

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**BIOENSAYOS DE ECOTOXICIDAD AGUDA DE LAS
AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE PUNO SOBRE
Hyaella cuprea (ANPHÍPODA: HYALELLIDAE)
CULTIVADA EN LABORATORIO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. YOVANA PALAO MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**BIOENSAYOS DE ECOTOXICIDAD AGUDA DE LAS AGUAS
RESIDUALES DE LA CIUDAD DE PUNO SOBRE *Hyaella cuprea*
(ANPHÍPODA: HYALELLIDAE) CULTIVADA EN LABORATORIO**

PRESENTADA POR:

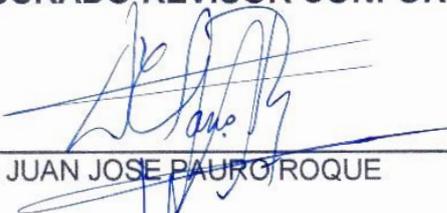
Br. YOVANA PALAO MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:


Dr. JUAN JOSE PAURO ROQUE

PRIMER MIEMBRO:


Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

SEGUNDO MIEMBRO:


Lic. HILVER CHARCA MAMANI

DIRECTOR:


M.Sc. ALFREDO LUDWIG LOZA DEL CARPIO

ÁREA:

Ecología

LÍNEA:

Calidad ambiental

TEMA:

Calidad del agua

DEDICATORIA

A mí amada familia: Mis hijos,
Rodrigo, Andrés y Leandro.
Quienes me brindan su amor,
la inspiración y la fuerza
necesaria para el logro de mis
metas y a mi esposo
Armando por estar al pie del
cañón a pesar de todo.

A mis amados padres
Rubén y Justa por su amor
Sublime e incondicional,
que con cariño y comprensión;
supieron darme las fuerzas
necesarias y sabios consejos.

A mis hermanas:
Teresa, Rosalva y Roxana
por su apoyo moral y a la
memoria de mi hermano
Cesar Augusto.

A mi amigo Timoteo,
quien es mi ejemplo de Altruismo,
trabajo y honestidad.

AGRADECIMIENTO

A mi alma máter, la Universidad Nacional del Altiplano de Puno por haberme brindado el apoyo necesario para cumplir con la realización de mis estudios universitarios.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno; a través de su plana docente por sus sabias enseñanzas y al personal administrativo por el apoyo brindado.

Al profesor M.Sc. Alfredo Ludwig loza del Carpio por su asesoramiento y valioso aporte en todas las etapas del desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. Antecedentes	16
2.1.1. Estudios ecotoxicológicos con invertebrados en aguas residuales	16
2.1.2. Estudios ecotoxicológicos con otros organismos en aguas residuales	17
2.1.3. Características de la Bahía Interior de Puno	19
2.2. Marco Teórico	20
2.2.1. Ecotoxicología, la ciencia de la contaminación	20
a) Conceptos e historia	20
b) Ecotoxicología versus toxicología ambiental	20
2.2.2. Evaluación ecotoxicológica y bioensayos	21
a) Determinación de la toxicidad en compuestos	21
b) Bioensayos de toxicidad	22
c) Compuestos tóxicos de referencia y pruebas de sensibilidad	24
d) Pruebas de toxicidad y análisis de resultados	25
2.2.3. Efluentes y ecotoxicidad	26
a) Aguas residuales y efluentes contaminantes	26
b) Características de las aguas residuales	27
c) Toxicidad de efluentes como herramientas de control ambiental	27
d) Evaluación de toxicidad de efluentes	29
2.2.4. Algunos anfípodos utilizados en bioensayos de toxicidad	30
a) Clasificación taxonómica del Amphipodo <i>Hyaella</i>	30
b) <i>Hyaella azteca</i>	30
c) <i>Hyaella curvispina</i>	31
2.2.5. Procedimientos en bioensayo de amplio uso con <i>Daphnia magna</i>	32
2.2.6. Uso de organismos autóctonos en bioensayos	34
2.2.7. Evaluación de riesgos en los ecosistemas	35
a) Persistencia de los compuestos químicos en el ambiente	35
b) Monitoreo biológico y evaluación de riesgo ecológicos	35
2.2.8. <i>Hyaella cuprea</i> en el lago Titicaca	37
a) Clasificación y taxonomía	37
b) Descripción morfológica	38
2.3. Marco Conceptual	39

III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Ámbito de estudio	43
3.2. Tipo de estudio	44
3.3. Población muestra	44
3.4. Validación del método de cultivo de <i>Hyalella cuprea</i>	45
3.4.1. Crianza masal	45
3.4.2. Crianza para determinar la capacidad productiva	47
3.4.3. Análisis estadístico	48
3.5. Caracterización de los principales parámetros fisicoquímicos de los Puntos de muestreo	48
3.6. Bioensayos en matriz acuosa para la determinación de CL ₅₀	49
3.6.1. Bioensayos de toxicidad aguda con tóxico de referencia	49
3.6.2. Diseño del experimento con aguas residuales	49
3.6.3. Análisis de estadístico	50
3.6.4. Diagrama de flujo del procedimiento de los bioensayos	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. Cultivo <i>Hyalella cuprea</i> en laboratorio	52
4.1.1. Fuentes naturales de obtención de <i>H.cuprea</i> para bioensayos	52
4.1.2. Establecimiento y crianza en acuarios	54
4.1.3. Condiciones ambientales y fisicoquímicas de los acuarios	55
4.1.4. Alimentación	56
4.1.5. Algunas características bioecológicas de <i>Hyalella cuprea</i>	57
4.2. Características fisicoquímicas de efluentes de aguas residuales - Puno	59
4.3. Determinación ecotoxicológicas de las aguas residuales con <i>H.cuprea</i>	63
4.3.1. Prueba de sensibilidad con NaCl como tóxico de referencia	63
4.3.2. Bioensayos ecotoxicológicos con aguas residuales sobre <i>H.cuprea</i>	66
4.3.3. Porcentajes de mortalidad y efectividad de la toxicidad según el Tiempo de evaluación para el punto final	69
4.3.4. Características ecotoxicológicas de las aguas residuales evaluadas	79
V. CONCLUSIONES	83
VI. RECOMENDACIONES	84
VII.LITERATURA CITADA	85
ANEXOS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama general para el tratamiento de muestras (Ronco <i>et al.</i> , 2004)	22
Figura 2.	Relación dosis-respuesta para establecer la toxicidad de un compuesto Sobre un organismo (Diaz <i>et al.</i> , 2004)	25
Figura 3.	Criterios de evaluación ambiental de efluentes residuales antes de su descarga al ambiente (Di Marzio, 2005)	28
Figura 4.	Aspecto general de un individuo de <i>Hyaella</i> (Peluso, 2011)	32
Figura 5.	Ejemplo de procedimiento de prueba ecotoxicológica para <i>Daphnia magna</i> (Báez <i>et al.</i> , 2008)	34
Figura 6.	Herramientas con métodos biológicos para estimar el estado del medio ambiente (Wieczorzak <i>et al.</i> , 2016)	36
Figura 7.	Ilustración de <i>Hyaella cuprea</i> y la carpopodita del macho (Dejoux, 1991)	38
Figura 8.	Lugares de muestreo de efluentes de aguas residuales en la Bahía Interior de Punto: 1) Laguna de oxidación Espinar, 2) Jr. 3 de Octubre, 3) Jr. Ricardo Palma, durante los meses de julio y agosto del 2016.	44
Figura 9.	Diagrama de flujo de bioensayo de ecotoxicidad sobre <i>Hyaella cuprea</i> durante los meses de agosto, octubre y noviembre del 2016.	51
Figura 10.	Volúmenes de caudales de aguas residuales que ingresan a la Bahía Interior de Puno a través de cinco puntos, durante los meses de agosto octubre y diciembre del 2016.	60
Figura 11.	Niveles mensuales de DBO ₅ en cinco puntos de efluentes de aguas Residuales que ingresan a la Bahía Interior de Puno, en referencia a los Niveles Máximos Permisibles según el D.S. 003 - 2010 MINAM.	61
Figura 12.	Valores del pH en cinco efluentes de aguas residuales de la ciudad de Puno confrontados con los Niveles Máximos Permisibles según el D.S. 003 – 2010 MINAM.	62
Figura 13.	Tendencias de mortalidad de <i>Hyaella cuprea</i> a diferentes concentraciones de NaCl, durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.	64
Figura 14.	Curva de regresión cuadrática ecuación entre la concentración de NaCl y la mortalidad que ocasiona en <i>H.cuprea</i> durante los meses de agosto Octubre y diciembre del 2016.	65
Figura 15.	Mortalidad y CL ₅₀ , para <i>H. cuprea</i> con diferentes concentraciones de aguas residuales que ingresan a la planta Espinar (punto de muestreo 1) durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016	70

- Figura 16.** Mortalidad y CL_{50} , para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales que ingresan por el Jr. 9 de octubre (punto de muestreo 2) durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016 72
- Figura 17.** Mortalidad y CL_{50} , para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de Aguas residuales que ingresan por el Jr. Ricardo Palma (punto de muestreo 3); durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016 74
- Figura 18.** Mortalidad y CL_{50} , para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales efluentes que ingresan por el Barrio Vallecito (punto de muestreo 4) durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016 76
- Figura 19.** Mortalidad y CL_{50} , para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales efluentes que ingresan por el Barrio San José (punto de muestreo 5) durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hábitats y zonas de colecta de hyalellas para su crianza en laboratorio con fines de uso en bioensayos y condiciones de viabilidad para su colecta, durante los meses de mayo a agosto del 2016.	53
Tabla 2. Valores de temperatura del agua en acuarios dentro de condiciones de laboratorio, durante los meses de mayo a diciembre del 2016.	55
Tabla 3. Rangos de características ambientales en los que se mantuvieron viables <i>Individuos de Hyalella cuprea</i> en acuarios, durante los meses de mayo a diciembre del 2016.	56
Tabla 4. Tipos de alimentos evaluados cualitativamente en el cultivo de <i>Hyalella Cuprea</i> en los meses de mayo a diciembre del 2016.	57
Tabla 5. Algunas características bioecológicas de <i>H.cuprea</i> mantenidas en acuarios en condiciones de laboratorio, durante los meses de mayo a diciembre del 2016.	58
Tabla 6. Estadios de desarrollo en <i>H.cuprea</i> bajo condiciones de laboratorio, basado En Lopretto (1983), Casset <i>et al.</i> (2001) y Peluso (2011).	58
Tabla 7. Algunos parámetros fisicoquímicos de cinco efluentes de aguas residuales procedentes de la ciudad de Puno, en su valor promedio \pm error estándar, durante los meses de agosto a diciembre del 2016.	59
Tabla 8. Resumen de la prueba toxicológica para <i>H. cuprea</i> con NaCl como tóxico de referencia, durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.	64
Tabla 9. Comparación de la toxicidad del NaCl en diferentes especies evaluadas con fin de uso en pruebas ecotoxicológicas, según los siguientes autores (Culloch <i>et al.</i> , 1993; Adelman <i>et al.</i> , 1976; Arenzon <i>et al.</i> , 2003)	65
Tabla 10 Niveles de ecotoxicidad y CL ₅₀ de cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad Puno hacia la bahía interior para <i>Hyalella cuprea</i> , durante el mes de agosto del 2016.	67
Tabla 11 Niveles de ecotoxicidad y CL ₅₀ de cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad Puno hacia la bahía interior para <i>Hyalella cuprea</i> , durante el mes de octubre del 2016.	67
Tabla 12 Niveles de ecotoxicidad y CL ₅₀ de cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad Puno hacia la bahía interior para <i>Hyalella cuprea</i> , durante el mes de diciembre del 2016.	68

- Tabla 13** Valores de CL₅₀ finales para los puntos de muestreo de aguas residuales, incluyendo sus estadísticos descriptivos y las Utas promedio, durante los meses de agosto, Octubre y diciembre del 2016. 79
- Tabla 14** Análisis de varianza diseño factorial 3*5*6 (meses, lugares y concentración) para las mortalidades de *H. cuprea* durante los bioensayos durante los meses de noviembre y diciembre del 2016. 80
- Tabla 15** Porcentaje de mortalidad de *H.cuprea* por el tóxico (aguas residuales) según cada factor evaluado. Letras diferentes entre filas expresan las diferencias significativas a la prueba de Tukey ($P>0.05$), durante los meses de agosto, octubre y diciembre 2016. 81

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CE₅₀/CI₅₀	: Concentración efectiva o de inhibición media.
CdCl	: Cloruro de cadmio.
CL₅₀	: Concentración letal media, estimada letal para el 50% de organismos de ensayo.
CuSO₄	: Sulfato de cobre.
DBO₅	: Demanda Bioquímica de Oxígeno.
ISO	: Organización Internacional de Normalización.
KCl	: Cloruro de potasio.
K₂Cr₂O₇	: Dicromato de potasio
LMP	: Límite máximo permisible
LOEC	: Concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, siglas en inglés)
NaCl	: Cloruro de sodio
NOEC	: Concentración a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés)
OD	: Oxígeno disuelto en el agua
OECD	: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.
pH	: Potencial de hidrogenión.
PNEC	: Predicted No Effect Concentration (Es la concentración de un químico el cuál marca el límite debajo del cual no hay efectos adversos de exposición en un ecosistema).
PMTC	: Concentración mínima del tóxico esperada término elaborado (siglas en inglés)
SDS	: Duodecil sulfato de sodio.
UNA	: Universidad Nacional del Altiplano.
USEPA	: Environmental Protection Agency (Agencia para la protección ambiental USA)
UT	: Valor arbitrario que vinculan los valores de CL ₅₀₀ unidad de toxicidad.
UTa	: Unidad de toxicidad aguda en particular, se define como 100/CL ₅₀
WET	: <i>Whole Effluent Toxicity</i> , (la Toxicidad Total del Efluente)

RESUMEN

El lago Titicaca es uno de los recursos hídricos más importantes del Perú y del mundo; sin embargo la bahía interior de Puno recibe las aguas residuales de la ciudad de Puno sin ningún o con deficiente tratamiento, lo que contribuye a riesgos ecotoxicológicos. Por ello, en el estudio se ha planteado como objetivos: validar un método de cultivo de *Hyalella cuprea* en condiciones de laboratorio para la realización de bioensayos de toxicidad y caracterizar los principales parámetros fisicoquímicos (pH, OD, conductividad, temperatura y DBO₅) de cinco efluentes de aguas residuales que ingresan directamente a la bahía interior de Puno (planta Espinar, Jr. 9 de Octubre, Jr. Ricardo Palma, barrio Vallecito y barrio San José – UNA). En cumplimiento a los objetivos, en los métodos se cultivaron *Hyalella cuprea* en acuarios a temperaturas entre 10-18°C, con los que se realizaron bioensayos ecotoxicológicos con las aguas residuales de los efluentes, en concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25%, y su control con tres repeticiones en los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016 y con ello se calculó la CL₅₀ y las UTas para cada lugar. Los resultados demuestran la factibilidad de la crianza de *H. cuprea* en condiciones de laboratorio, aunque con algunas limitantes, siendo los individuos adecuados para ensayos de ecotoxicidad los neonatos de 1.5 a 3 mm de longitud, de hasta 20 días de nacidos. En los parámetros fisicoquímicos todos presentaron características de aguas residuales (alta conductividad, alta TDS y bajo OD), y en el DBO₅ sólo de Espinar superan los LMP de la Norma Peruana. En cuanto a las características toxicológicas, los efluentes de Espinar alcanzaron una CL₅₀ de 14.64 % (6.83 UTa), considerada como altamente tóxica y la de mayor riesgo para el ecosistema integral; las aguas que ingresan por el barrio San José – UNA tuvieron una CL₅₀ de 50.64 % (1.97 UTa) y las del Jr. Ricardo Palma con CL₅₀ de 93.95 % (1.06 UTa), considerados como tóxicas; las aguas residuales del Jr. 9 de Octubre y barrio Vallecito presentaron CL₅₀ de 132.99 % (0.75 UTa) y 135.56 % (0.75 UTa) respectivamente, consideradas éstas como no tóxicas. Se concluye que las aguas residuales de mayor riesgo son las procedentes de la laguna Espinar y del Jr. Ricardo Palma del barrio San José UNA- Puno.

Palabras claves: bioensayos, crianza artificial, ecotoxicidad aguda *Hyalella cuprea*, Titicaca.

ABSTRACT

The Titicaca Lake is one of the water resources and aquatic ecosystem of Peru and the world; however, the inner bay of Puno receives the waters of the city of Puno with no or poor treatment. Therefore, in the present study have been raised as objective: To validate a method of cultivation of *Hyalella cuprea* in laboratory conditions for the conduct of bioassays for toxicity, in addition to characterize the main chemical parameters (pH, DO, conductivity, temperature, and BDO₅) of five wastewater effluents entering directly to the inner bay of Puno (plant Espinar, Jr. on October 9, Jr. Ricardo Palma, Vallecito and Barrio San Jose - UNA) and determine your CL₅₀ and Acute toxicological units through the native amphipod *H. cuprea* in laboratory conditions. For this *Hyalellas* were grown in aquaria at a temperature between 10-18°C, from which Ecotoxicity bioassays were carried out with five wastewater effluent is experienced concentrations at 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% a test control with three repetitions during the months of August, October and December, to finally calculate the LC₅₀ and the UTas for each place. The results showed the feasibility of the rearing of *H. cuprea* in laboratory conditions, albeit with some limitations, being the appropriate individuals for ecotoxicity testing neonates of 1.5 to 3 mm in length, up to 20 days of age. In the physico-chemical parameters all wastewater characteristics (high conductivity, high TDS and under OD), and in the BDO₅ only of Espinar exceed the LMP of the Peruvian Norm. With regard to the toxicological characteristics, the effluents of Espinar reached an LC₅₀ of 14.64 % (6.83), which is considered highly toxic and pose the greatest risks for the ecosystem; in followed by the water entering through the neighborhood San Jose - A had a LD₅₀ of 50.64 % (1.97) and the UTa Jr Ricardo Palma with CL₅₀ of 93.95 % (1.06 UTa), considered as toxic and with potential risk; wastewater from the Jr 9 October and neighborhood Vallecito presented CL₅₀ of 132.99 % (0.75) and (0.75 UTa) 135.56 % respectively, considered these as non-toxic. It is concluded that the wastewater from most at risk are those from the Lagoon Espinar, Jr. Ricardo Palma Hospital of the Barrio San José UNA - Puno neighborhood.

Key words: bioassays, artificial aging, acute ecotoxicity, *Hyalella cuprea*, Titicaca,

I. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas generan grandes cantidades de desechos tóxicos que son liberados al ambiente afectando el aire, agua, suelo y biota de los diferentes ecosistemas, siendo su toxicidad variable según las características, la movilidad y la persistencia del contaminante o xenobióticos. Los cuerpos de agua probablemente son los más afectados por recibir en muchos casos descargas de aguas residuales provenientes de las urbes, las industrias, la agricultura y la actividad minera, entre los principales, por lo que permanentemente se viene poniendo en riesgo importantes recursos hídricos que podrían ser trascendentales para la supervivencia humana en el futuro.

Los procesos de contaminación y eutroficación que sufre la bahía interior de Puno están documentadas adecuadamente (Northcote *et al.*, 1991; IMARPE, 2014; Beltrán *et al.*, 2015) y como agentes causales se considera principalmente a las aguas residuales procedentes de la ciudad de Puno que ingresan a este ecosistema con deficiente o nulos sistemas de tratamiento, cuyos efectos resaltan a la vista en el paisaje y en la condición del medio; sin embargo es probable que además existan procesos de toxicidad en los organismos que conforman la biota, incluso en el ser humano, afectando a unos más que a otros, siendo algunos más sensibles y por tanto especies de especial interés como biomonitores y bioindicadores de alerta temprana a procesos de degradación de los ecosistemas y principalmente útiles como procedimientos para demostrar niveles de ecotoxicidad en diferentes tipos de efluentes residuales (Bertoletti y Zagatto, 2008; Wiczerzak *et al.*, 2016).

Convencionalmente en la mayoría de casos para reconocer la calidad de aguas en ecosistemas acuáticos se utilizan análisis fisicoquímicos individuales, los cuales no evidencian efectos ni procesos sinérgicos y acumulativos por causa de un conjunto grande y diverso de compuestos contaminantes que llegan al cuerpo de agua (Villegas – Navarro *et al.*, 1999) como ocurre con las aguas residuales que ingresan a la bahía interior de Puno. Además que los análisis fisicoquímicos de campo y de laboratorio tienen costos elevados. Por ello una opción con creciente interés en la actualidad es el uso de organismos con fines de evaluar la ecotoxicidad y por lo tanto el estado de salud del ecosistema integral. Para ello diversas entidades internacionales han establecido protocolos y las especies más apropiadas para estos ensayos; pero también recomiendan en lo posible el uso de especies autóctonas (USEPA, 2002).

