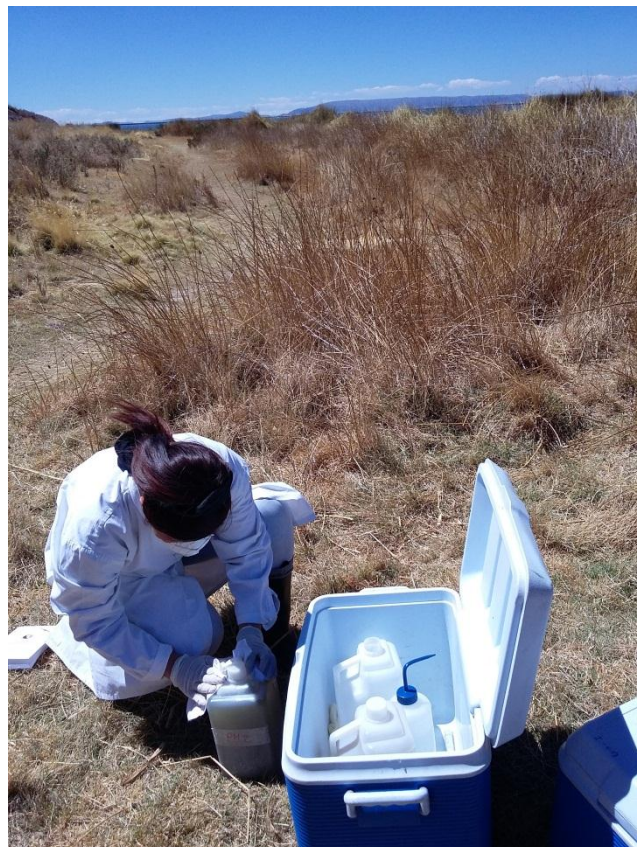


**Georeferenciación de los puntos de muestreo**





**Toma de muestra en el punto de muestreo 3**



**Etiquetado y preservación de las muestras**

**ANEXO VII: PLANO DE LOS PUNTOS DE MUESTREO**