La bahía interior de Puno constituye un importante recurso hídrico que puede beneficiar potencialmente a las poblaciones locales a través de usos diversos, sin embargo a la actualidad se constituye como un ecosistema altamente degradado y con alto riesgo de ocasionar niveles aún desconocidos de toxicidad en la población humana, en la biodiversidad y en el ecosistema integral. En ese contexto, la investigación se orienta a conocer y cuantificar cuáles son esos niveles de toxicidad de las aguas residuales que permanentemente ingresan hacia la bahía interior de Puno sin ningún tratamiento o con tratamiento deficiente y ello se traduce en determinar los niveles de riesgo ante las permanentes exposiciones a las cuales es sometida la biota y el ecosistema. Así, es probable incluso que estas aguas residuales contengan xenobióticos altamente tóxicos y que con un análisis físico químico convencional no se detecten, pero que quizás sea posible hacerlo utilizando bioensayos estandarizados, en este caso con *H. cuprea*. Ello además posibilitará contar con un sistema de alerta temprana sobre los procesos iniciales de contaminación y/o eutroficación en otros puntos del lago Titicaca, basados en la sensibilidad de esta especie nativa.

Por ello para el desarrollo del estudio se han planteado los siguientes objetivos:

- Validar un método de cultivo de *Hyalella cuprea* en condiciones de laboratorio con fines de obtener individuos para bioensayos de toxicidad.
- Caracterizar los principales parámetros fisicoquímicos (pH, OD, conductividad, temperatura y DBO₅) de cinco efluentes de aguas residuales que ingresan directamente a la bahía interior de Puno.
- Determinar la CL₅₀ y las unidades toxicológicas agudas de las aguas residuales de la ciudad de Puno colectadas en cinco puntos efluentes sobre el anfípodo *Hyalella cuprea* en condiciones de laboratorio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Estudios ecotoxicológicos con invertebrados en aguas residuales

No se han realizado aún estudios ecotoxicológicos con *H. cuprea* del lago Titicaca, mas existen reportes sobre especies de otras latitudes, principalmente con *H. azteca* y *H. curvispina*, incluyendo organismos diferentes a *Hyalella*. Así, Ingersoll *et al.* (1998) hicieron evaluaciones de la toxicidad de sedimentos de aguas residuales sobre neonatos de *H. azteca* en Norteamérica, encontrando efectos ecotóxicos crónicos que afectan en la mortandad, el crecimiento y desarrollo de los individuos, estos niveles fueron hallados en concentraciones del 100%. Actualmente *H. azteca* se considera una especie aprobada por instancias como la USEPA (2000 y 2002) para ensayos ecotoxicológicos en sedimentos, aguas residuales.

Giusto (2014) y Giusto *et al.* (2014) reportan estudios ecotoxicológicos con *H. curvispina* en sedimentos de aguas residuales en Argentina, los resultados a nivel agudo indican mortalidades no significativas comparados con sedimento control. Sin embargo el efecto fue importante a nivel crónico y sub letal, ya que el crecimiento, el peso y el índice de masa corporal disminuyo significativamente en un 36%. A su vez Javidmehr *et al.* (2015) realizaron estudios de la sobrevivencia de *H. azteca* en función a parámetros de calidad del agua en 14 puntos de la delta estuarina de California, con crustáceos de 9 a 14 días de edad; demostrándose la alta probabilidad de sobrevivencia de *H. azteca*: A un nivel moderado de conductividad eléctrica (646 – 3900 uS/cm); pH entre 8.01 y 8.51, amonio ionizado en niveles menores de 2.14 a 31.3 ug/L y oxígeno disuelto 4.6 y 7.3 mg/L.

Tyagi *et al.* (2007) estudiaron la toxicidad con *Daphnia magna* para conocer la eficiencia de un sistema de tratamiento de aguas residuales hasta nivel terciario que incluye filtros diversos en el sistema primario, procesos de lodos activados en el secundario y filtros de carbón activado en el terciario, al oeste de Delhi, India; se reporta que la toxicidad del agua residual es reducida acumulativamente desde el afluente hasta el efluente, con un porcentaje promedio de remoción de toxicidad de 29%, 76% y 100% respectivamente. Lo que demuestra que la remoción de toxicidad al 100% en *D. magna* fue sólo en el tratamiento terciario y que la eliminación de DQO y SST juega un rol central en la reducción de toxicidad. Estos resultados demostraron que el uso de bioensayos produce información adicional sobre el potencial de toxicidad en descargas industriales y efluentes domésticos. García *et al.* (2006) evaluaron la toxicidad de aguas residuales industriales de México con

bioensayos en *Daphnia pulex* y semillas de *Lactuca sativa* con el fin de conocer la eficiencia de una planta de tratamiento de lodos activado. Los resultados indicaron la eficiencia en el tratamiento con *D. pulex* pues disminuye la toxicidad conforme avanza el tratamiento en el sistema en el punto de muestreo de clarificadores primarios (CP) los valores promedio de toxicidad arrojaron valores de 2.11 UTa y en los clarificadores secundarios fue 1.25 UTa; pero esta disminución no fue significativa con *L. sativa*. Los resultados concluyen además que en esta agua residual tratada pueden permanecer sustancias con capacidad de producir toxicidad.

2.1.2. Estudios ecotoxicológicos con otros organismos en aguas residuales

En México Saldaña *et al.*, (2005) usaron la bacteria luminiscente, *Photobacterium phosphoreum* en bioensayos de toxicología en laboratorio midiendo los efectos con respecto al abatimiento de la emisión de luz en muestras de aguas residuales de diferentes fuentes y diferentes concentraciones (100, 50, 25 y 12.5%), obteniéndose: La concentración efectiva que mata al 50% de la población (CE₅₀), los resultados de toxicidad en UTs (unidades de toxicidad) que van desde ligeramente tóxicas, hasta altamente tóxicas. Por lo que, aun cuando algunas descargas cumplieron con lo establecido por la norma de ese país, con la prueba de toxicidad se consideran potencialmente tóxicas. Demostrándose la alta relación entre toxicidad y DQO ($R^2 = 0.82$).

Solano (2007) estudió los efectos y la toxicidad de las aguas residuales del Municipio de Chía Colombia en la germinación y elongación de raíces de semillas de lechuga; resultando que la CI₅₀ en la germinación en diferentes concentraciones de aguas residuales fue de 92.405 (porcentaje de agua residual que inhibe la germinación), lo que significa que el porcentaje de dilución óptimo del efluente de la PTAR del municipio de Chía con fines de regadío es del 80%, pues es a este porcentaje de dilución que se observa una inhibición de la germinación de menos del 50 % de la población expuesta, es allí donde radica la importancia del uso de organismos biológicos para conocer la eficiencia del tratamiento del aguas residuales en PTAR, así como sentar las bases para la remediación.

En Portugal Mendonca *et al.* (2009) evaluaron la toxicidad en cinco organismos diferentes (la bacteria *Vibrio fischeri*, el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, la planta *Lemna minor*, el crustáceo *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*) en dos plantas de tratamiento de aguas residuales. Encontrando que la bacteria *Vibrio fischeri* tiene una alta sensibilidad en todas las aguas residuales alcanzando una EC₅₀ (concentración efectiva media) menor al 10%, también es apreciable que en todos los organismos ha existido algún nivel de toxicidad de las aguas incluyendo en el efluente luego de ser tratada el agua residual casi

al mismo nivel a veces mayor que en el punto de ingreso, a pesar de que los análisis fisicoquímicos demostraron alto nivel de depuración en el DBO₅, DQO y SST.

Orias y Perrodin (2013) reportan la diversidad de tóxicos que fluyen en los hospitales, encontrándose componentes muy tóxicos con un PNEC mínimo observado de 10⁸ ug/L. Son siete las especies con las que han evaluado la toxicidad de efluentes en diferentes hospitales, resaltando como ejemplo a *D. magna* que ha alcanzado toxicidades (EC₅₀ en mortalidad) desde 0.4 hasta 90%; para *Artemia salina* 59.9%, para *Thamnocephalus platyurus* 22.6% entre los más resaltantes. No reporta el uso de *Hyalella* para estos bioensayos. Comentan además de la toxicidad que generan las múltiples actividades de los hospitales, con miras a evaluar los impactos de estos contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, y la importancia de caracterizar su ecotoxicidad.

Soupilas *et al.* (2008) evaluaron la toxicidad con la bacteria *Vibrio fisheri*, el crustáceo *Daphnia magna* y el protozoario *Tetrahymena thermophilla* en aguas residuales tomadas desde los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de diferentes industrias, la toxicidad fue evaluada con muestras no diluidas y los ensayos fueron calculados mediante el porcentaje de toxicidad a partir del porcentaje de inhibición. Para *Daphnia* la inmovilización fue a las 24 horas; los más altos niveles de toxicidad las presentaron las industrias metálicas con un nivel desde 40 a 100% de toxicidad; la mayor sensibilidad la presentó *D. magna* donde en todos los casos la mortalidad – inmovilización supero el 90%. Recomiendan también el uso de *D. magna* para la estimación de los efectos ambientales durante las descargas en los cuerpos de agua.

Kudiak *et al.* (2016), en Polonia, evaluaron el riesgo ambiental de 76 plantas de tratamiento en sus efluentes de aguas residuales, para evaluar la eficiencia en la remoción de contaminantes, muestreando las aguas al ingreso y a la salida de la planta. Los bioensayos los realizaron con *Vibrio fisheri* y el ostrácodo *Heterocypris incongruens*. Dando como resultado que la toxicidad en algunas plantas disminuye y en otras no, e incluso empeora, por lo que cada uno tiene una toxicidad diferente.

Orias y Perrodin (2014) evaluaron la ecotoxicidad de fármacos en aguas residuales de hospitales mediante un cociente de peligrosidad (HQ) que se calculó a partir de la concentración sin efecto predictivo (PNEC en ug/L). Encontrándose que el agua residual de hospital tiene fármacos que se pueden agrupar en 14 clases principales: antibióticos de uso sistémico (28%), para el sistema nervioso (22%), para el tracto digestivo (8%), etc. Las concentraciones de los diferentes fármacos es variable, Los componentes con índice HQ < 1, son considerados no peligrosos en el agua residual (progesterona, colquichinas,

cocaína, etc; los compuestos con HQ entre 1 – 1000 se consideran peligrosos (oxytetraciclina, sulfadiazina, naproxeno, etc; los compuestos que presentaron HQ > 1000 se consideran muy peligrosos, Trimetropina, lidocaína, diclofenaco etc.

2.1.3. Características de la bahía interior de Puno

Loza – Del Carpio *et al.* (2016) en cuanto a las características de la bahía interior, refieren que tiene una superficie de 15.9 km², perímetro de 21.95 km, profundidad máxima de 7.19 m y un volumen de 39 millones de metros cúbicos. Afirman que el lecho viene colmatándose progresivamente con sedimentos procedentes principalmente de las aguas residuales y escorrentías, cuya tasa de incremento es de 4.1 mm/año; también Morales *et al.* (1991) en 1981 reportan que la transparencia en la bahía interior fluctúa entre 1.2 y 2.2 m, siendo mucho menor que la transparencia de la bahía exterior que llega hasta 4.9 m, además es el viento el que podría provocar la mezcla vertical de aguas en el interior de la bahía de Puno, pero el intercambio entre la parte interior y la exterior está fuertemente restringida por la morfometría lo que le hace muy susceptible a la eutroficación.

Northcote *et al.* (1991) refieren que la contaminación del lago Titicaca está restringida a algunas zonas localizadas, como la bahía interior de Puno, con aguas de baja calidad y peligrosas presentando altos niveles de nitrógeno y fósforo, bajos niveles de oxígeno y alta sobresaturación en capas superficiales y la DBO₅ muy elevada, lo que indica gran entrada de materia orgánica. Incluso ya Miranda *et al.* (1991) para los años 1982 a 1983 reportan valores de nitratos (NO₃) de 0.01886 mg/L en promedio (18.86 ug átomo/L) en la bahía interior de Puno y 0.00414 mg/L al exterior de la bahía (4.14 ug átomo/L). En fósforo total para la bahía interior es 0.00463 mg/L (4.63 ug átomo/L) y de 0.001 ug/L (1 ug átomo/L) para la parte exterior. Este es un factor para la eutroficación de la bahía interior de Puno.

Northcote (1991) indica similarmente que el oxígeno disuelto en la bahía interior del Lago Titicaca es menos de 3 mg/L en zonas superficiales menores a 1 m de profundidad; y que los nitratos y nitritos en ocasiones pasan los 21 ug átomo/L, nivel que conduce a fuerte eutroficación, los aportes de fósforo en la bahía interior de Puno fueron de 3.1 g/m²/año, valores muy por encima de aquellos que causan eutroficación (0.1 g/m²/año), los coliformes muchas veces superaron las 100000 NMP/100 mL; también Beltrán *et al.* (2015) encontró valores promedio de: Oxígeno de 6.62 mg/L, fosfatos (PO₄) 1.02 mg/L, nitratos (NO₃) 0.12 mg/L, para la bacteria *E. coli* 502.78 UFC, la transparencia de 1.4 m y el pH en 9.43, siendo los valores de los nutrientes superiores a los encontrados por Miranda, lo que indicaría un aumento de elementos eutroficantes. Este autor también indica que los valores <0.4 mg/L corresponden a lagos oligotróficos y valores >4 mg/L a lagos eutróficos.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Ecotoxicología, la ciencia de la contaminación

a) Conceptos e historia

La ecotoxicología es la disciplina científica encargada del estudio del efecto de las sustancias y compuestos químicos sobre los ecosistemas y se le utiliza para resolver problemas ambientales concretos (Planes y Fuchs, 2015). La *ecotoxicología*, como tal está definida por Butler en 1978, como una ciencia que estudia y analiza los efectos de algunos agentes químicos y físicos sobre los organismos vivos, y en especial sobre poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos (Ronco *et al.*, 2004). Por ende La *ecotoxicología aplicada* tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo empleándolos como herramientas para la predicción tempranas que puedan servir de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones (Day *et al.*, 1988, op cit Ronco *et al.*, 2004).

El surgimiento de la ecotoxicología se relaciona con dos episodios producidos como consecuencia de la contaminación del ambiente con sustancias químicas: la enfermedad de Minamata causada por el mercurio y la declinación de las poblaciones de aves silvestres por efecto de los plaguicidas clorados (Newman, 2001). Este insecticida conocido como DDT causó la declinación de poblaciones de aves silvestres en el hemisferio norte y al igual que el mercurio, se bioacumula y biomagnifica (Planes y Fuchs, 2015). Estos dos hechos mostraron la necesidad de conocer los efectos de las sustancias y compuestos químicos una vez presentes en el ambiente (Newman, 2001).

b) Ecotoxicología versus toxicología ambiental

Truhaut (1975) (op cit Capó, 2007) Nos informa del establecimiento del término ecotoxicología en sustitución al de toxicología ambiental por parte de ese autor y la conceptualiza como la ciencia encargada de investigar la dosis sin efecto y parece más bien una ciencia de seguridad cuyo criterio fundamental es el de estudiar la contaminación sobre los sistemas bióticos en forma de toxicidad y alteración, puesto que no todos los contaminantes se comportan como un tóxico neto (Capó, 2007).

c) Importancia de los estudios ecotoxicológicos

Actualmente las normativas de los países se fijan tomando en cuenta las principales características de los compuestos químicos que las hacen peligrosas para el ambiente, su

toxicidad, su persistencia en el ambiente y su potencial de bioacumulación. (Planes y Fuchs, 2015). Es allí donde radica la importancia de los estudios ecotoxicológicos ya que son los que proporcionan la información científica que luego se traduce en legislaciones con distinto alcance: convenios internacionales que prohíben el uso de ciertos compuestos químicos a nivel mundial; regulaciones para las descargas de efluentes; autorizaciones para la aplicación deliberada de compuestos químicos; evaluación y remediación de sitios contaminados y clasificación de productos químicos (Planes y Fuchs, 2015).

Con el fin de establecer las concentraciones de las sustancias tóxicas que no deben superarse en los cuerpos de agua para preservar la vida acuática, las agencias reguladoras utilizan distintas metodologías que no difieren sustancialmente. Para ello se determina los valores de CL_{50} , EC_{50} , NOEC para las diferentes sustancias, estos obtenidos mediante ensayos de toxicidad con distintas especies. (Planes y Fuchs, 2015).

2.2.2. Evaluación ecotoxicológica y bioensayos

a) Determinación de la toxicidad de compuestos

La toxicidad es el grado al cual un compuesto o mezcla es capaz de provocar efectos nocivos a los seres vivos como: la muerte, la inhibición del crecimiento, la inhibición de la reproducción, etc. y esta toxicidad se determina mediante la realización de ensayos de toxicidad, con distintos organismos, algas, crustáceos, peces, plantas, lombrices, etc. No existe un instrumento que pueda medir toxicidad (Planes y Fuchs, 2015).

En los ensayos de toxicidad se le expone a un grupo seleccionado de organismos a distintas concentraciones de sustancias o compuestos químicos y por periodos de tiempo y la respuesta de los organismos estará en relación con la concentración de las sustancias tóxicas es decir la exposición a concentraciones mayores causa efecto denominándosele la relación concentración - respuesta. Y es a partir de ella que se puede establecer parámetros como la Concentración Letal 50 (CL_{50}), que es la concentración del tóxico que mata al 50% de los individuos expuestos. Siendo las más tóxicas aquellas para las cuales el valor de CL_{50} es menor; es decir aquellas que a menores concentraciones causan efectos sobre un número mayor de organismos (Planes y Fuchs, 2015).

b) Bioensayos de toxicidad

Según Finney (1978), conceptualiza al bioensayo como un experimento que estima la constitución, naturaleza o potencia de un elemento mediante la reacción que tiene un organismo vivo es decir; que un bioensayo típico constituye un estímulo o dosis absorbible que es aplicada a un organismo cuya respuesta a dicho estímulo se estima mediante el cambio en algunas características biológicas o el estado del organismo (Ferrari, 2015) (Figura 1)

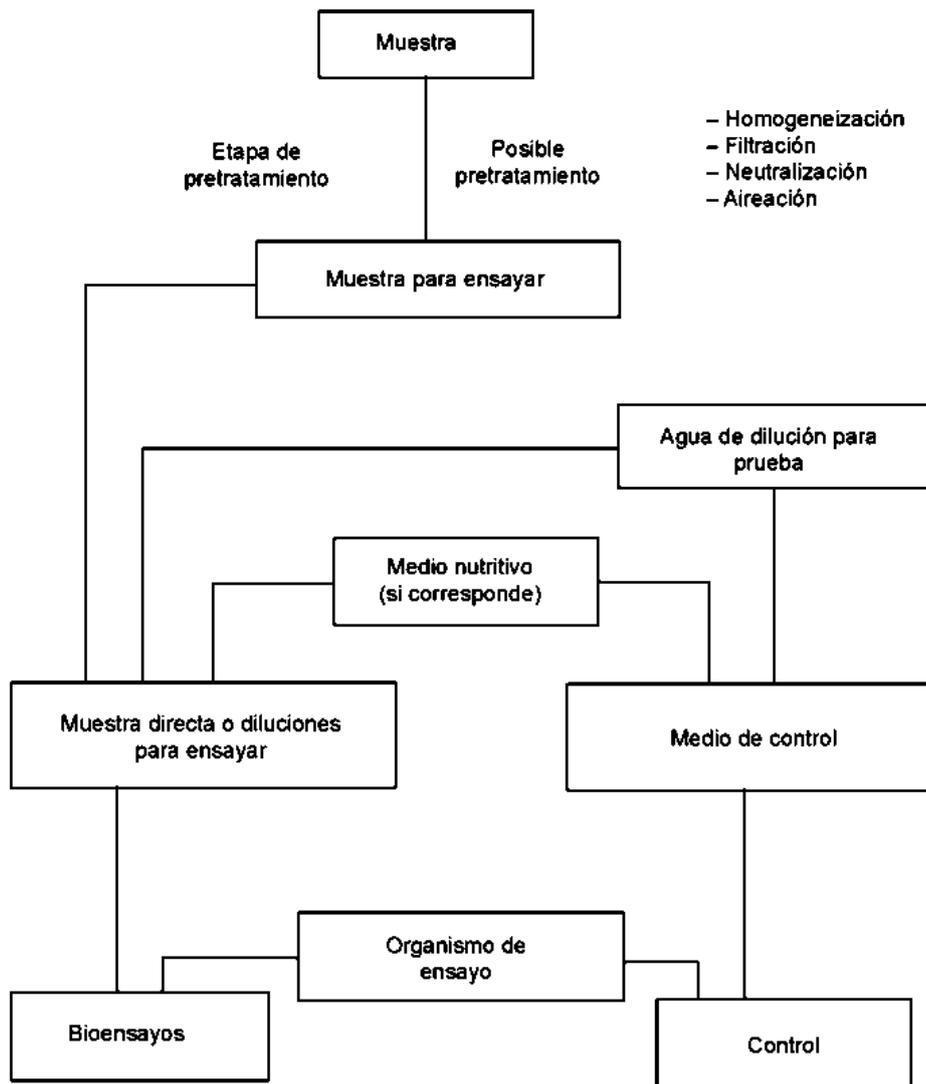


Figura 1. Diagrama general para el tratamiento demuestras (Ronco *et al.*, 2004).

La ecotoxicología contempla el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes sobre especies representativas de los ecosistemas acuáticos, con la realización de ensayos de toxicidad en laboratorio y en el campo (*in situ*). Los mismos que funcionan como indicadores de las relaciones entre el efecto y la exposición a los tóxicos bajo condiciones controladas, definidas y reproducibles (Adams, 2003). Es en este sentido que

se consideran una importante herramienta de diagnóstico para estudiar el impacto de diferentes contaminantes sobre la biota, pues a partir de la realización de ensayos de toxicidad en laboratorio se examina la toxicidad potencial de una matriz contaminada, por exposición aguda o crónica, de los que se pueden obtener; medidas de mortalidad, inhibición del crecimiento y efectos en la reproducción de los organismos (Peluso, 2011).

Desde un enfoque ecotoxicológico, los organismos vivos son herramientas esenciales para la evaluación de la calidad ambiental y este enfoque se basa en el supuesto de que los organismos son sensibles a los contaminantes presentes en el ambiente y es factible establecer una correlación causal entre el tipo, el grado de contaminación y sus respuestas mediante variables biológicas seleccionadas, a las que se denomina *puntos finales* que comprenden una amplia gama de efectos, agudos y crónicos, deletéreos o no deletéreos, en distintos niveles de organización. Estos puntos finales seleccionados dependen de los objetivos del estudio, y la evaluación se realiza experimentalmente en bioensayos de ecotoxicidad siendo de actual tendencia utilizar especies nativas de determinado ecosistema (Ferrari, 2015).

Un bioensayo ecotoxicológico acuático tienen por objetivo proveer el conocimiento necesario para proteger a las poblaciones y comunidades de los diferentes ecosistemas acuáticos, ante la exposición a diferentes tóxicos en concentraciones que pueden estar asociadas a efectos adversos; estos ensayos deben ser realizados bajo condiciones experimentales reproducibles y estandarizadas para permitir establecer la validez de una hipótesis determinada. Además, los organismos de ensayo deben preferentemente representar funciones ecológicas relevantes en el ambiente a evaluar y contar con una importante base de conocimiento biológico (Ferrari, 2015).

Los bioensayos son útiles para el propósito de monitoreo y apuntan a objetivos ecotoxicológicos netamente prácticos. No obstante, la gran mayoría de las especies estandarizadas y validadas para evaluaciones de ecotoxicidad pertenecen al Hemisferio Norte. Esta situación nos plantea la necesidad de identificar y estudiar toxicológica y biológicamente el comportamiento de especies que sean representativas de nuestros ecosistemas (Ferrari, 2015).

Los invertebrados, de agua dulce más usados en las evaluaciones de toxicidad de sedimentos y aguas incluyen: *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales pomelas*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, *C. riparius*, *Hexagenia limbata* y *Tubifex tubifex*. Pues estas son las que disponen de protocolos estandarizados por diferentes organismos

internacionales (Peluso 2011). Los resultados de los ensayos de toxicidad realizados con los diversos organismos vivos mencionados se expresan en parámetros como la Concentración letal media (CL_{50}) y la Concentración Inhibitoria media (CI_{50}), otro parámetro importante que se determina a partir de estos ensayos es el NOEC, que es la mayor concentración de toxico para la cual no se observa un efecto estadísticamente significativo respecto del control (Planes y Fuchs, 2015).

c) Compuestos tóxicos de referencia y pruebas de sensibilidad

Un compuesto tóxico de referencia vendría a ser las sustancias orgánicas o inorgánicas utilizada en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a usar en las pruebas; para ello en la etapa inicial para emplear un método de prueba debe seleccionarse un compuesto soluble de pureza igual o mayor al 99%, al cual se le realicen pruebas de toxicidad para una especie determinada con el fin de establecer el intervalo de concentración del compuesto seleccionado que produce el efecto esperado. (Díaz – Baez *et al.*, 2008).

Hay diversos compuestos como tóxicos de referencia, la USEPA (1993) refiere el empleo de cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio (CdCl), sulfato de cobre ($CuSO_4$), duodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). La agencia ambiental canadiense (EC, 1990) sugiere además el sulfato de zinc ($ZnSO_4$). Dichos compuestos se emplean en los ensayos de toxicidad para evaluar las posibles variaciones en la sensibilidad de los organismos utilizados como organismos prueba en el laboratorio (USEPA, 1993). Uno de los tóxicos de referencia más utilizados es el cromo (Cr VI) a partir de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) usado para determinar si la sensibilidad del cultivo (Díaz *et al.*, 2004).

Se evalúa la respuesta de los organismos ante la exposición al tóxico de referencia. En *Daphnia* por ejemplo al ser expuesta ($K_2Cr_2O_7$), la concentración letal media o CL_{50} ; deberá encontrarse dentro del intervalo establecido (Díaz *et al.*, 2004) y para establecer este intervalo es necesario realizar como mínimo cinco pruebas con el tóxico de referencia, es con estos datos que se inicia la construcción de la carta control que deberá complementarse con la información generada en nuevas evaluaciones y esta carta se debe mantener actualizada con los veinte datos más recientes (USEPA, 1991). A partir de estos resultados, se determina la CL_{50} promedio para la sustancia, así como la desviación estándar (s) de la CL_{50} en el cual varía la respuesta de los organismos al tóxico seleccionado (Díaz *et al.*, 2004).

d) Pruebas de toxicidad y análisis de resultados

Uno de los aspectos importantes en ecotoxicología es la relación existente entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta es la relación, dosis-respuesta, los gráficos bivariantes de estas relaciones muestran en general patrones no rectilíneos de tipo sigmoide; Figura 2 (Díaz *et al.*, 2004).

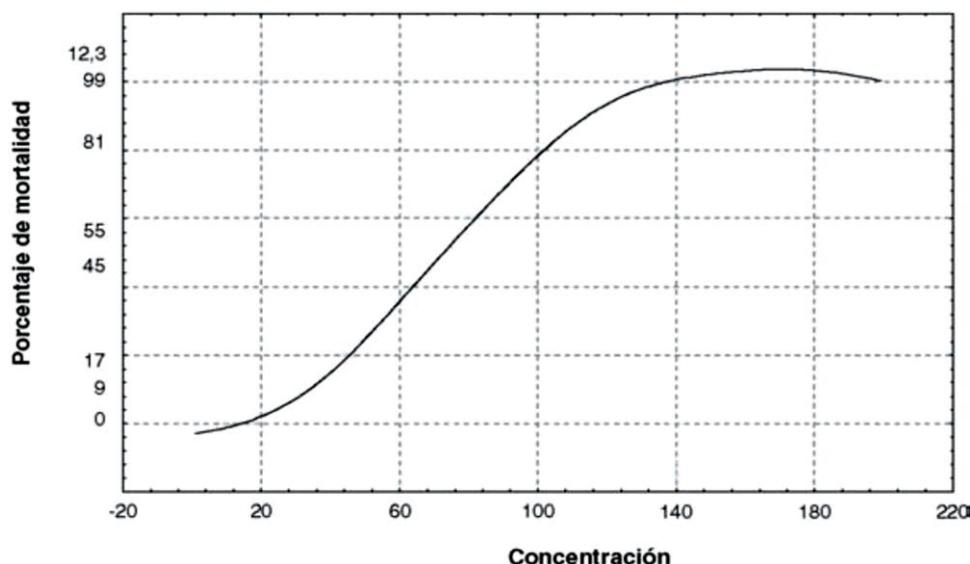


Figura 2. Relación dosis-respuesta para establecer la toxicidad de un compuesto sobre un organismo (Díaz *et al.*, 2004).

Diseños de experimentos. Se deben seguir los principios básicos planteados para el diseño de experimentos. Esto es decir un número razonable de repeticiones (dependiendo de la prueba), aleatorización de las dosis en las unidades experimentales y un control para lograr una estimación válida del error experimental (Díaz *et al.*, 2004).

En la mayoría de las pruebas se trabaja con un diseño completamente aleatorizado, para ser analizado a través del análisis de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y condiciones ambientales controladas. Sin embargo, en algunos casos es necesario recurrir a análisis de covarianza o ANOVA en bloques para controlar la heterogeneidad de las unidades experimentales (Díaz *et al.*, 2004):

1. Método Probit (paramétrico).
2. Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico).
3. Método de Sperman-Karber (no paramétrico).
4. Método gráfico.

Análisis de regresión y análisis Probit. Para el cálculo de los CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀ generalmente se usa el análisis Probit (con o sin ajuste). En un experimento típico de pruebas de toxicidad aguda se tiene la siguiente situación (Díaz *et al.*, 2004):

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

$$p = \left(\frac{r}{n}\right) \times 100$$

Para realizar los cálculos, se puede usar un *software* como el suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (USEPA): *Probit Analysis Program*, versión 1.5. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores *m*-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs. Dosis dentro del marco de la regresión. Adicionalmente, hacen dos pruebas de bondad de ajuste: Pearson y Log-Likelihood Ratio. Estas pruebas son importantes, porque si los datos no se ajustan a la línea recta generada, es necesario llevar a cabo un análisis Probit ponderado o aplicar métodos no paramétricos o gráficos para poder determinar la CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀ (Díaz *et al.*, 2004).

Método gráfico. También se puede utilizar el método gráfico para estimar la CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀. Para ello se procede de forma similar, partiendo de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje de las *X* las concentraciones (mg/L) y en el eje de las *Y* el porcentaje de mortalidad. Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados (en escala lineal) en función de las concentraciones probadas (en escala logarítmica); se conectan los puntos obtenidos más cercanos al 50% del efecto observado, o sea, a la mayor concentración que no causa efecto tóxico y a la menor concentración que causa efecto tóxico. A partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde a la CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀ del estímulo o agente estudiado. (Díaz *et al.*, 2004).

2.2.3. Efluentes y ecotoxicidad

a) Aguas residuales y efluentes contaminantes

Desde que aparecieron las primeras poblaciones humanas estables, la eliminación de los residuos ha constituido un problema primordial para las sociedades y en cuanto a los residuos líquidos procedentes del uso doméstico, agrícola e industrial han tenido como destino final ríos y corrientes subterráneas, lagos, estuarios y el mar. De esta forma, han

venido perdiendo sus condiciones naturales y su capacidad para dar sustento a la vida acuática y de las sociedades humanas (Espigares y Pérez, 1990)

Acción tóxica de las aguas residuales. Es conocido como el efecto y/o la repercusión que tienen algunos residuos líquidos sobre la flora y fauna natural de los ecosistemas hídricos receptores y sobre los consumidores, que se ven afectados por la acumulación de estas sustancias tóxicas en la cadena alimenticia. Por ello se realizan estudios sobre la toxicidad de algunos compuestos sobre organismos y microorganismos acuáticos, y sobre los niveles de resistencia y adaptación de éstos a algunas sustancias y elementos presentes son: (Espigares y Pérez, 1990)

- a) **Letales:** Causan muerte por envenenamiento directo.
- b) **Subletales:** Por debajo de los niveles que causan la muerte, pero pueden afectar al crecimiento, reproducción o actividad de los organismos.
- c) **Agudos:** Causan un efecto (normalmente la muerte) en corto período de tiempo.
- d) **Crónicos:** Causan un efecto letal o subletal durante un período de tiempo prolongado.
- e) **Acumulativos:** se incrementa el efecto con dosis sucesivas.

b) Características de las aguas residuales. Actualmente una inmensa cantidad de contaminantes en forma de efluentes domésticos e industriales se descargan directamente o indirectamente en cuerpos de agua, los cuales tienen severos impactos sobre su ambiente biótico y abiótico (Turk y Turk, 1984). Las aguas residuales domésticas son consideradas como altamente contaminantes, y son en apariencia gris y turbia, tiene una temperatura que varía entre 10 a 20°C, una concentración promedio en DBO de 200 mg/L, sólidos suspendidos en 240 mg/L, sólidos totales 800 mg/L, 3 millones de coliformes/100 mL, nitrógeno total 35 mg/L y fósforo total 10 mg/L (Mihelcic y Zimmerman, 2012).

c) Toxicidad de efluentes como herramienta de control ambiental

La toxicidad de un efluente no puede ser entendida, ni explicada, solamente por el análisis de las concentraciones de sustancias o parámetros individuales. Por el contrario, es la resultante de la interacción, sinérgica o antagonista, de cada uno de los componentes físicos y químicos que componen los efluentes; por lo tanto, la única manera de evaluar su potencia tóxica es mediante la aplicación de ensayos de toxicidad utilizando organismos estandarizados para tal fin (Di Marzio, 2005). En la actualidad, el monitoreo de los efluentes residuales se debería realizar siguiendo las rutas de la Figura 3, antes de descargar al ambiente y así tener la certeza que su efecto nocivo al ambiente será mínimo.

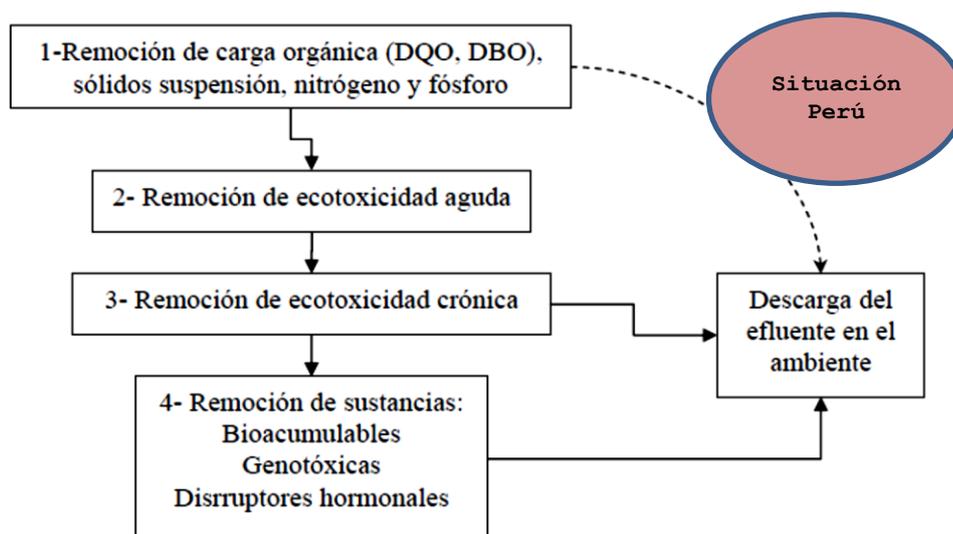


Figura 3. Criterios de evaluación ambiental de efluentes residuales antes de su descarga al ambiente (Di Marzio, 2005).

La toxicidad de una sustancia o mezcla de sustancias, está determinada por sus concentraciones individuales y por el tiempo de exposición a los que están sometidos los organismos. En general, los efluentes deberían estar “libres de sustancias tóxicas en cantidades tóxicas”(Di Marzio, 2005). Una medida directa de la toxicidad de estos efluentes está dada por la Toxicidad Total del Efluente o WET (siglas en inglés de “*Whole Effluent Toxicity*”) definida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 1991). Posterior al(WET) viene la biovaloración o el estudio *in situ* en los ambientes que reciben descargas de efluentes líquidos; esto arrojará un acercamiento integrado de la evaluación del impacto ambiental asociado a dichas descargas (Di Marzio, 2005).

Además actualmente la evaluación de sustancias potencialmente bioacumulables, genotóxicas y disruptores hormonales, está tomando mayor relevancia. Al ser bioacumuladas pueden ser transferidas a los niveles tróficos superiores, en las cadenas alimenticias de los ecosistemas acuáticos (Di Marzio, 2005). Por otro lado, su detoxificación por parte de los organismos puede implicar la producción de metabolitos que tengan poder genotóxico, es decir capaces de alterar la estructura química del ADN. De la misma manera que ocurre con la evaluación de la toxicidad de un efluente, el poder genotóxico del mismo puede ser el resultado de la interacción de todos los compuestos químicos presentes en la matriz líquida (Di Marzio, 2005).

d) Evaluación de toxicidad de efluentes

Los efluentes son la mezcla de muchos compuestos químicos y predecir la toxicidad de las mezclas complejas a partir de su composición es muy difícil, si no imposible (Jorgensen, 2010). Es por esto que se realizan ensayos con el efluente completo, para evaluar su toxicidad; las agencias regulatorias de muchos países implementaron el control de la toxicidad de los efluentes como un parámetro de cumplimiento obligatorio (EE.UU., Brasil, Canadá, países europeos, Australia, Nueva Zelanda). Los ensayos de toxicidad para el control de efluentes se realizan empleando procedimientos normalizados; utilizando crustáceos, algas, peces y bacterias luminiscentes. Distintas normas, (ISO, EPA, etc.) describen los procedimientos para la realización de estos ensayos y así se detecta el efecto sobre los organismos causado por todas las sustancias presentes en el efluente residual (Planes y Fuchs, 2015).

Los estándares de calidad de efluentes residuales han sido basados tradicionalmente en el control de parámetros globales tales como DBO, DQO y SST principalmente y otros compuestos químicos y físicos en el Perú (DS 021-2009-VIVIENDA) y en otros países. La detección de estos parámetros no son por sí mismos suficientes, ya que el agua residual generada desde pequeñas industrias pueden contener grandes cantidades de químicos, muchos de los cuales pueden estar presentes en tan bajas concentraciones que pueden estar por debajo de los límites de detección y para muchos de ellos ni siquiera las técnicas analíticas son adecuadas. Secundariamente, los análisis fisicoquímicos no sólo son complicados, caros y demanda tiempo, sino también no informa acerca de efectos antagonistas o sinérgicos de varios químicos sobre la comunidad biótica de los ecosistemas acuáticos (Villegas – Navarro *et al*, 1999).

Para los ensayos de toxicidad en efluentes, se exponen los organismos a diferentes concentraciones porcentuales del efluente en agua de calidad adecuada para el ensayo y dependiendo de la composición química, algunos efluentes son tóxicos sobre uno u otro organismo ensayado; por eso es recomendado realizar los ensayos sobre más de una especie. Concluidos los ensayos de toxicidad, a los resultados se les expresa en CE₅₀, CL₅₀, o CI₅₀ y estos parámetros están expresados en porcentaje del efluente a ellos se les emplean como estrategia regulatoria con la finalidad de detectar la presencia de compuestos tóxicos no analizados químicamente; permitiendo evaluar el efecto conjunto de todas las sustancias y compuestos químicos detectando efectos sinérgicos, aditivos o de potenciación (Bertoletti y Zagatto, 2008).

2.2.4. Algunos anfípodos utilizados en bioensayos de toxicidad

a) Clasificación y taxonomía del Amphipodo *Hyalella*:

DOMINIO: Eukarya
REINO: Metazoa
SUBREINO: Eumetazoa
PHYLUM: Arthropoda
SUBPHYLUM : Mandibulata
CLASE: Crustácea
SUB CLASE: Eumalacostraca
SUPERORDEN: Peracarida
ORDEN : Amphipoda
FAMILIA: Dogielinotidae
GÉNERO: *Hyalella* Smith

b) *Hyalella azteca*

Entre las especies protocolizadas en EEUU y Canadá, para evaluaciones de calidad de sedimentos de cuerpos de agua dulce y estuariales, se encuentra el anfípodo *Hyalella azteca* Saussure, 1858, (USEPA, 2000). Es una especie de anfípodo de agua dulce, distribuido en toda América del Norte, de hábitos epibentónico y detritívoro (Pennak, 1989); en la naturaleza se lo encuentra asociado al fondo, sobre la superficie de plantas macrófitas o rocas donde se alimenta de algas y bacterias (perifiton). Se le considera una especie muy sensible a los contaminantes ambientales (Milani *et al.*, 2003), además de ser tolerante a un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno disuelto, alcalinidad, salinidad, junto a características físicas del sedimento como granulometría y contenido de materia orgánica (Peluso, 2011).

La crianza en laboratorio es simple y posee un período relativamente corto de madurez sexual. Características que lo convierten en un excelente organismo de prueba en ensayos de toxicidad con sedimentos. *H. azteca* ha sido utilizada en evaluaciones para determinar efectos subletales asociados a sedimentos contaminados, tales como efectos adversos en el crecimiento y la reproducción en ensayos crónicos (Ingersoll *et al.*, 1998). Estos efectos son buenos estimadores de toxicidad, alertando sobre posibles daños ambientales a menores concentraciones de contaminantes, en comparación con la información sobre supervivencia como punto final (Peluso, 2011).

Hyalella Azteca ha sido estudiada además para considerarla como biomonitor de metales y metaloides de la actividad minera, en dos ríos afectados por esta actividad, colocando estos organismos en cajas durante 17 días al cabo de los cuales se evaluó su concentración en sus cuerpos de estos elementos químicos. Los resultados indican que este anfípodo bioacumula 12 de estos metales (As, Cr, Cu, Ln, Mn, Ni, Se, Sb, Ti, U, V y Zn) y se concluye que puede ser usado como biomonitor para metales de minería (Couillard *et al.*, 2008).

c) *Hyalella curvispina*

Es otro crustáceo anfípodo de agua dulce, epibentónico y asociado a macrófitas, y diversos hábitats de agua dulce tales como lagos, charcas y arroyos, su alimento es principalmente detritos, algas y bacterias asociados al sedimento y a las plantas vasculares acuáticas, representativo del complejo zoobentónico de Sudamérica del Sur, distribuyéndose desde Punta Arenas, Chile y las Islas Malvinas en el Sur, hasta Cangallo y Río de Janeiro en el Norte (Grosso y Peralta, 1999). Esta especie es taxonómicamente cercana a la especie validada a nivel internacional *H. azteca* y abundante en cuerpos de agua dulce de la región sudamericana (fig. 4). Y desde hace años en Argentina se vienen realizando esfuerzos para evaluar efectos ecotoxicológicos del agua y sedimentos sobre *H. curvispina* (Ferrari, 2015).

Por tanto, estas diversas razones, incluyendo su amplia distribución geográfica, fácil cría en laboratorio (Somma *et al.*, 2011 op cit Ferrari, 2015) y por ser parte de la fauna nativa en el área (Argentina), hay una creciente preocupación por ampliar el conocimiento tanto de su biología como su respuesta a diferentes agentes tóxicos. Por ello se ha comenzado a emplear este anfípodo (Figura 4) como organismo prueba en algunas evaluaciones ecotoxicológicas, principalmente en ensayos *in situ* para determinar efectos producidos por plaguicidas en áreas de cultivos. A su vez se ha utilizado en bioensayos de laboratorio tanto para evaluaciones de sensibilidad a tóxicos como en evaluaciones de muestras ambientales (Peluso, 2011).

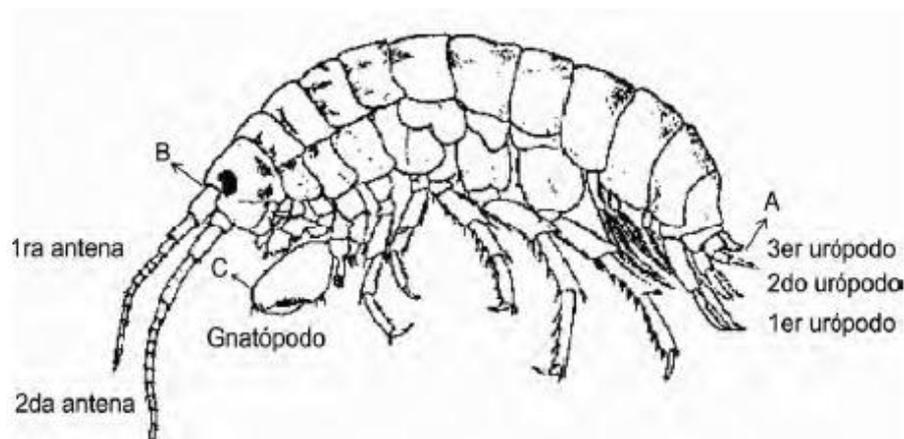


Figura 4. Aspecto general de un individuo de *Hyalella* (Fuente: Peluso, 2011)

2.2.5. Procedimiento de bioensayo con un organismo de amplio uso: *Daphnia magna*

Procedimiento de la prueba. Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. magna* se emplean neonatos (< 24 h nacidos) exponiéndolos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un periodo de 48 h. Como resultado de dicha exposición es posible determinar la concentración de la muestra, que produce la muerte al 50% de la población de neonatos expuestos (CL₅₀), con un nivel de confiabilidad del 95 por ciento. También puede determinarse la concentración mínima donde aún se observa efecto de mortalidad (*Lower Observable Effect Concentration*, LOEC), así como aquella donde la muestra no produce la muerte de neonatos (*No Observable Effect Concentration*, NOEC) (Díaz Baez *et al.*, 2008).

Cuando no hay un conocimiento de la toxicidad de las muestras es recomendable llevar a cabo una prueba preliminar, en la cual se prepara un amplio número de concentraciones sin réplicas (por ejemplo: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100%). Para la prueba se colocan 30 mL de cada una de las diluciones en los vasos de prueba, se transfieren diez neonatos y a las 24 h se registra el número de organismos muertos. Con esta información podrá establecerse el intervalo de concentración, este intervalo se utiliza como guía para la preparación de las diluciones en las pruebas definitivas (Díaz Báez *et al.*, 2008).

En la preparación de las diluciones de las muestras se utiliza como medio de dilución agua dura reconstituida (180 y 160 mg/L CaCO₃). *La Preparación de las soluciones de prueba: muestras ambientales (efluentes y aguas superficiales)*, recomienda utilizar un factor de dilución de 0,5, el cual permite cubrir un amplio intervalo de dilución (por ejemplo, 100; 50; 25; 12,5; 6,25%, etcétera) (Díaz Báez *et al.*, 2008).

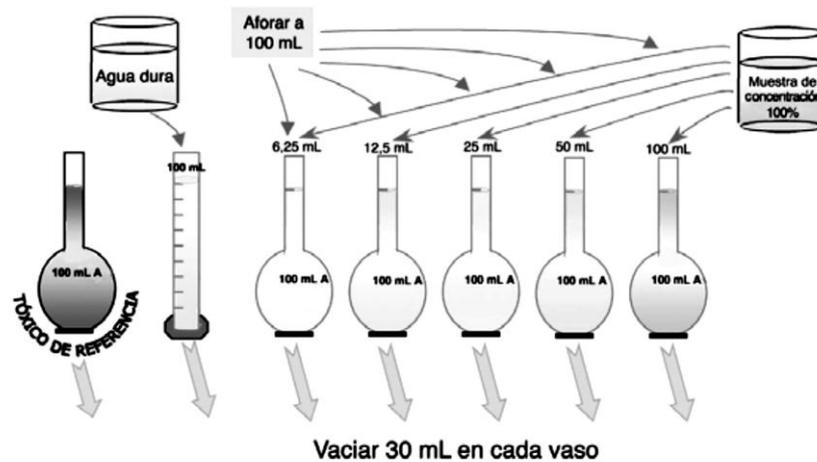
Si se observa un alto porcentaje de mortalidad durante las primeras horas del bioensayo, es necesario realizar más diluciones y repetir el bioensayo. Las pruebas definitivas requerirán como mínimo cinco diluciones, por lo que es necesario preparar un mínimo de 100 mL por dilución. Este volumen será suficiente para el llenado de las tres réplicas (25 mL en cada uno) de cada concentración (Díaz Báezet *al.*, 2008).

Para ello se emplean vasos de polietileno desechables (Figura 5) de 30 mL, o vasos de precipitado de vidrio de 50 mililitros. Además de las diferentes concentraciones de la muestra, se ha de preparar junto con las respectivas réplicas un control negativo con agua dura reconstituida sin suplementos, y un control positivo con una solución del tóxico de referencia (Cr VI) en la concentración que, según la carta control previamente elaborada, corresponda a la CL_{50} (Díaz Báezet *al.*, 2008).

Una vez preparadas cada una de las soluciones, se transfieren diez neonatos de menos de 24 h de nacidos a cada uno de los recipientes; utilizando una pipeta despuntada. Terminada la transferencia se cubren los vasos con papel Parafilm y se colocan bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura por un periodo de 48 horas; transcurrido ese tiempo se revisan los vasos de prueba y se registra el número de organismos muertos en cada uno; reconociendo a los organismos muertos por la falta de movilidad o la ausencia de ritmo cardíaco por ello antes de efectuar las lecturas se agitan los recipientes en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo. Aquellos que no presenten movilidad pueden observarse a simple vista y se confirma la ausencia de ritmo cardíaco con un microscopio estereoscópico (Díaz Báezet *al.*, 2008).

En la Figuras 5 se presenta esquema del procedimiento de prueba durante la elaboración de las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna*.

1 Preparación de diluciones



2 Preparación de prueba

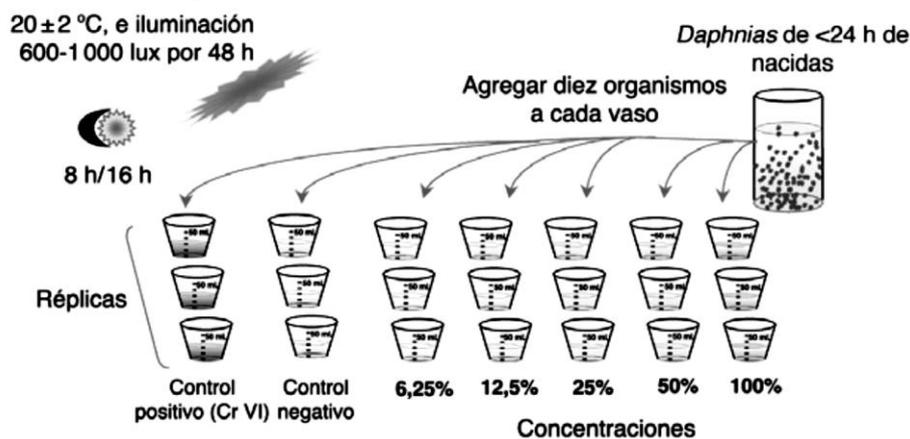


Figura 5. Ejemplo de procedimiento de prueba ecotoxicológica para *Daphnia magna* (Díaz Báez *et al.*, 2008).

2.2.6. Uso de organismos autóctonos en bioensayos

Al seleccionar una especie nativa como organismo prueba diferente a las incluidas en protocolos estandarizados, se debe de tener en cuenta una serie de pautas que indiquen una sensibilidad equivalente a las especies recomendadas para el tipo de ensayo en consideración. A este respecto, ASTM (1994) y USEPA (2000) (op cit Peluso 2011) definen algunos criterios a tener en consideración cuando se selecciona una especie prueba para ser utilizada en ensayos con sedimento:

- Sensibilidad a sustancias tóxicas asociadas a sedimentos
- Relevancia ambiental
- Tiempos cortos de generación
- Facilidad en el cultivo y mantenimiento en laboratorio.
- Si se encuentra en contacto con el sedimento

- Tolerancia a las variaciones fisicoquímicas del medio
- Facilidad de identificación taxonómica
- Importancia ecológica,
- Localización geográfica en relación al sitio de estudio
- Compatibilidad con la metodología de ensayo y los puntos finales seleccionados.

Para la selección de especies de prueba Díaz *et al.* (2004) incluye:

- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

2.2.7. Evaluación de riesgo en los ecosistemas

a) Persistencia de los compuestos químicos en el ambiente

El término “persistencia” se aplica a los compuestos químicos que no sufren transformaciones ni se degradan una vez liberados al ambiente es decir si un compuesto permanece sin modificaciones en el ambiente durante largos periodos de tiempo y además es toxico, las consecuencias serán más importantes que si se transformara en productos de degradación menos nocivos (Wright y Welbourn, 2002; SGA, 2013). Los principales mecanismos de degradación en el ambiente son la fotólisis, la hidrólisis y la biodegradación (Planes y Fuchs, 2015).

b) Monitoreo biológico y evaluación de riesgo ecológico

Los organismos residentes en los cuerpos de agua (algas, peces, invertebrados) completan allí la mayor parte de su ciclo de vida y por lo tanto están expuestos de manera continua a todos los contaminantes que lleguen al cuerpo de agua. El objetivo del biomonitoreo es detectar cambios en la biota que pueden ser indicadores no detectados por los análisis químicos y de toxicidad realizados sobre el efluente. El biomonitoreo no predictivo, y se utiliza para revisar si las acciones de control son suficientes o es necesario modificarlas (Wright y Welbourn, 2002).

El procedimiento utilizado para tomar decisiones respecto a la remediación de un sitio es la evaluación de riesgo. La evaluación de riesgo en los sitios contaminados se realiza para la salud humana y la protección de los ecosistemas (evaluación de riesgo ecológico)(Calow y Forbes, 2003).La evaluación de riesgo ecológico procede asignando magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales; y recurre tanto a métodos predictivos para la evaluación de la exposición, como de los efectos de sustancias tóxicas a distintos niveles de organización y escala trófica (Sutter, 1993 op cit Ronco *et al.*, 2004)

Además de las ventajas de los bioensayos, sobre los análisis convencionales (económicos, fáciles de usar, no peligroso), estos nos ayudan a caracterizar el estado del ambiente y su riesgo potencial para los seres vivos incluido el hombre. Son parte además de las nuevas herramientas para la evaluación de la contaminación ambiental, dentro de lo que es el conjunto de herramientas bioanalíticas que actualmente se difunden dentro de la llamada *química verde* (Wieczerezak *et al.*, 2016). Este conjunto de nuevos análisis para determinar la calidad ambiental se detalla en la Figura 6.

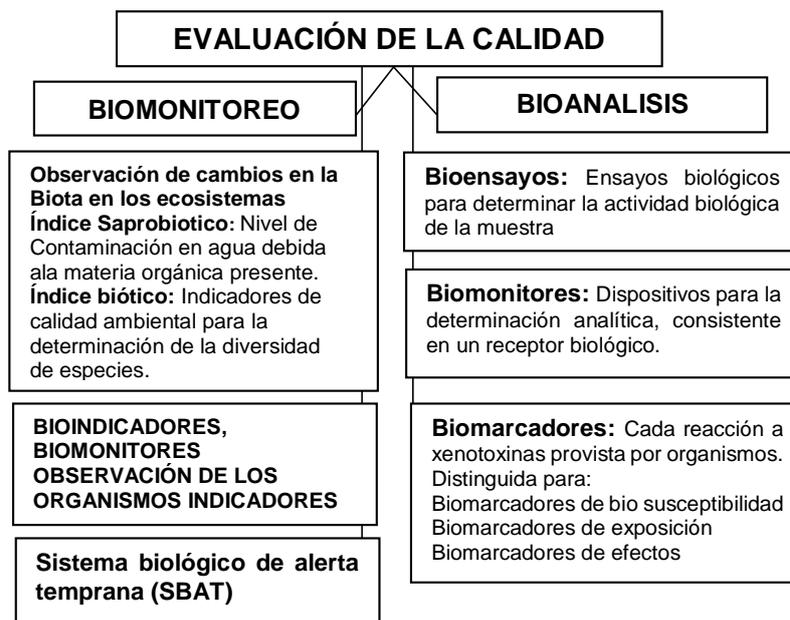


Figura 6.Herramientas con métodos biológicos para estimar el estado del medio ambiente (adaptado al español de Wieczerezak *et al.*, 2016).

2.2.8. *Hyalella cuprea* en el lago Titicaca

a) Clasificación y taxonomía: La clasificación taxonómica (Dejoux, 1991; Somma *et al.*, 2011):

DOMINIO: Eukarya
 REINO: Metazoa
 SUBREINO: Eumetazoa
 PHYLUM: Arthropoda
 SUBPHYLUM: Mandibulata
 CLASE: Crustácea
 SUB CLASE: Eumalacostraca
 SUPERORDEN: Peracarida
 ORDEN: Amphipoda
 FAMILIA: Dogielinotidae
 GÉNERO: *Hyalella* Smith
 ESPECIE: *Hyalella cuprea* Faxon 1876
 Nombre común: Camaroncillo del lago

Estudios sobre anfípodos del lago Titicaca son escasos, entre estos se encuentra el de Dejoux (1991) quien reporta que en la parte boliviana del lago (lago Mayor y Huiñaimarca) se encuentran 11 grupos taxonómicos diferentes y todas pertenecientes a la familia Orchestidae, la mayoría fáciles de identificar por sus espinas dorsales y unas pocas especies inermes o con espinas poco marcadas. Este autor refiere que son los organismos más importantes del lago después de los moluscos y representan el 20 % del conjunto de macro invertebrados bénticos. Su función es de detritívoros e incluso de depredadores con respecto a otros pequeños organismos (zooplancton, larvas de quironómidos), les otorga un papel determinante en la dinámica del ecosistema lacustre. Las especies reconocidas según Dejoux (1991) son: *Hyalella armata*, *H. lucifugax*, *H. dentata* var. *inermis*, *H. latimana*, *H. neveu-lemairei*, *H. cuprea*, *H. knickerbrokeri*, *H. echina*, *H. longipalma*, *Hyalella* sp, *H. longipes*.

De los Ríos *et al.* (2012) estudiaron el patrón de distribución de especies Sudamericanas del anfípodo de agua dulce del género *Hyalella* mediante una aproximación panbiogeográfica. Encontraron cinco líneas: (1) Norte de los Andes al Lago Titicaca (*H. dielaii*, *H. meinerti*, *H. dybowskii*, *H. jelskii*, *H. lubominsky*, y *H. pauperocavae*); (2) Lago Titicaca (*H. armata*, *H. cuprea*, *H. latinamus*, *H. lucifugax*, *H. montforti*, *H. neveulemairei*, *H. robusta*, *H. tiwanaku*, *H. simplex simplex*, y *H. solida*); (3) Andes centrales (*H.*

fossamancinii y *H. kochi*); (4) Pampas (*H. bonariensis*, *H. caeca*, *H. castroi*, *H. longispina*, *H. montenegrinae*, *H. chiloensis*, *H. falklandensis*, *H. franciscae*, *H. neonoma*, *H. patagonica*, y *H. simplex*). Para el lago Titicaca además se incluyen a *H. echinus*, *H. crawfordi* y *H. gauthieri*.

González y Watling (2003) indican que existen 11 especies endémicas en el lago Titicaca y una no endémica, adicionalmente reporta una nueva especie endémica: *Hyaella nefrens* y otra no endémica *Hyaella tiwanacu*. Así mismo re describen a *H. cuprea*, *H. latimanus*, *H. montforti* y *H. neveulemairei*. Los autores reportan que la alta diversidad de *Hyaella* en este lago no es bien comprendida y ha sido comparada con la espectacular diversidad del lago Baikal.

b) Descripción morfológica

Su característica más destacable y que la diferencia de otras especies es que no posee ninguna formación espinosa o dentellada y la parte ínfero posterior de los 3 primeros segmentos abdominales es ligeramente puntiaguda. El flagelo del primer par de antenas posee cerca de 10 segmentos, el segundo par siendo macho más largo que el primero y mide 1/3 de la longitud total del cuerpo. Los 5º, 6º y 7º pares de patas torácicas son cortos, pero poseen basopoditos grandes; el 5º par es más corto que los otros. La longitud total es de 9 a 11 mm y el tegumento presenta reflejos cobrizos sobre todo el cuerpo, véase Figura 7 (Dejoux, 1991).

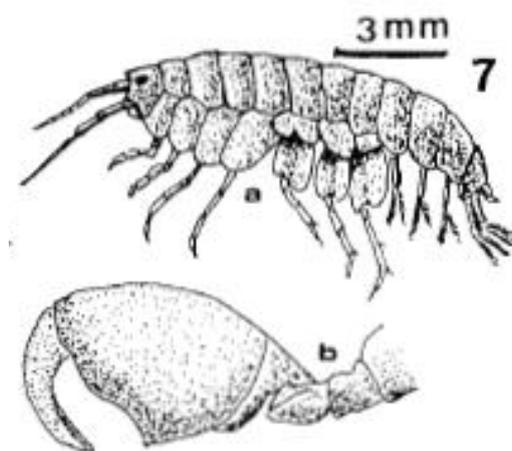


Figura 7. Ilustración de *Hyaella cuprea* (a) y la carpopodita del macho (b). (Fuente: Dejoux, 1991).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Aguas residuales: Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que por uso del hombre, representan un peligro y deben ser desechadas, porque contienen gran cantidad de sustancias y/o microorganismos (Espigares y Pérez, 1990)

Biodisponibilidad: es un concepto farmacocinético que alude a la fracción y la velocidad a la cual la dosis o concentración de un toxico alcanza y que representa la fracción biodisponible del tóxico (Ronco *et al.*, 2004).

Bioensayo: ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Repetto y Sanz, 1995).

Contaminante: sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. En un sentido más amplio se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico (Nothcote, 1991).

CE₅₀/CI₅₀: concentración efectiva o de inhibición media. Concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La CE₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico. En muchos casos se usa equivalente a CL₅₀ o DL₅₀ (Newman y Unger, 2003).

CL₅₀: concentración letal media, concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo. La CL₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico (Newman y Unger, 2003).

Control: es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada (sinónimo de control negativo) (Ronco *et al.*, 2004).

Control positivo de referencia: se trata de sustancias puras de respuesta toxica conocida y establecida en un rango preciso, una especie prueba particular y condiciones experimentales preestablecidas (Newman y Unger, 2003).

Control positivo: evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema (Capo, 2007).

Ecotoxicología: Concierno a los efectos tóxicos de los agentes químicos y físicos en organismos vivos, especialmente en poblaciones y comunidades dentro de ecosistemas definidos; inclusive las rutas de dichos agentes y sus interacciones con el ambiente. Los efectos de los agentes químicos sobre el ambiente incluyen además los efectos sobre el hombre, y aquellos eventos adversos que ocurren en el ecosistema general (Espigares y Pérez, 1990).

Ensayo de toxicidad: Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y con condiciones definidas. (Repetto y Sanz, 1995).

Ensayo de toxicidad aguda: Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto tiempo (usualmente dos semanas) después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24 h. *Términos relacionados:* Ensayos de toxicidad, Dosis letal media (CL₅₀) Ensayo límite (Repetto y Sanz, 1995).

Especie validada: especies recomendadas por organismos de normalización y protocolizadas para su uso en bioensayos sobre la base de su caracterización toxicológica (Ingersol, 1995).

Especies centinelas: especies que sirven para demostrar la presencia de contaminantes en el medio en el que viven y el grado de exposición (Ingersol, 1995).

Estándar de calidad ambiental: Concentración máxima de una sustancia potencialmente tóxica que puede permitirse en un compartimento ambiental, generalmente en el aire (estándar de calidad del aire: AQS) o en el agua, durante un período definido También en inglés. **(IPCS)** *Sinónimos:* Estándar ambiental y ECA (Capo, 2007).

Estándar de descargas (efluentes, emisiones): Cantidad máxima de un contaminante liberado de una fuente a un medio que es aceptable bajo circunstancias específicas. (Capo, 2007).

ISO: Organización Internacional de Normalización (Mihelcic y Zimmerman, 2012).

LMP: Límite máximo permitido La presencia de un agente contaminante o potencialmente dañino en el aire, en la comida y en el agua, en un grado tal que al ser absorbido por un organismo permanecerá debajo de la dosis máxima permitida (Espigares y Pérez, 1990)

LOEC: concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, por sus siglas en inglés) (Kudiak, 2016).

NOEC: concentración a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés) (Wright y Welbourn, 2002).

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (Wright y Welbourn, 2002).

PNEC: (Predicted No Effect Concentration) Es la concentración de un químico el cuál marca el límite debajo del cuál no hay efectos adversos de exposición en un ecosistema. Se usa en evaluaciones de riesgo ambiental como una herramienta ecotoxicológica (Wright y Welbourn, 2002).

Puntos finales: Parámetro biológico seleccionado y cuantificable a fin de estimar un efecto particular en un ensayo (Calow, 2003).

PMTC (concentración mínima del tóxico esperada): término elaborado por *Environment Canada* para su uso en el monitoreo ambiental de efectos de efluentes. Concentración de un efluente en el cuerpo receptor por debajo de la cual se esperaría que sólo un 5% de las muestras manifestaran efectos nocivos subletales, estimado con un nivel de confianza del 95% (PMTC, por siglas en inglés) (Ferrari, 2005).

Proporción de emisión tóxica: es la potencia tóxica de un efluente multiplicado por el volumen descargado. Por lo tanto, el valor de las unidades de toxicidad deberá ser multiplicado por la descarga en metros cúbicos por día (Ronco *et al.*, 2004).

Sedimento completo: se trata del sedimento natural muestreado sin procesamiento posterior (Ferrari, 2005).

Sedimentos material sólido acumulado sobre la superficie terrestre. La sedimentación ocurre cuando un material sólido es transportado por una corriente de agua y se posa en el fondo del río, embalse, etc. (Nothcote, 1991).

Toxicidad aguda: efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo (minutos, horas o algunos días) (Mihelcic y Zimmerman, 2012).

Toxicidad crónica: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia. (una porción significativa de la vida del organismo >10%) (Mihelcic y Zimmerman, 2012).

Unidades de toxicidad (UT): valor vinculante los valores de CL_{50} s o con la toxicidad de una muestra en particular. Las unidades de toxicidad agudas (UTas), en particular y se definen como $100/CL_{50}$ expresada como porcentaje de dilución de la muestra (Ferrari, 2003).

Validación del estudio: Un estudio es válido si sus resultados corresponden a la verdad. Para ello no debe existir ningún error sistemático y el error aleatorio debe ser lo más pequeño posible (Bertoletti y Zagatto, 2008).

Xenobiotico: Compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente (Bertoletti y Zagatto, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito de estudio

El estudio ha sido desarrollado contemplando una fase campo, que incluye aspectos relacionados al muestreo de aguas residuales principalmente y evaluaciones fisicoquímicas *in situ*; la fase de laboratorio considera la crianza y mantenimiento de los anfípodos y los bioensayos propiamente.

Fase de campo. Se realizaron muestreos desde cinco puntos efluentes donde se descargan aguas residuales de la ciudad de Puno hasta desembocar en el ecosistema de la bahía interior de Puno (lago Titicaca) con deficiente o ningún tratamiento, ellos incluyen:

- 1) Laguna de oxidación Espinar, recolectando las muestras en el punto colector de aguas residuales de una parte de la población de la ciudad de Puno, antes de su ingreso a la laguna de oxidación.
- 2) Descarga en el Jr. 3 de octubre, en las inmediaciones del edificio de administrativo de la UNA Puno, que consiste en un canal donde trae aguas residuales ingresando directamente a la bahía interior de Puno.
- 3) Descarga Jr. Ricardo Palma, a la altura del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, que en apariencia el canal trae consigo aguas residuales de dicho nosocomio e ingresa directamente a la bahía interior de Puno.
- 4) Descarga Barrio Vallecito, desde el canal que trae las aguas residuales del mencionado barrio y que ingresa directamente a la bahía interior de Puno (laguna del malecón de la costanera) sin ningún tratamiento previo.
- 5) Descarga del Barrio San José, cuya canaleta recepciona aguas residuales de la ciudad universitaria de la UNA Puno y de viviendas del mencionado barrio, para luego ingresar sin ningún tratamiento, directamente a la bahía interior de Puno.

El detalle de la ubicación de los mencionados puntos se aprecia en la Figura 8, en ellos también se realizaron mediciones *in situ* de algunos parámetros fisicoquímicos (OD, pH, temperatura, conductividad eléctrica). En la fase de campo además se considera las colectas de hyalellas para las crianzas en laboratorio y los bioensayos, las que fueron obtenidas desde inmediaciones de las localidades de Huerta Huaraya y Capujra, al interior de la Reserva Nacional del Titicaca, constatando previamente que en dicha zona del lago no existen indicios importantes de contaminación.

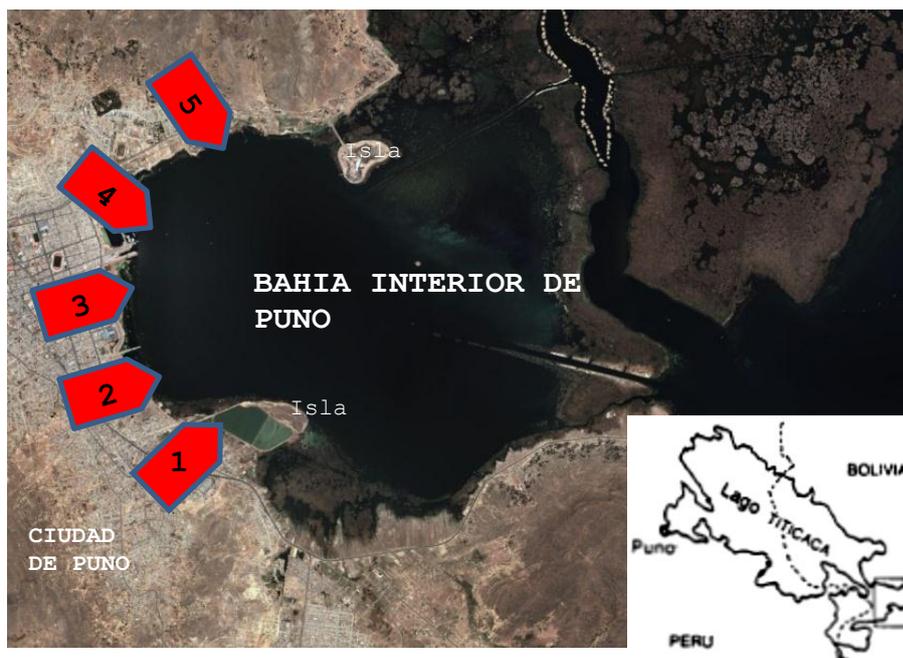


Figura 8. Lugares de muestreo de efluentes de aguas residuales en la bahía interior de Puno. 1: Laguna de oxidación Espinar, 2) Jr. 3 de Octubre, 3) Jr. Ricardo Palma, 4) Barrio Vallecito, 5) Barrio San José – Ciudad Universitaria, durante los meses de Julio y agosto. Fuente imagen: Google earth, 2016.

Fase de laboratorio. Los estudios de esta fase se realizaron en el Laboratorio de Ecología Acuática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA Puno, donde se llevaron a cabo las crianzas de *hyalellas* bajo condiciones controladas para su uso en las pruebas ecotoxicológicas y los correspondientes bioensayos de toxicidad de las aguas residuales colectadas en la fase de campo.

3.2. TIPO DE ESTUDIO

La fase de la factibilidad de cultivo de *Hyalella* en laboratorio y la caracterización fisicoquímica de las aguas residuales son descriptivos, comparativos y experimentales. Los bioensayos para determinar la toxicidad de esas aguas son de tipo experimental comparativo.

3.3. POBLACIÓN YMUESTRA

La población consistió en las aguas residuales que ingresan directamente a la bahía interior procedentes de la ciudad de Puno; constituyen las descargas efluentes desde las viviendas urbanas y que a través del sistema de alcantarillado ingresan por diferentes vías hasta las

aguas de la bahía interior de Puno; estas vías incluyen unas 18 lugares de descarga directa hasta el lago, sin que previamente hayan pasado por un proceso de tratamiento del agua residual. La muestra se considera a las aguas residuales de los cinco lugares de muestreo que constituyen lugares representativos a todos los efluentes de ingreso directo.

3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO DE *Hyalella cuprea* (Crianza artificial)

3.4.1. Crianza masal

La crianza de *H. cuprea* se realizó adaptando la metodología para las crianzas y cultivo de *Hyalella azteca*, especie norteamericana muy utilizada en pruebas de ecotoxicología de sedimentos (March, 1981), así como para *Hyalella curvispina* de Sudamérica, de acuerdo a las referencias de Peluso (2011) y Somma *et al.* (2011).

- **Colecta:** Las hyalellas fueron colectadas de zonas sin evidencias de contaminación por aguas residuales urbanas en el lago Titicaca (Huerta Huaraya y Chucuito), a través de la extracción de macrofitas sumergidas (*Elodea* y *Myriophyllum*) y principalmente extrayendo tallos y rizomas de totora (*Schoenoplectus totora*). Estas plantas ya extraídas se colocaron mediante golpeteos sobre mantas de plástico y desde aquí con ayuda de pinzas las hyalellas fueron colectadas en tapers de plástico o bolsas de polietileno para trasladarlas luego a acuarios en el laboratorio. Además desde este mismo lugar se colectó 30 L de agua la que luego fue filtrada con un tamiz de 0.5 mm en el mismo lugar para luego llevarla también al laboratorio.
- **Colecta de macrófitas:** Se extrajeron macrófitas del mismo lugar de muestreo (*Elodea* y totora con rizomas) y colocadas en bolsas de polietileno, para llevarlas a laboratorio e integrarlas a los acuarios de cultivo de hyalellas. Para ello fueron desinfectadas previamente con una solución de azul de metileno en 5 ml/L de agua y luego enjuagadas con agua de caño a chorro.
- **Transporte:** Los ejemplares de *H. cuprea* colectados fueron transportados en bolsas de polietileno de 1 L de capacidad y/o tapers de plástico de 1 L, dejando un espacio de aire para el oxígeno. En cada bolsa se llevaron entre 100 y 200 individuos, las que luego fueron colocadas en un cooler a temperatura ambiente.
- **Características y preparación del acuario:** Se utilizaron dos acuarios de vidrio de 40 L cada uno, arena lavada y desinfectada como sustrato adquirido en tiendas de acuariofilia (1 kg/acuario) y aireadores instalados en la parte inferior del acuario con filtro y difusor con reguladores de flujo de aire. Se agregó 15 L de agua de caño

decolorada por 10 minutos, más 15 L de agua del lugar de colecta; luego se acondicionaron algunas matas de tallos con rizoma de totora y plantas de elodea en el sustrato.

Las condiciones ambientales del acuario se trataron de controlar para estandarizarlas en:

- Temperatura: que no baje los 5°C y no supere los 18°C. Para ello se colocó un termómetro ambiental en el acuario, registrándose por la mañana y en la tarde.
- pH del agua: 7.5 – 8.5. Se realizaron mediciones semanalmente con un potenciómetro digital.
- Foto período de 12 horas luz y 12 noche.
- Recambio de agua: se extrajo diariamente 2 L de agua del acuario, adicionando luego 2 L de agua de caño decolorada.

La temperatura y pH se midió mediante multiparámetro marca YSI 550 A.

- **Transferencia de animales colectados al acuario:** Se colocó individuos en abundancia, sin un control estricto de densidad, sin embargo se calcula unos 400 a 600 individuos de *H. cuprea* dentro de cada acuario mediante pipetas plásticas de boca ancha filtrando agua con los animales en tamices pequeños de 1 mm de malla, evitando incluir otras especies particularmente predadores y competidores (coleópteros, odonatos y caracoles). Se aseguró no introducir otras especies del mismo género y para diferenciarlos se constató con ayuda de una lupa 40x, que los individuos no presenten armazón con espinas (sinapomorfía de *H. cuprea*).
- **Relación sexual:** Del acuario semanalmente durante un mes se extrajeron 10 individuos adultos y se verificó su sexo. A partir de ello se obtuvo el promedio general de la relación hembra: macho. La diferencia entre hembra y macho es el gnatopodio (los dos primeros apéndices) mucho más desarrollado en el macho.
- **Alimentación:** Se suministró algunos tipos de alimento *ad libitum* para la alimentación de hyalellas criadas en acuario bajo condiciones de laboratorio, estos consistieron en: alimento en escamas para peces ornamentales, alimento para truchas en pelets, hojas de lechuga, migas de pan y perifiton adheridos en portaobjetos. Al disponer estos tipos alimento individualmente en los acuarios se describió cualitativamente el nivel de aceptación desde el primer día, luego al tercer día y al quinto día; cuando al colocar cada tipo de alimento en el acuario los organismos confluían con rapidez a este y en un número mayor a 10 individuos se consideró como muy aceptable y se registró como (+++), si se acercaban entre 5 y 9 individuos se consideró como aceptable registrándose como (++) y si se acercaba menos de 5 individuos como poco aceptable registrándose con (+) y si no se acercaba ninguno o se acercaban y rehuían se registró como (-).

- 3.4.2. Crianza para determinar capacidad productiva

Obtención de neonatos y determinación del ciclo de cultivo. Para esto nos basamos en las metodologías establecidas por Call *et al.* (1994), Peluso (2011) y Somma *et al.* (2011):

- En tres (03) frascos de 3 L de capacidad se colocaron 10 parejas en amplexo separadas de los acuarios en 2 L de agua de caño de clorada, con un retazo de tela tul en el fondo (10 cm x 10 cm) como sustrato y refugio, con un recambio parcial de agua semanalmente (20%). En cada frasco se colocaron unos tallitos de *Elodea* y/o *Myriophyllum*.
- Se proporcionó 2 g del alimento que tuvo mayor preferencia en el acuario mayor (alimento para peces en escamas), cada tres días. Al cabo de este tiempo se retiró el sobrante con una bombilla de absorción y se repuso con la misma cantidad de alimento nuevo. Si antes de ese tiempo se observa que acabaron la comida se le aumentó 1gr adicional. Además eventualmente se adicionó porciones pequeñas de hojas de lechuga y algunos portaobjetos con perifiton (que contenía principalmente clorofitas y bacilariofitas).
- Las condiciones ambientales fueron las mismas que para las acondicionadas en los acuarios grandes. Además a uno de los frascos se le acondicionó un termómetro registrando también su temperatura mañana y tarde. No se les administró aireación.

Evaluaciones biológicas

- Diariamente se registró, a partir de las 10 parejas de *H. cuprea*, el número de individuos muertos y la supervivencia en cada frasco, además se verificó mediante conteos el número de crías que aparecen paulatinamente. Cuando aparecían individuos muertos, estos se reemplazaban por otra pareja en amplexo desde el acuario mayor.
- Cuando los recipientes ya contenían neonatos se procede a su separación haciendo pasar todo el contenido por un colador de 2 mm de malla, donde quedarán retenidos los adultos que se devolverán al acuario mayor. Se registró el día en que aparecieron los neonatos.
- Los neonatos serán regresados a los frascos de tres litros y diariamente se extraerán 9 de ellos para medirlos con calibrador digital (3 de cada frasco) hasta que alcancen el estado adulto (>4 mm), registrándose el día en que se logra ello.

Según estos resultados se clasificó y separó las hyalellas verificando lo establecido por Lopretto (1983) *op cit.* Peluso (2011) para *H. pampeana*: anfiditos (<3 mm), estado pre reproductivo (3 – 4 mm) y adultos (>4 mm).

3.4.3. Análisis estadístico

Para este objetivo se utilizó principalmente estadística descriptiva, que incluye medias, rangos, errores estándar y coeficientes de variabilidad. Esto se aplicó para el número de días en los que nacen los neonatos, el número de días que alcanzan a la madurez y para la estimación del potencial productivo de este anfípodo. Para determinar el tipo de alimento más aceptado se realizó una prueba de Kruskal Wallis, entre los 4 tipos de alimento, basado en los conteos del número de individuos que tenía aglomerado cada uno, durante tres días. Para determinar la temperatura adecuada de supervivencia de las hyalellas se realizó una regresión lineal entre el número de individuos muertos cada día y la temperatura media registrada ese día. Para ello se dispuso los frascos con las parejas de hyalellas en ambientes que mantenían diferentes amplitudes de temperaturas, desde 5°C hasta 20°C.

3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

Se determinaron algunos parámetros fisicoquímicos de los cinco puntos de muestreo como variables complementarias y factores de la calidad del agua que permita compararlos con los resultados de los bioensayos, (como indicador de la calidad del ecosistema), siendo estos y su metodología de evaluación los siguientes:

- pH: mediante potenciómetro digital (YSI, 550 A; modelo 096100027)
- Oxígeno disuelto (OD): mediante multiparámetro digital y Winkler.(YSI, 550 A; modelo 096100027)
- Conductividad: mediante conductímetro digital (Thermo Scientific – Orion 3 star)
- Temperatura: mediante termómetro digital (YSI, 550 A; modelo 096100027)
- DBO₅: la demanda bioquímica de oxígeno mediante incubación por 5 días, a 20°C.
- Sólidos totales (ST): por filtración y gravimetría
- Sólidos disueltos totales (TDS): mediante equipo multiparámetro digital.(YSI, 550 A; modelo 096100027)
- Salinidad: Mediante equipo multiparámetro digital.(YSI, 550 A; modelo 096100027)

El pH, OD y temperatura se determinaron *in situ* durante los muestreos de aguas, todos los demás se realizaron en laboratorios del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), Puno, incluyendo además el OD. Estos datos fueron sometidos a un análisis de correlación Spearman, entre ellos y con los resultados de los bioensayos ecotoxicológicos.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀ / UTas (Bioensayos en matriz acuosa)

3.6.1. Bioensayo de toxicidad aguda con tóxico de referencia

Previamente se realizó un experimento para determinar la sensibilidad y las posibilidades de uso de *H.cuprea* como organismo de prueba para bioensayos ecotoxicológicos, utilizando como tóxico de referencia al cloruro de sodio (NaCl). Para ello se prepararon concentraciones de este compuesto a partir de 35 g/L (concentración aproximada del agua de mar), luego en 25, 17, 8.75, 4.375, 2.1875, 1.0937 y un control (sin sal). Se preparó cada dosis en un envase de polietileno de 250 mL de capacidad utilizando cinco (05) repeticiones por dosis y se evaluó la mortalidad en porcentaje a las 48 horas. Luego estos datos se procesaron con el Programa Infostata (versión estudiantil) aplicando el diseños de regresión estadística Probit, para calcular la concentración letal media (CL₅₀), además que se estimó este dato mediante el método gráfico para evidenciar las tendencias de mortalidad del anfípodo. Luego se utilizó una regresión cuadrática para conocer la ecuación que define la curva y el nivel de asociación de las variables concentración y mortalidad.

3.6.2. Diseño del experimento con aguas residuales

Los ensayos de toxicidad se realizaron adaptando la metodología estandarizada propuesta por la Agencia Ambiental de los EEUU de Norteamérica (USEPA, 2000) para ensayos agudos en agua con *H. azteca*. Los ensayos de toxicidad en matriz acuosa fue hasta un tiempo de exposición de 96 horas, en condiciones estáticas, a temperatura (14 ± 3 °C) y Foto período (12/12 h luz/oscuridad) estables. El agua de dilución utilizada procedió de la red de servicio doméstico, previamente declorada con Tiosulfato de Sodio (Na₂S₂O₃) (2 gotas/L) y moderadamente dura (pH 7.4-7.8; dureza CaCO₃, mayor a 150 ppm).

Para los bioensayos, como unidad experimental, se utilizó envases transparentes de polipropileno de 250 ml de capacidad. Se realizaron tres réplicas de bioensayos por cada punto de muestreo durante meses diferentes (agosto, octubre y diciembre) y 3 repeticiones por concentración (dosis) para cada bioensayo. En cada unidad experimental se agregó 200 mL de solución con diferentes concentraciones, agregando luego 10 individuos de *H. cuprea* a cada uno. Estos organismos fueron seleccionados de los cultivos anticipadamente y alimentados de la misma forma que en los cultivos, eligiéndose aquellos que tuvieron tamaños menores a 3 mm de longitud (de entre 15 a 20 días de edad). Se selecciona dicho intervalo de edad para ensayos agudos (96 horas), debido a una relación favorable entre la facilidad de manipulación y sensibilidad de los individuos en este estadio; además, al ser ensayos de corta duración, durante la prueba no se evidencian amplexos. Los anfípodos

fueron manipulados, colectados y seleccionados para los bioensayos con pipeta plástica. Se determinó el pH, oxígeno disuelto y conductividad del agua de algunos de los recipientes seleccionados al azar, tanto al tiempo inicial como final de exposición. La mortalidad se monitoreó cada 24 horas hasta las 96 horas; aunque hasta antes de las primeras 24 horas se evaluó a las 3 y 6 horas, sobre todo en las muestras con concentrado de agua residual al 100%. Las concentraciones de las aguas residuales procedentes de cada punto de muestreo fueron al 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%; además se incluyó un control sin ningún tipo de tratamiento con el agua procedente de los cultivos en acuario. Previo a esto se realizaron pruebas piloto sin repeticiones para establecer estas concentraciones y se realizaron bioensayos con tres repeticiones con un tóxico de referencia, en este caso Cloruro de Sodio (NaCl) para asegurar la sensibilidad de las hyalellas en concentraciones diversas y su potencial uso en pruebas ecotoxicológicas (USEPA, 2003). Como variables de respuesta se registraron el número de individuos de hyalellas muertas por cada unidad experimental, por cada repetición y tratamiento (punto de muestreo), determinándose luego el porcentaje de mortalidad en cada una de los horas indicadas.

3.6.3. Análisis estadístico

Los puntos finales a evaluar fue la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de un total de 10 individuos de *H. cuprea* colocados en cada frasco. El análisis para cada grupo de resultados obtenidos a partir de cada bioensayo y la determinación de la CL_{50} para las aguas de cada punto de muestro, fue mediante el método Probit, realizado mediante el programa SPSS 20; además se determinó también esta CL_{50} también por el método gráfico. Los límites de confianza estadísticos fueron al 95%. Se aplicó un ANVA en DCA para determinar diferencias en las CL_{50} entre puntos de muestreo y entre horas de mortalidad. Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett respectivamente. Los valores de supervivencia se transformaron angularmente previo a los análisis. Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se realizaron Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba a posteriori de Tukey ($\alpha = 0,05$) para ver diferencias entre tratamientos y Dunnett para evaluar diferencias con respecto al control. En los casos en que se observó respuesta se calcularon los valores de NOEC y LOEC. Además se determinaron la Unidades Toxicológicas Agudas (UTa) para cada punto de muestreo con la siguiente expresión matemática:

$$UTa = (1/CL_{50}) (100)$$

Donde CL_{50} es la concentración letal media.

La interpretación se obtuvo de acuerdo a la clasificación de Saldaña *et al.* (2005).

UT > 4 = muy tóxico (CE50 > 25%)

UT de 2 a 4 = Tóxico (CE50 50 – 25%)

UT 1.33 a 1.99 = Moderadamente tóxico (CE 75 – 50%)

UT < 1.33 = Ligeramente tóxico (<75%)

3.6.4. Diagrama de flujo del procedimiento de los bioensayos: Los procedimientos para la evaluación ecotoxicológica de las aguas residuales de la ciudad de Puno (5 puntos) con *H. cuprea* se muestran en la Figura 9.

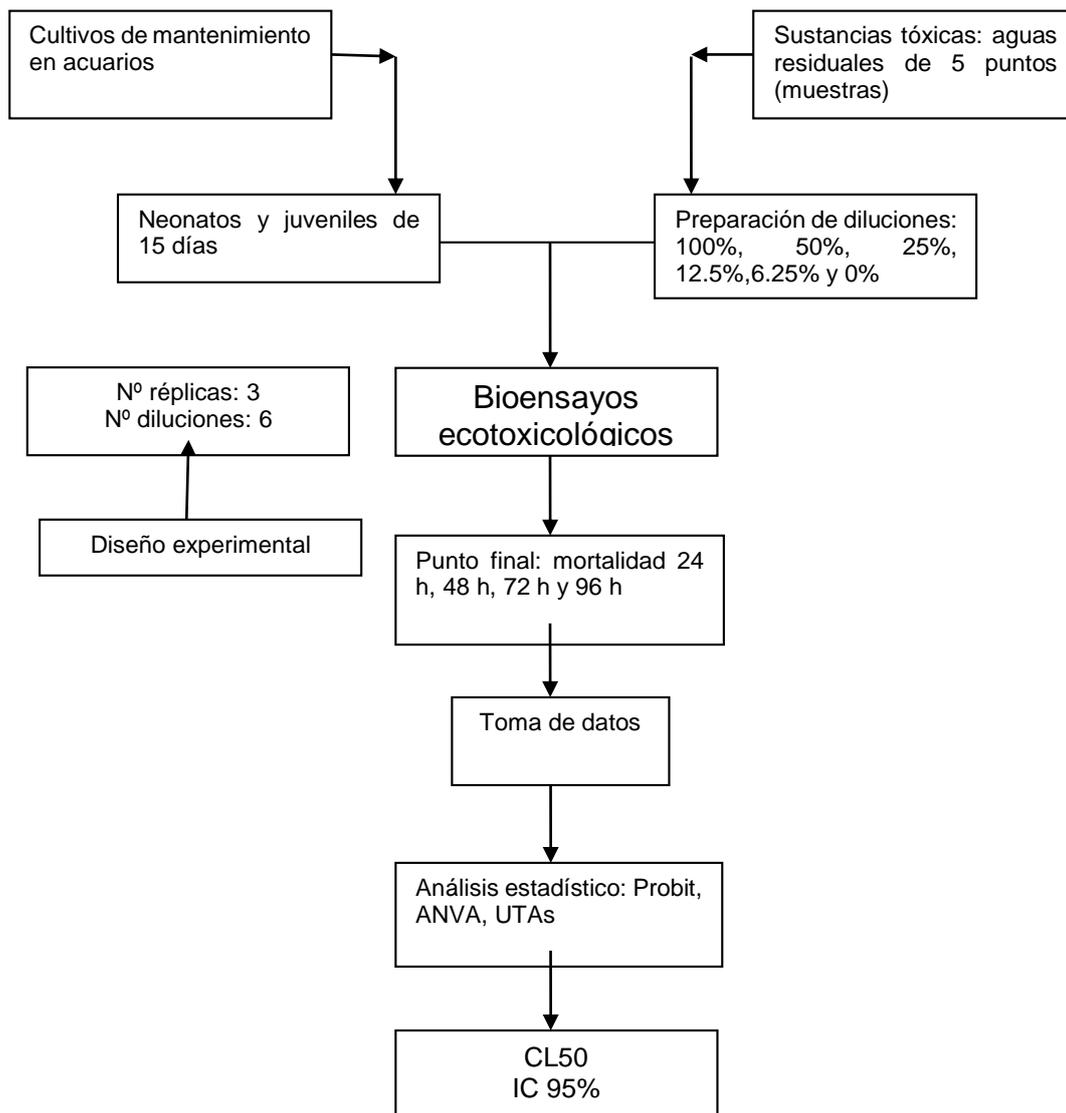


Figura 9. Diagrama de flujo de bioensayo de ecotoxicidad sobre *Hyaella cuprea*, durante los meses de agosto, Octubre y noviembre del 2016.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Validación de método de cultivo de *H. cuprea* en condiciones de laboratorio

Se han realizado ensayos de cultivo masivo de *H. cuprea* en laboratorio con la finalidad exclusiva de obtener descendientes para uso en bioensayos ecotoxicológicos y evaluaciones del estado de salud de los ecosistemas; en este caso de las aguas residuales de la ciudad de Puno que desembocan en la bahía interior de Puno. Como resultado principal en este aspecto, es que se ha logrado obtener una metodología basada en antecedentes con otras especies, con algunos alcances bioecológicos propios para esta especie nativa del Titicaca, y en general se ha logrado una técnica que permite mantenerlas y reproducirlas en condiciones de laboratorio, aunque no se ha profundizado al detalle ya que el motivo principal de esta actividad es obtener organismos que permitan asegurar un stock para los bioensayos.

4.1.1. Fuentes naturales de obtención de *H. cuprea* para bioensayos de laboratorio

Para los colectas iniciales de lotes de *H. cuprea* se ha considerado diferentes tipos de hábitats y zonas del lago Titicaca, que en apariencia no tengan indicios de contaminación, por ello los lugares de colecta con más frecuencia estuvieron ubicados en el ámbito de la Reserva Nacional del Titicaca, sector Capujra y Vizcchuni, canal Huili en inmediaciones de las islas Uros, además áreas de la Península de Chucuito. Las apreciaciones de las mejores colectas y los lugares con menor potencial se describen en la Tabla 1.

Según las experiencias de colecta, la mejor opción es el arrancado de la raíz, rizomas y pequeñas matas de totora (de unos 20 a 30 cm de diámetro) para posteriormente colocarlas en un balde o bolsa con 5 L de agua, para llevarlas a laboratorio. En laboratorio se enjuagan sacudiendo las matas en abundante agua declorada, para que los animales se dispersen en el agua; luego se saca la mata y el agua se filtra en un tamiz de 2 mm de diámetro, quedando los animales en este, para disponerlos luego a los acuarios de crianza. La mata de totora se puede lavar varias veces hasta obtener la mayor cantidad posible de *H. cuprea*.

Tabla 1. Hábitats y zonas de colecta de *H. cuprea* para su crianza en laboratorio con fines de uso en bioensayos y sus condiciones de viabilidad para su colecta, durante los meses de mayo a agosto del 2016.

Hábitat	Lugares de colecta	Descripción	Viabilidad de colecta
Llachales (<i>Elodea</i> y <i>Myriophyllum</i>)	Capujra, Vizcachuni, Chucuito	Se logra importantes cantidades de <i>H. cuprea</i> , aunque con cierta dificultad para colectarlas, ya que se hace con pinza uno a uno; contienen generalmente adultos.	Regular
Totora	Capujra, Canal Huili, Chulluni, Chucuito.	Los trozos de rizomas, raíces, con su tallo aéreo, arrancado del sustrato y llevados al laboratorio contienen importantes cantidades de <i>H. cuprea</i> de diferentes edades, donde los juveniles y neonatos incluso pueden usarse en los bioensayos.	Bueno
Sustratos de jaulas de trucha.	Chucuito, Barco.	Se obtiene ingentes cantidades de <i>H. cuprea</i> , de gran tamaño (algunas casi de 1 cm), pero pocas posibilidades de adaptarse a condiciones de acuario, observándose mucha mortalidad.	Malo
Dragado en zona bentónica	Chucuito y Vizcachuni.	Se obtiene ínfimas cantidades de <i>H. cuprea</i> , y demanda demasiado esfuerzo en su colecta.	Malo

Según las experiencias de colecta, la mejor opción es el arrancando de raíz de totora (de unos 20 a 30 cm de diámetro) y colocarlas en un balde o bolsa con 5 L de agua, para llevarlas a laboratorio. En laboratorio se enjuagaron sacudiendo las matas en abundante agua de clorada, para que los animales se dispersen en el agua; luego se extrajo la mata y el agua se filtra en un tamiz de 2 mm de diámetro, quedando los animales en este, para disponerlos luego a los acuarios de crianza. La mata de totora se lavó varias veces hasta obtener la mayor cantidad posible de hyalellas.

Estudios sobre anfípodos del lago Titicaca son escasos, entre estos se encuentra el de Dejoux (1991) quien reporta que en la parte boliviana del lago (lago Mayor y Huiñaimarca)

se encuentran 11 grupos taxonómicos diferentes y todas pertenecientes a la familia Orchestidae. Para el lago Titicaca además se incluyen a *H. echinus*, *H. crawfordi* y *H. gauthieri*. De los Ríos *et al.* (2012).

4.1.2. Establecimiento y crianza en acuarios

Acuarios mayores de crianza y mantenimiento de lotes

Dos acuarios acondicionados en laboratorio fueron los nuevos hábitats receptores para las hyalellas obtenidas en campo. El agua utilizada al inicio fue del mismo lago y paulatinamente se reemplazó con agua potable de caño, previamente clorada, no teniendo ningún efecto negativo en los especímenes. Se ha observado que además de la capa de sustrato de arena en 2 cm del fondo (previamente lavado, esterilizado en autoclave y luego secado), resulta beneficioso agregar encima de la arena otra capa de materia orgánica fina la cual se obtiene al filtrar el agua de las matas de totora conjuntamente con las hyalellas y que queda en el tamiz; se hunde rápidamente, no enturbia el agua y no se descompone, además que sirve de refugio y probablemente incluye materia alimenticia para estos animales. Al acuario se le acondicionó alguna ramitas de *Elodea* y/o *Myriophyllum*, como medio de refugio y micro hábitat para los individuos, las cuales fueron cambiadas en cuanto empezaban a degradarse.

Las crianzas se han mantenido óptimamente durante 8 meses (mayo a diciembre del 2016), las limpiezas de materia residual del fondo se realizaron semanalmente mediante absorción con una manguera (0.5 cm de diámetro) por gravedad, se acondicionaron lotes adicionales de hyalellas en tres ocasiones cuando se aprecia una aparente disminución de individuos o mortalidades ocasionales. No se han hecho estimaciones cuantitativas de la abundancia, porque el objetivo fue obtener crianza masal. Esta crianza de laboratorio se asemeja a la producción de *Hyaella curvispina* en laboratorio (Somma *et al.*, 2011)

Acuarios para seguimiento de factores bioecológicos

En los frascos cuadrangulares adicionales de 3 L de capacidad se realizó el seguimiento de algunas características bioecológicas de *H. cuprea*; tuvieron las mismas características ambientales y condiciones fisicoquímicas que el agua de los acuarios mayores, aunque como sustrato se utilizó un pedazo de tul negro sintético como refugio. En estas se incluyeron parejas en amplexo para observar su reproducción, aunque fue complicado su mantenimiento porque inicialmente eran frecuentes las mortandades. Inicialmente se

asumió que era por la falta de oxígeno, así que se le colocaron aireadores, pero tampoco. Sin embargo parece ser que esto estuvo relacionado con temperatura; por tratarse de masa de agua pequeña los cambios de temperatura son bruscos y parece ser que esto propicia un shock térmico en los animales, por lo que se consideró colocar estos acuarios en lugares con menos temperatura y colocarlos dentro de bandejas con hielo, sobre todo en horas de la tarde. Así se pudo lograr la reproducción y seguimiento de algunas parejas sexuales.

4.1.3. Condiciones ambientales y fisicoquímicas de los acuarios

Se ha podido constatar que los factores fisicoquímicos más cruciales para el establecimiento de hyalellas en acuarios es la temperatura y la transparencia del agua. En cuanto al primer factor, se ha logrado determinar que a esta especie le cuesta sobrevivir a temperaturas superiores a 18 °C y mucho más cuando hay fluctuaciones térmicas muy bruscas, colapsan por shocks térmicos, por ello es importante mantenerlas entre 8°C y 18°C como máximo y se ha constatado efectivamente que si estas temperaturas pasan los 18°C puede morir toda la población del acuario en segundos. La Tabla 2 muestra los valores de temperatura evaluados en dos épocas.

Tabla 2. Valores de temperatura del agua en acuarios dentro de condiciones de laboratorio, durante los meses de mayo a diciembre del 2016.

Época	Temperatura mañana (8.00 am) (°C)		Temperatura tarde (3.00 pm) (°C)	
	Máxima ± EE	Mínima ± EE	Máxima ± EE	Mínima ± EE
Fría (mayo, junio, julio, agosto)	8°C ± 2.3	5°C ± 1.1	13°C ± 3.4	11°C ± 2.5
Templada (setiembre, octubre, noviembre, diciembre)	12°C ± 1.4	9°C ± 1.3	17°C ± 3.3	15°C ± 1.8
Valores extremos sin mantenimiento	15°C	3°C	23°C	4°C

Los valores extremos constituyen aquellas únicas temperaturas más bajas o más altas en toda la evaluación, apreciándose valores de hasta 23°C que conlleva a la muerte de *H. cuprea* por shock térmico, si no se evita esta condición, por ello los acuarios de 3 L se colocaron sobre bandejas con hielo cuando le temperatura subía y los acuarios grandes fueron trasladados a un ambiente más frío. Sin embargo, en *Hyalella azteca* se encuentra alta resistencia a temperatura entre 9 – 20°C (Peluso, 2011)

Otro factor determinante en el acuario fue el enturbiamiento del agua por el exceso de alimento o materia orgánica en descomposición que disminuye la transparencia del agua y le da una apariencia lechosa probablemente propicie eventos bioquímicos nocivos para estos crustáceos en el medio acuático provocando muertes masivas. Por ello la importancia de la limpieza constante de los restos del fondo.

Los demás factores fisicoquímicos y ambientales en que se mantuvieron el acuario y su agua fueron casi constantes y no tuvieron fuerte influencia en el desarrollo de las poblaciones de hyalellas. Estos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Rangos de características ambientales en los que se mantuvieron viables individuos de *H. cuprea* en acuarios, durante los meses de mayo a diciembre 2016.

Factor ambiental	Valor en rango
pH del agua	7.5 – 8
Conductividad (mS/cm)	480 – 610
Oxígeno disuelto (mg/L)	>4.5
Temperatura (°C)	10 – 18
Dureza (mg/L)	295 – 375
Foto período (horas luz/oscuridad)	12 / 12

Peluso, 2011; indica que *Hyalella azteca*, al igual *H. cuprea* es tolerante a un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno disuelto, alcalinidad, salinidad.

4.1.4. Alimentación

Durante las crías de *H. cuprea* se les ha proporcionado tipos de alimentos de fácil obtención para su mantenimiento en condiciones de acuario y en general los alimentos mejor aceptados y con mayores posibilidades de uso por su facilidad de obtención fueron alimento para peces ornamentales en escamas y hojas de lechuga, además que estos no se descomponen con facilidad y mantiene adecuada la calidad del agua para los anfípodos, lo cual también es concordante con lo manifestado por Somma *et al* (2011) quienes recomiendan en las crías de *H. curvispina* balanceado en escamas para peces de agua fría. Las migas de pan fueron también muy aceptadas inmediatamente pero la desventaja es que sufren rápida putrefacción y enturbian el agua, lo que ocasionó posteriormente fuertes mortalidades de los individuos (de hasta un 80%). Las características de estos alimentos evaluados se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Tipos de alimentos evaluados cualitativamente en el cultivo de *H. cuprea* en laboratorio, durante los meses de mayo a diciembre 2016.

Tipo de alimento	Nivel de aceptación	Evaluación del alimento (ventajas y desventajas)
Alimento para peces en escamas	+++	Muy buena aceptación, se recomienda limpiar los residuos a los 3 días de colocado el alimento.
Alimento para truchas en pellets	+	Poca aceptación, tiende a enturbiar el agua y descomponerse con facilidad.
Migas de pan	+++	Muy buena aceptación pero rápidamente provoca el enturbiamiento del agua, probablemente por su rápida descomposición y proliferación de hongos.
Hojas de lechuga	++	Regular aceptación, eventualmente consumido y con la ventaja de no descomponerse con rapidez.
Perifiton en portaobjetos	++	Regular aceptación, con la desventaja de tener que mantener su cultivo en acuarios adicionales.

En los cuerpos de agua el género *Hyaletta* se alimenta de detritos cumpliendo con la función de detritívoros e incluso de depredadores con respecto a otros pequeños organismos (zooplankton, larvas de quironómidos), según Dejoux (1991).

4.1.5. Algunas características bioecológicas de *H. cuprea*

Un resumen de las características bioecológicas más importantes de *H. cuprea* en condiciones de laboratorio, se detalla en la Tabla 5. Durante las crías de *H. cuprea* se ha determinado una proporción sexual de hembra: macho en 1:1.6, obteniéndose relativamente algo más de machos que hembras y la duración del amplexus al momento de su reproducción en 2.6 días; al respecto García – Gonzales y Souto (1987) mencionan que esta falsa cópula puede demandar varios días, pero no especifica cuantos, en este caso para *H. curvispina*. En cuanto a su potencial de fecundidad se ha estimado para *H. cuprea* que por cada hembra después del amplexus se produce un promedio de 8.8 huevos, los cuales se incuban en su marsupio hasta su eclosión, coincidiendo con lo manifestado por Lopretto (1983). Otros autores como Casset *et al.* (2001) y Somma *et al.* (2011) indican que *H. curvispina* produce entre 8 a 15 crías por hembra; sin embargo Lopretto (1983) para *H. pampeana* menciona que pueden producir entre 15 y 40 crías por hembra, obviamente estas diferencias radican en que se tratan de especies diferentes que

habitan en ambientes diferentes. El crecimiento de *H. cuprea* luego de nacidas las crías es relativamente lento, ya que a los 10 días apenas superan 1 mm de longitud, a los 20 días alcanzaron un promedio de 2.32 mm y a los 30 días los 3.46 mm en promedio y ya tienen la capacidad de realizar amplexus, es decir ya son maduros sexualmente, a los 45 días de edad, cuando alcanzan los 4 mm de longitud. Esto es similar con lo hallado por otros autores para otras especies como *H. pampeana* que miden 1.79 mm a los 10 días y a los 20 días superan los 3 mm y a los 80 días alcanzan unos 6 mm (Lopretto, 1983).

Tabla 5. Algunas características bioecológicas de *H. cuprea* mantenidas en acuarios en condiciones de laboratorio, durante los meses de mayo a diciembre del 2016.

Característica bioecológica	Repetición					Promedio	ES (±)
	1	2	3	4	5		
Duración de amplexus (Nº días)	2	3	4	2	2	2.6	0.39
Proporción sexual (hembra: macho)	1:1	1:2	1:1	1:2	1:2	1:1.6	
Huevos (crías)/hembra (Nº)	7	8	9	11	9	8.8	0.66
Longitud a los 10 días de nacido (mm)	1.5	1.6	1.7	1.4	1.6	1.56	0.05
Longitud 20 días de nacido (mm)	2	2.3	2.5	2.7	2.1	2.32	0.13
Longitud 30 días nacido (mm)	3.2	3.5	3.6	3.7	3.3	3.46	0.09
Edad primer amplexus (días)	40	39	45	51	55	45	3.09

El primer estadio, neonatos o también denominado anfiboditos ocurre entre los cero y 20 días, teniendo una longitud de 1.5 a 3 mm, siendo estos los utilizados para las pruebas ecotoxicológicas, según lo recomendado por USEPA (2002). Luego el estadio de juvenil entre los 21 y 35 días, donde alcanzan un tamaño de 3.1 a 4 mm, coincidiendo similarmente con lo reportado por Peluso (2011) quien refiere que *H. curvispina* alcanza los 3 a 4 mm entre los 20 y 30 días de edad; finalmente el estadio de adulto cuando los individuos de *H. cuprea* son mayores a 4 mm de longitud y tienen más de 36 días de vida (Tabla 6).

Tabla 6. Estadios de desarrollo más representativo de *H. cuprea* mantenidas en acuarios en condiciones de laboratorio, durante los meses mayo a diciembre 2016.

Estadio de desarrollo	Longitud (mm)	Nº días
Neonatos (anfiboditos)	1.5 – 3	0 – 20
Juveniles	3.1 – 4	21 – 35
Adultos	> 4	> 36

4.2. Características fisicoquímicas de efluentes de aguas residuales de la ciudad de Puno.

Los puntos evaluados corresponden a cauces de aguas residuales de la ciudad de Puno que ingresan directamente hacia la bahía interior de Puno, en el lago Titicaca, a excepción del Punto 1 (Planta Espinar) cuyas aguas se dirigen previamente a una laguna de oxidación cuyo tratamiento es deficiente en la actualidad. En general, la mayoría de estas características evaluadas evidencia niveles que no concuerdan con los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos para efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM) y menos con los Estándares de Calidad Ambiental (ECAs) del Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM. Ello pone en evidencia que efectivamente las aguas residuales de la ciudad de Puno son una continua amenaza para la integridad del ecosistema de la bahía interior de Puno y para el lago Titicaca en general, repercutiendo además como un peligro para la salud pública y afectando diversas actividades económicas de importancia para el desarrollo regional. Los detalles de estos resultados se muestran en la Tabla 7 y se pueden confrontar con los valores que establecen las mencionadas normas en los Anexos.

Tabla 7. Algunos parámetros fisicoquímicos de cinco efluentes de aguas residuales procedentes de la ciudad de Puno, en su valor promedio \pm error estándar, durante los meses de agosto a diciembre del 2016.

PUNTO MUESTREO	Valores promedio \pm error estándar				
	OD (mg/L)	pH	Conductividad (uS/cm)	TDS (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)
Planta Espinar	1.22 \pm 0.20	7.36 \pm 0.13	2165 \pm 19.06	1236.5 \pm 160.98	409.84 \pm 11.32
Jr 09 de Octubre	2.97 \pm 0,28	7.73 \pm 0.30	1659 \pm 49.15	949 \pm 144.43	60,50 \pm 10.41
HRMNB	0.88 \pm 0.16	7.10 \pm 0.12	1459 \pm 231.69	815 \pm 30.09	55.32 \pm 5.10
Vallecito	2.43 \pm 0.35	7.55 \pm 0.33	961 \pm 245.73	530.5 \pm 72.72	70.42 \pm 29.91
San José UNA	2.58 \pm 0.13	7.65 \pm 0.20	1467 \pm 95.28	842.5 \pm 156.97	40.21 \pm 20.19

LMP (DS 003-2010-MINAM): pH= 6.5 – 8.5; DBO₅ = 100 mg/L

ECAs (DS 015-2015-MINAM): OD > 5 mg/L; pH = 6.5 – 9; Conductividad = 1000 uS/cm; TDS = < 25 mg/L; DBO₅ = 5 mg/L

La Figura 10 muestran que a la laguna de oxidación de la planta Espinar ingresa un volumen promedio de 335 L/s de aguas residuales, pudiendo variar desde 200 a más de 400 L/s, dependiendo de la hora y de la época; ello nos permite estimar que a diario podría estar ingresando más de 28 millones de litros o su equivalente a 28 mil metros cúbicos de aguas contaminadas sólo desde este punto, con las consiguientes consecuencias para el

medio ambiente acuático de esta parte del lago Titicaca. En 1984 se determinó esta misma descarga en 196.4 L/seg (Pacoricona *et al.*, 1991); luego para el año 2010 la descarga alcanzó un máximo de 246 L/seg, estimándose que para el año 2020 se superaría los 346 L/seg (EMSA Puno, 2007) sólo como ingresos a la laguna de oxidación Espinar; sin embargo según el JICA (2000) esta planta sólo tiene una capacidad para 100 L/seg. Las estimaciones de EMSA Puno sugirieron para el 2020 superar los 300 L/seg, nuestros resultados indican que ya al año 2016 se alcanzó vastamente ese volumen.

La Figura 10 evidencia que las demás descargas de aguas residuales directamente al lago (sin pasar por la laguna de oxidación Espinar) en realidad son insignificantes comparados con la primera, pero haciendo la sumatoria en total serían 373 L/seg que ingresan a la bahía interior de Puno desde estos 5 puntos evaluados. Los caudales de estos otros puntos también variaron según el mes; así para la descarga del Jr. 9 de octubre los caudales fueron de 3 hasta 7.25 L/seg, la descarga del Jr. Ricardo Palma en inmediaciones del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón (HRMNB), fue variable también y constituye la segunda descarga importante ya que sus caudales alcanzaron los 30.9 L/seg en el mes de agosto. Las descargas del barrio Vallecito estuvieron entre 8.18 y 17.5 L/s, finalmente las aguas servidas del barrio San José (y de la UNA Puno) estuvieron entre 0.53 y 7.19 L/s.

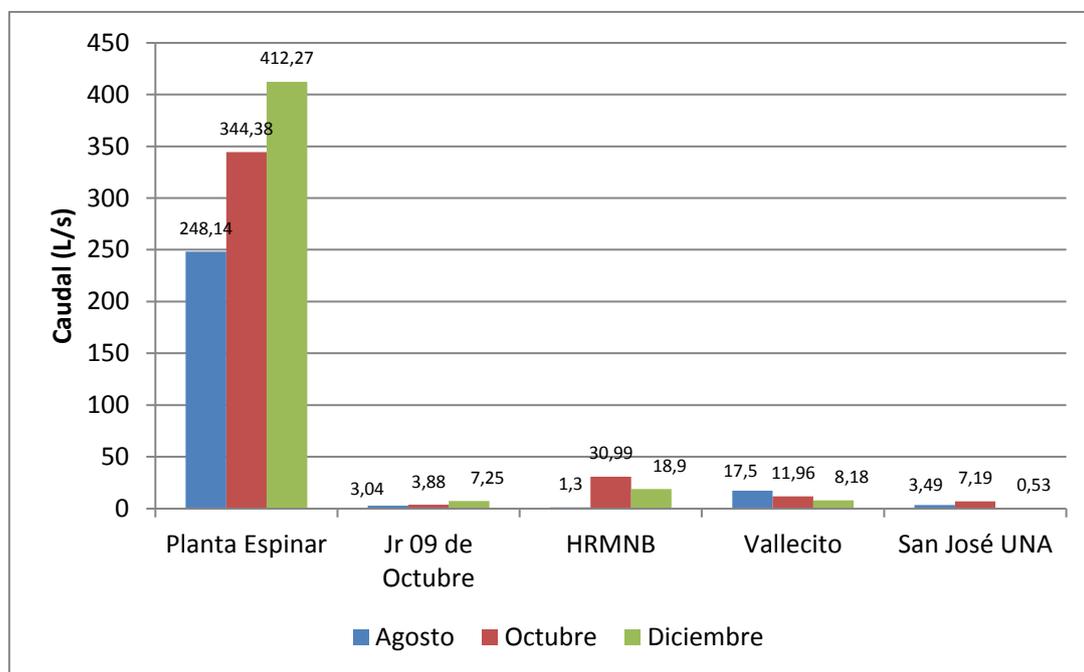


Figura 10. Volúmenes de caudales de aguas residuales que ingresan a la bahía interior de Puno a través de cinco puntos, durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.

En lo que respecta a la DBO₅, a excepción del efluente Espinar, ninguno superó los límites máximos permisibles establecidos en el DS- 003 – 2010 – MINAM para efluentes de aguas residuales tal cómo se muestra en la Figura 11. Ya que estos se encontraron en todos los meses evaluados por debajo de los 100 mg/L fijados en esta norma nacional, con lo que se puede concluir que estos efluentes de poco volumen aparentemente se encuentran en niveles que relativamente afectan la calidad del agua. Sin embargo el DBO₅ que ingresa a la laguna Espinar si supera ampliamente este valor, ya que supera los 400 mg/L en promedio durante los tres meses evaluados; ello explica un abundante ingreso y descomposición de materia orgánica, así como un elevado consumo de oxígeno por microorganismos. Al respecto DIGESA (1999) reportó que las aguas residuales que ingresan a la laguna Espinar presentan una DBO₅ de 600 mg/L y un informe de la Comisión Técnica de Gestión Ambiental de Puno (2008) refiere una DBO₅ de 393 mg/L; ambos valores son de algún modo similar a lo encontrado en este estudio, aunque las variaciones dependen en general por la hora y condiciones de muestreo, el caudal, condiciones climáticas, entre otros; pero lo evidente es que las cargas orgánicas contaminantes que ingresan a la bahía interior de Puno a través de la laguna Espinar, continúan siendo muy elevadas.

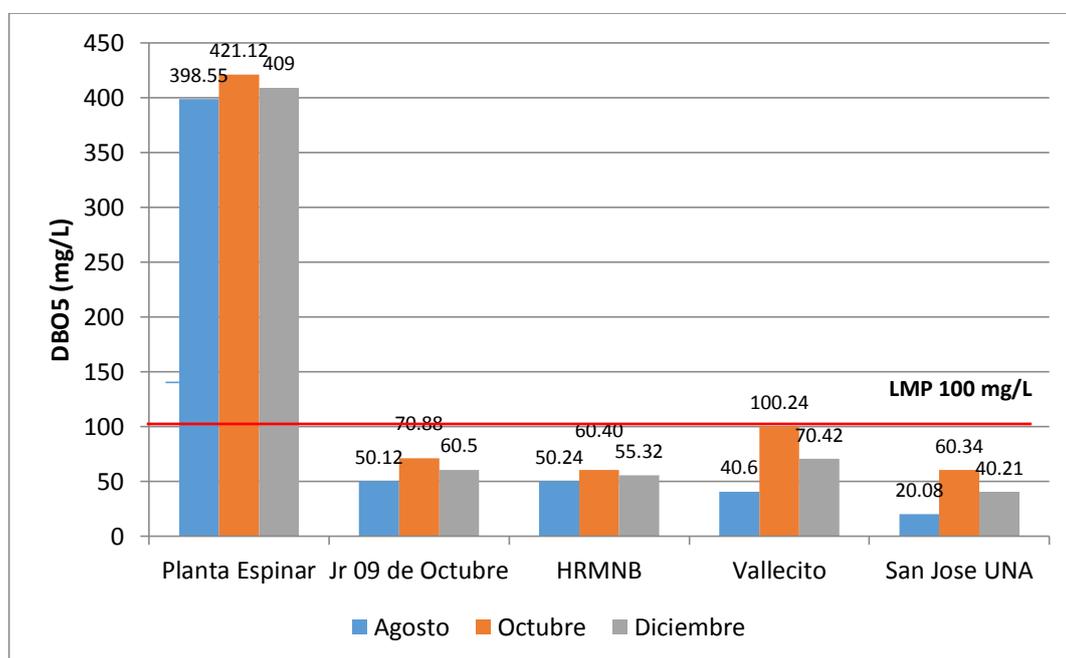


Figura 11. Niveles mensuales de DBO₅ en cinco puntos de evaluación de efluentes residuales que ingresan a la bahía interior de Puno, en referencia a los Niveles Máximos Permisibles según el DS 003 – 2010 – MINAM (agosto, octubre y diciembre, 2016).

Los pH evaluados (Figura 12) en todas estas descargas se encontraron dentro de los límites permisibles de la norma peruana para aguas residuales.

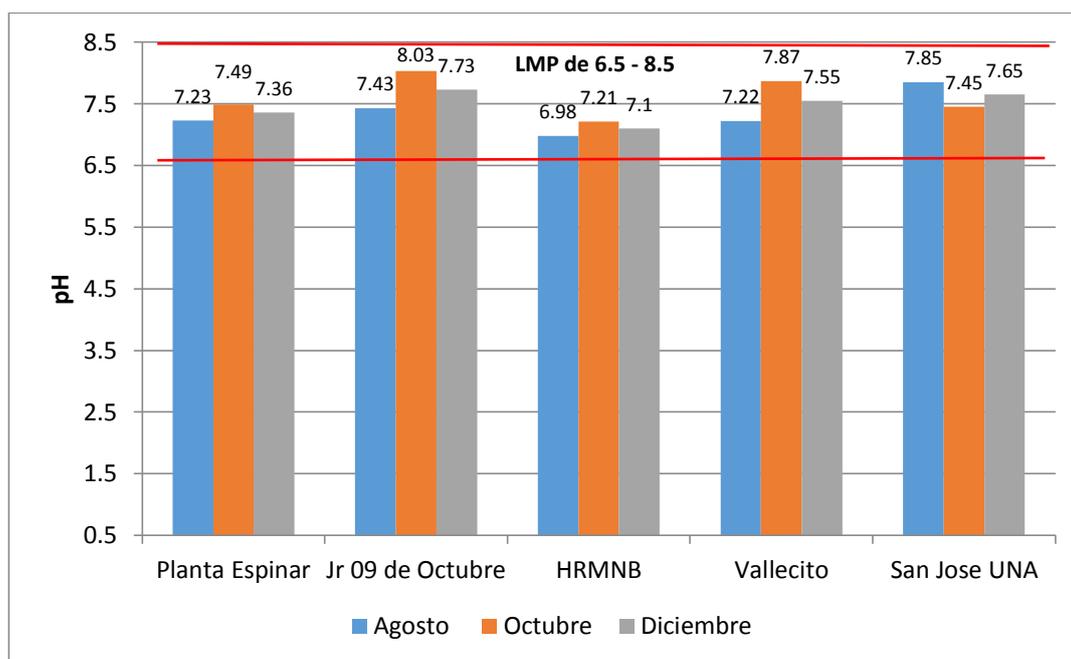


Figura 12. Valores del pH en cinco efluentes de aguas residuales de la ciudad de Puno confrontados con los límites de Niveles Máximos Permisibles según el DS 003 – 2010 – MINAM (agosto, octubre y diciembre, 2016)

Es decir no bajaron los 6.5 ni estuvieron por encima de los 8.5 en los cinco lugares y en todos los meses evaluado y más bien en todos los casos presentaron valores que oscilaron entre 6.98 y 8.03, concordando con los reportes de DIGESA (1999).

Los Parámetros fisicoquímicos como oxígeno disuelto (OD), conductividad y sólidos totales disueltos (TDS), no se incluyen como referencia en el DS 003 – 2010 – MINAM, pero son factores importantes que repercuten en la calidad de los ecosistemas acuáticos y contribuyen en disminuir la calidad de las aguas. Por ello estos valores se comparan con los Estándares de Calidad Ambiental (DS 015 – 2015 – MINAM), que si los considera como referencia para la calidad en la Categoría 4 (Conservación del medio ambiente acuático); según ello todos los valores de OD encontrados en nuestra evaluación no alcanzan los ECAs los 5 mg/L establecidos para lagos y lagunas, similarmente los niveles de conductividad en todos los puntos de muestreo los 1000 uS/cm referenciales, lo que indica la alta probabilidad de que estas aguas puedan contener altas cantidades de sales, minerales e incluso metales pesados; y en cuanto a los niveles de TDS estos fueron ampliamente superiores a los 15 mg/L establecidos, lo que sugiere además que traen consigo abundante materia orgánica e inorgánica. El reporte de DIGESA (1999) refiere que los afluentes de las aguas residuales de la ciudad de Puno que ingresan a la laguna Espinar contienen cero de oxígeno disuelto y al llegar a la laguna secundaria apenas alcanzan 1.60 mg/L, lo cual también es relativamente concordante con los resultados hallados en este

estudio. En cuanto a los sólidos disueltos totales, los efluentes al ingresar a la laguna Espinar tuvieron un promedio de 1236.5 mg/L, las evaluaciones de DIGESA (1999) refieren 1488 mg/L y si los comparamos con los valores de los ECAs, estos no deberían ser mayores a 25 mg/L (Tabla 7).

4.3. Determinaciones ecotoxicológicas de las aguas residuales mediante bioensayos con *Hyalella cuprea*.

Las características fisicoquímicas evaluadas de los cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad de Puno hacia la bahía interior, demostraron que para los LMP de la norma utilizada para comparar en estos casos, todos los efluentes residuales, a excepción de Espinar, están dentro de lo establecido en cuanto a pH y DBO5. Pero además los parámetros adicionales nos ayudaron a caracterizar fisicoquímicamente estas aguas y concluir que definitivamente en la mayoría de parámetros las cargas contaminantes son un riesgo permanente para el ecosistema de la bahía interior de Puno.

Sin embargo, es necesario establecer si las características de estas aguas tienen además algún nivel de ecotoxicidad, lo que sería un riesgo mayor para el ecosistema y para la integridad de sus componentes bióticos, e incluso para la salud pública, lo cual se ha evaluado en el presente acápite.

4.3.1. Prueba de sensibilidad con NaCl como tóxico de referencia

Con la finalidad de comprobar si los especímenes de *H. cuprea* son sensibles para responder a diferentes compuestos tóxicos, primeramente se realizó bioensayos utilizando como tóxico de referencia al Cloruro de Sodio (NaCl). Los resultados indican que las respuestas para toxicidad aguda, teniendo como punto final el porcentaje de mortalidad, para *H. cuprea* demostraron una adecuada sensibilidad a las diferentes concentraciones, lo que ratificó sus posibilidades potenciales de utilizarlas como indicador de mediciones de toxicidad aguda con otros compuestos tóxicos, entre los que figuran las aguas residuales.

Los resultados del análisis toxicológico con la regresión Probit se muestran en la Tabla 8, determinándose la CL₅₀ en 12.97 g/L, con un intervalo de confianza al 95% de 14.9 y 14.81; es decir con esa cantidad de NaCl se causará la mortalidad del 50% de individuos de *H. cuprea*.

Tabla 8. Resumen de la prueba toxicológica para *H. cuprea* con NaCl como tóxico de referencia, durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.

Concentración NaCl (g/L)		Control 0	1.0937	2.1875	4.375	8.75	17	25	35
Mortalidad <i>H. cuprea</i> (%) promedio		0	3.3	0	6.7	13.3	80	100	100
PRUEBA ESTADÍSTICA PROBIT									
Intervalo de Confianza al 95%									
	Límite inferior	Límite superior	Chi-cuadrado	GL	Sig.	Unidades toxicológicas agudas (UTa)			
CL50 (g/L) 48 h	12.97	11.36	14.9	14.811	6	0.022	7.71		

USEPA (2003); realizó pruebas piloto con el tóxico de referencia, Cloruro de Sodio (NaCl) para asegurar la sensibilidad de las hyalellas en concentraciones diversas, llegando a la aprobación de su potencial uso en pruebas ecotoxicológicas.

Las tendencias del porcentaje de mortalidad (Figura 13) evidencian la sensibilidad de esta especie a las diferentes dosis del tóxico de referencia, con lo que se reafirma la posibilidad de utilización de este *H. cuprea* como biomonitor de aguas contaminadas con diferentes tóxicos. Milani *et al.*, 2003; considera a *Hyalella* como una especie muy sensible a los contaminantes ambientales Milani *et al.*, 2003).

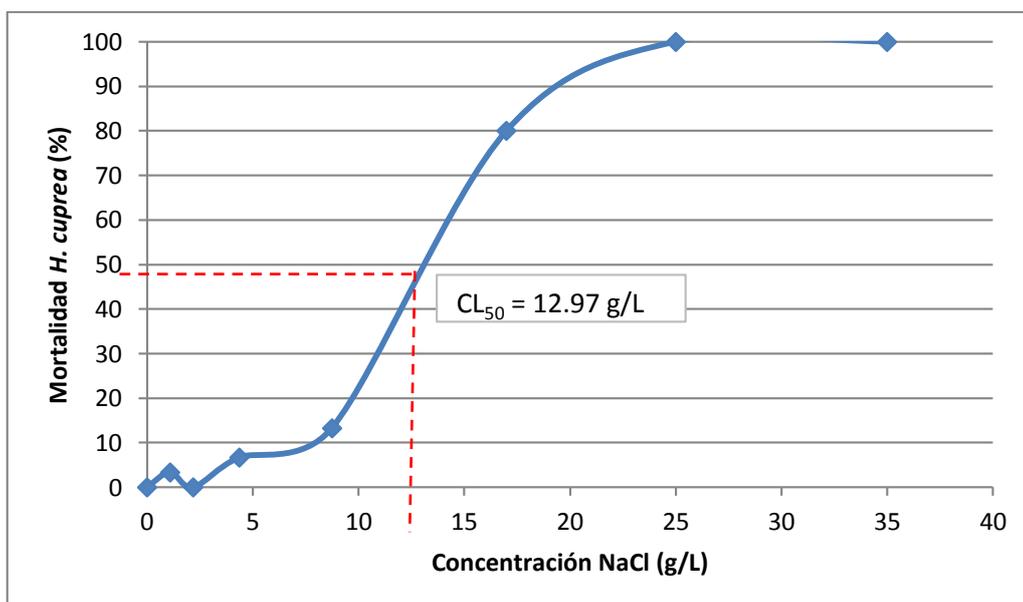


Figura 13. Mortalidad de *H. cuprea* a diferentes concentraciones de NaCl y la determinación de CL50 por el método gráfico a las 48 horas, durante de los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.

A su vez las tendencias del porcentaje de mortalidad en la curva de regresión cuadrática (Figura 14) evidencian la sensibilidad por ende la factibilidad del empleo de este anfípodo

como biomonitor de aguas contaminadas con diferentes tóxicos.

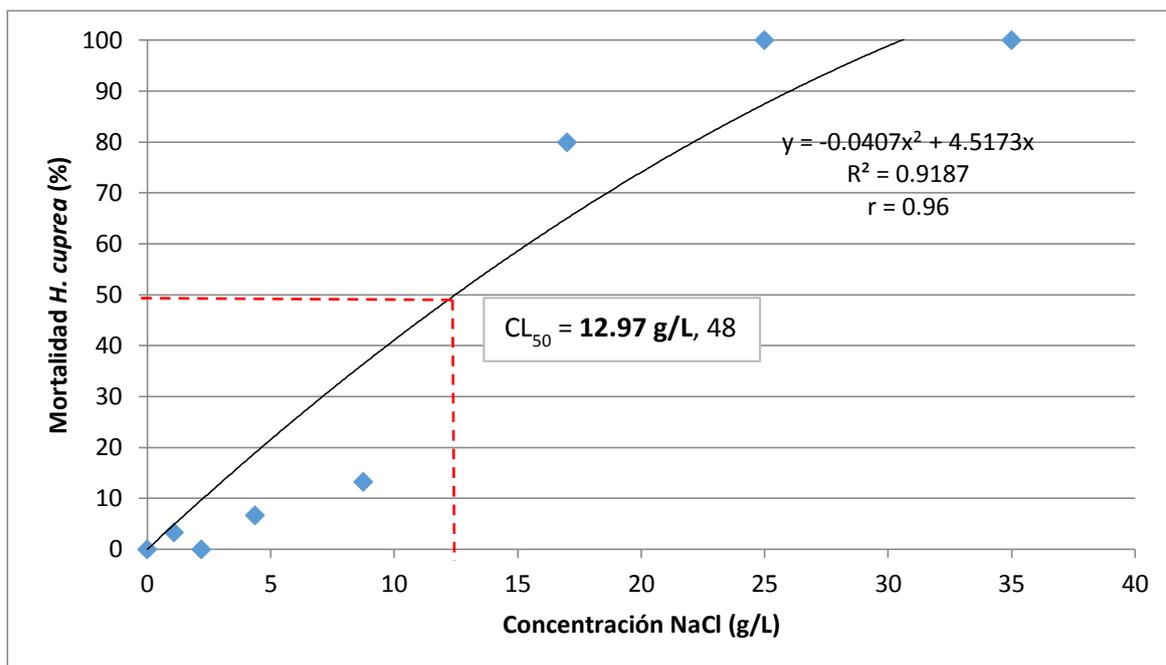


Figura 14. Curva de regresión cuadrática y ecuación entre la concentración de NaCl y la mortalidad que ocasiona en *H. cuprea*.

No se encontraron estudios en el Perú sobre el uso de cloruro de sodio como tóxico de referencia para *Hyalella* u otras especies. Las referencias al respecto provienen de otras latitudes y consideran otras especies, los detalles se discuten en la Tabla 9.

Tabla 9. Comparación de la toxicidad del NaCl en diferentes especies evaluadas, con fines de uso en pruebas ecotoxicológicas, según los siguientes autores.

Especies	Taxón	Toxicidad al C1Na (g/L)	Tiempo (horas)	Autor
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustáceo, Cladóceros	CE50 = 2.4	48	Culloch <i>et al.</i> , 1993
<i>Daphnia pulex</i>	Crustáceo, Cladóceros	CE50 = 2.4	48	Culloch <i>et al.</i> , 1993
<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo, Cladóceros	CE50 = 4.5	48	Culloch <i>et al.</i> , 1993
<i>Carassius auratus</i>	Pez, Cipriniforme	CE50 = 7.3	96	Adelman <i>et al.</i> , 1976
<i>Pimephalus</i>	Pez, Cipriniforme	CE50 = 7.3	96	Adelman <i>et al.</i>

<i>promelas</i>				<i>al.</i> , 1976
<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	Pez, Ciprinodontiforme	CE50 = 1.7	96	Arenzon <i>et al.</i> , 2003
<i>Hyalella cuprea</i>	Crustáceo, Amphípodo	CL50 = 12.9	48	Presente estudio

Se observa que la sensibilidad de las otras especies para el NaCl es mayor y resulta más tóxica para ellas, ya que la letalidad y la efectividad en causar mortalidad se logra con concentraciones mucho menores que en *H. cuprea*; sin embargo al margen de la mayor resistencia de la especie evaluada en este estudio, su sensibilidad aún es adecuada para su uso en bioensayos ecotoxicológicos.

Los ensayos de toxicidad en matriz acuosa (NaCl) propuesta por la Agencia Ambiental de los EEUU de Norteamérica (USEPA, 2000) para ensayos agudos en agua con *H. azteca*. Sugieren un tiempo de exposición de 96 horas, en condiciones estáticas; para lograr observar los resultados de sensibilidad.

4.3.2. Bioensayos ecotoxicológicos con aguas residuales sobre *Hyalella cuprea*

Los resultados de los bioensayos con *H. cuprea* fueron determinantes para la calificación de las aguas residuales que se emiten desde la ciudad de Puno, aunque en la mayoría de los casos, a excepción de la planta Espinar, esto ha variado de acuerdo al mes o época de evaluación; y es que las aguas residuales que llegan a Espinar en todas las épocas evidenciaron una muy alta toxicidad alcanzando valores de CL₅₀ desde 22.71% para el mes de octubre, 11.62% para diciembre y 9.59% para octubre, siendo este último mes el de mayor toxicidad (Tablas 10 al 12). Para el mes de agosto en general, tres efluentes tuvieron elevada toxicidad: Espinar, Jr. Ricardo Palma con CL₅₀ 15.52% y Barrio San José con CL₅₀ 9.44% (evidenciado en rojo) y con toxicidad moderada las aguas residuales del Barrio Vallecito, con CL₅₀ de 85.67% (verde) y finalmente las que desembocan desde el Jr.9 de octubre consideradas no tóxicas (amarillo) (Tabla 10).

La interpretación se obtuvo de acuerdo a la clasificación de Saldaña *et al.* (2005):

- UT > 4 = muy tóxico (CE50 > 25%;
- UT de 2 a 4 = Tóxico (CE50 50 – 25%)
- UT 1.33 a 1.99 = Moderadamente tóxico (CE 75 – 50%)
- UT < 1.33 = Ligeramente tóxico (<75%)

Tabla 10. Niveles de ecotoxicidad y CL₅₀ de cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad de Puno hacia la bahía interior de Puno para *H. cuprea*, durante el mes de agosto del 2016.

PUNTO DE MUESTREO	CL ₅₀ %	Intervalo de Confianza (95%)		UTa
		Límite inferior	Límite superior	
Espinar	22.71	15.38	35.83	4.40334654
Jr. 9 de octubre	115.7	No tóxico		0.86430424
Jr. Ricardo Palma – HRMNB	15.52	11.21	21.46	6.44329897
Barrio vallecito	85.67	60.07	168.19	1.16726976
Barrio San José – Una	9.44	1.56	21.13	10.5932203

La interpretación se obtuvo de acuerdo a la clasificación de Saldaña *et al.* (2005): **UT** > 4 = muy tóxico (CE50 > 25%; **UT** de 2 a 4 = Tóxico (CE50 50 – 25%); **UT** 1.33 a 1.99 = Moderadamente tóxico (CE 75 – 50%) **UT** < 1.33 = Ligeramente tóxico (<75%)

Con respecto al mes de octubre, los niveles de toxicidad manifestado en las CL₅₀ y los índices de toxicidad aguda (UTa) presentaron variaciones con respecto al mes de agosto, ya que en octubre sólo dos puntos de evaluación fueron determinadas como aguas muy tóxicas (rojo): las aguas residuales que desembocan en Espinar (CL₅₀ 9.59%) y del barrio San José UNA (CL₅₀ 8.85%), todos los demás efluentes resultaron no tóxicos (Tabla 11).

Tabla 11. Niveles de ecotoxicidad y CL₅₀ de cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad de Puno hacia la bahía interior de Puno para *H. cuprea*, durante el mes de octubre del 2016.

PUNTO DE MUESTREO	CL ₅₀ %	Intervalo de Confianza (95%)		UTa
		Límite inferior	Límite superior	
Espinar	9.59	8.99	10.2	10.4275287
Jr. 9 de octubre	180.19	No tóxico		0.55496975
Jr. Ricardo Palma – HRMNB	233.18	No tóxico		0.02912751
Barrio Vallecito	117.09	No tóxico		0.8540439
Barrio San José – UNA	8.85	5.76	25.53	11.299435

La interpretación se obtuvo de acuerdo a la clasificación de Saldaña *et al.* (2005): **UT** > 4 = muy tóxico (CE50 > 25%; **UT** de 2 a 4 = Tóxico (CE50 50 – 25%); **UT** 1.33 a 1.99 = Moderadamente tóxico (CE 75 – 50%) **UT** < 1.33 = Ligeramente tóxico (<75%)

Para el mes de diciembre si hubieron diferencias más considerables en la toxicidad, ya que el único punto con altos niveles de toxicidad fue el de Espinar con una CL_{50} de 11.62%, luego como aguas residuales tóxicas propiamente, resultó el procedente del Jr. Ricardo Palma – HRMNB con una CL_{50} de 33.34%, los tres restantes no se consideraron como tóxicas (Tabla 12).

Tabla 12. Niveles de ecotoxicidad y CL_{50} de cinco puntos de evacuación de aguas residuales de la ciudad de Puno hacia la bahía interior de Puno para *H. cuprea*, durante el mes de diciembre del 2016.

PUNTO DE MUESTREO	CL_{50} %	Intervalo de Confianza (95%)		Uta
		Límite inferior	Límite superior	
Espinar	11.62	9.36	15.12	8.60585198
Jr. 9 de octubre	102.92	No tóxico		0.97162845
Jr. Ricardo Palma – HRMNB	33.34	22.46	54.51	2.99940012
Barrio Vallecito	197.91	No tóxico		0.50528018
Barrio San José – UNA	133.62	No tóxico		0.74839096

La interpretación se obtuvo de acuerdo a la clasificación de Saldaña *et al.* (2005): $UT > 4$ = muy tóxico ($CE_{50} > 25\%$; UT de 2 a 4 = Tóxico ($CE_{50} 50 - 25\%$); UT 1.33 a 1.99 = Moderadamente tóxico ($CE_{75} - 50\%$) $UT < 1.33$ = Ligeramente tóxico ($< 75\%$)

Las variaciones de toxicidad en cada época evaluada, se deben principalmente a que los caudales de estos afluentes en cada momento pueden traer diferentes tipos y cantidades de tóxicos e incluso en algunos momentos y épocas pueden estar carentes de ellos, sobre todo en los puntos de muestreo donde fluye poco volumen de aguas residuales, tales como los puntos del Jr. 9 de Octubre, Barrio vallecito y Barrio San José – UNA; además también ello también depende de los niveles de los caudales, ya que cuando hay un mayor caudal los contaminantes y tóxicos pueden estar más diluidos y cuando el caudal es bajo, estos contaminantes están más concentrados y por tanto pueden ser más tóxicos. Esto último se evidencia claramente en el Punto 3 (Jr. Ricardo Palma – HRMNB), ya que justamente cuando su caudal fue mayor en el mes de octubre (30.99 L/s, Figura 10), no se encontró niveles de toxicidad importantes.

En cambio, se asume que la alta y permanente toxicidad del efluente de Espinar, se debe principalmente a que en este lugar confluye la mayor cantidad de aguas residuales producidos por los habitantes de la ciudad de Puno, que incluye aguas domésticas e incluso comerciales e industriales, alcanzando caudales de 412 L/s, conllevando una mayor probabilidad de contener variados y mayores componentes tóxicos. Además que sus

características fisicoquímicas deficientes según la normatividad, coinciden ampliamente con los altos niveles de ecotoxicidad estimados (confrontar con Tabla 7).

Otro aspecto destacable, son las características de los efluentes del barrio San José – UNA ya que en los meses de agosto y octubre evidenciaron alta toxicidad, al margen que provienen de una barrio principalmente conformado por viviendas familiares; la explicación podría estar en que estas descargas también contienen aguas residuales de la ciudad universitaria de la UNA Puno, que en su composición pueden incluirse desechos líquidos de laboratorios y residuos industriales producto de las prácticas académicas cotidianas que en su desarrollo demandan el uso de diferentes compuestos tóxicos químicos principalmente como: $K_2Cr_2O_7$ (Dicromato de potasio), $CdCl$ (Cloruro de cadmio), $CuSO_4$ (Sulfato de cobre) mencionando algunos.

A diferencia, los efluentes residuales provenientes del Jr. 9 de Octubre y del barrio Vallecito, no manifestaron niveles de toxicidad importantes, ello radicaría obviamente en que procede de pocas viviendas familiares (lo que se evidencian en sus caudales), donde no se incluirían aguas con algún nivel de uso industrial.

4.3.3. Porcentajes de mortalidad y efectividad de la toxicidad según el tiempo de evaluación para el punto final.

En la mayoría de casos se ha encontrado que las mortalidades definitivas para manifestar la sensibilidad a los tóxicos (aguas residuales) fueron a las 96 horas, por lo que se considera que ese es el tiempo adecuado para evaluar los bioensayos de ecotoxicidad, durante los puntos finales. En algunos casos la mortalidad se estabilizó antes de las 96 horas (a las 24 o 48 horas), pero en el 70% de bioensayos se estabilizó a partir de las 72 horas, por lo que según el criterio de pertinencia y considerando que *H. cuprea* se muestra más resistente que otras especies (Tabla 9) se sugiere que las evaluaciones sean a las 96 horas de instalados los bioensayos. Estos aspectos y las tendencias de mortalidad de *H. cuprea* por cada concentración del agua residual como tóxico, así como sus CL_{50} por cada uno de los cinco puntos de muestreo y de acuerdo a épocas, se ilustran y se aprecian mejor en las Figuras 15 a 19.

En la Figura 15 se aprecia las tendencias de los bioensayos con las aguas residuales de la laguna Espinar, en las tres épocas de evaluación los resultados dieron como altamente tóxicos, con CL_{50} a las 96 horas desde 9.59% en octubre, hasta 22.71% en agosto; es decir sólo con estas concentraciones de estas aguas servidas se provoca importantes riesgos ecológicos en el ecosistema y en la salud de sus componentes bióticos, considerando que *H. cuprea*, por su abundancia y su condición trófica, es uno de los elementos fundamentales en la dinámica ecológica del lago Titicaca (Dejoux, 1991).

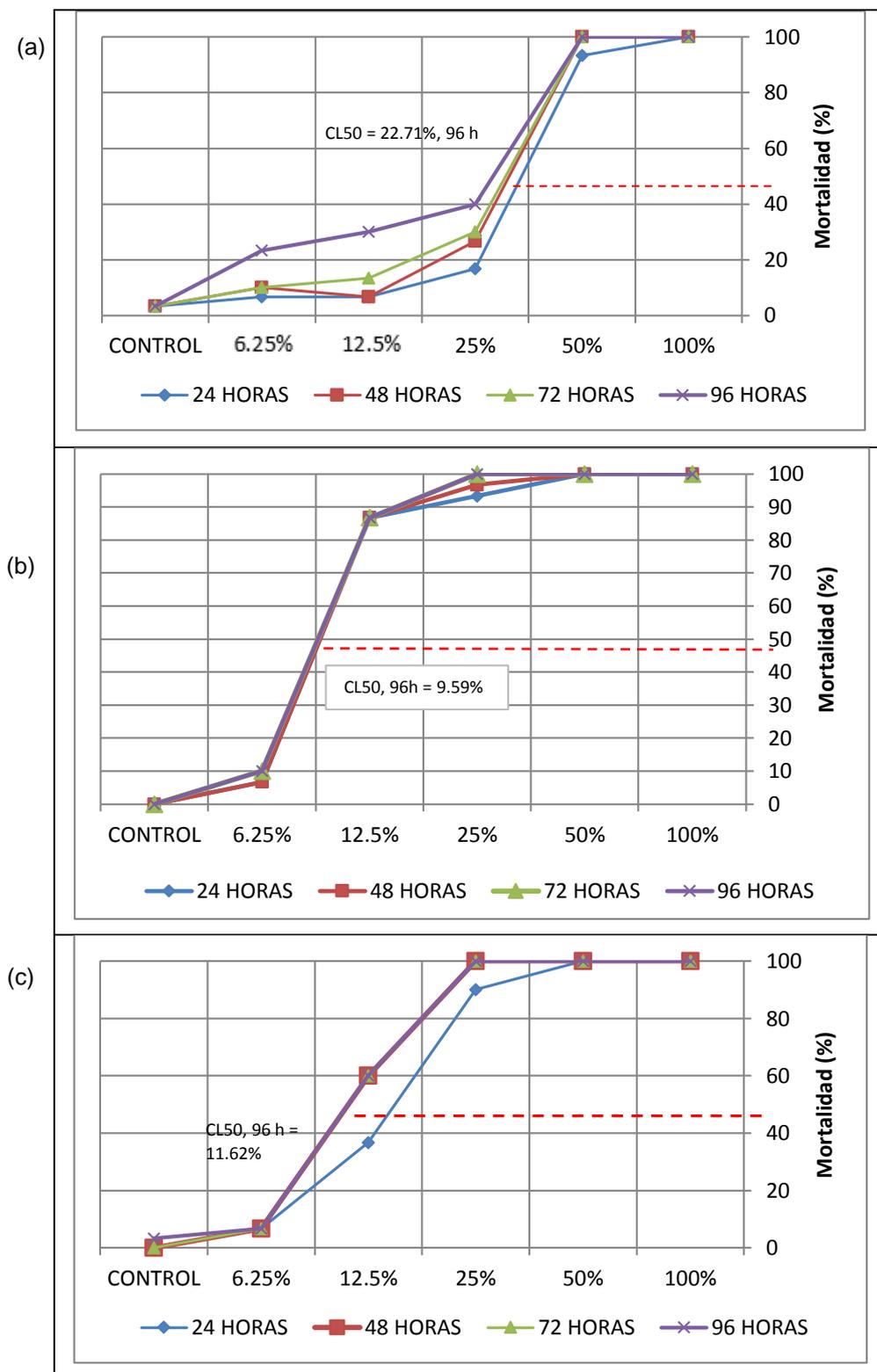


Figura 15. Mortalidad y CL₅₀ (línea roja punteada) para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales que ingresan a la planta Espinar (Punto de muestreo 1), durante agosto (a), octubre (b) y diciembre (c) 2016.

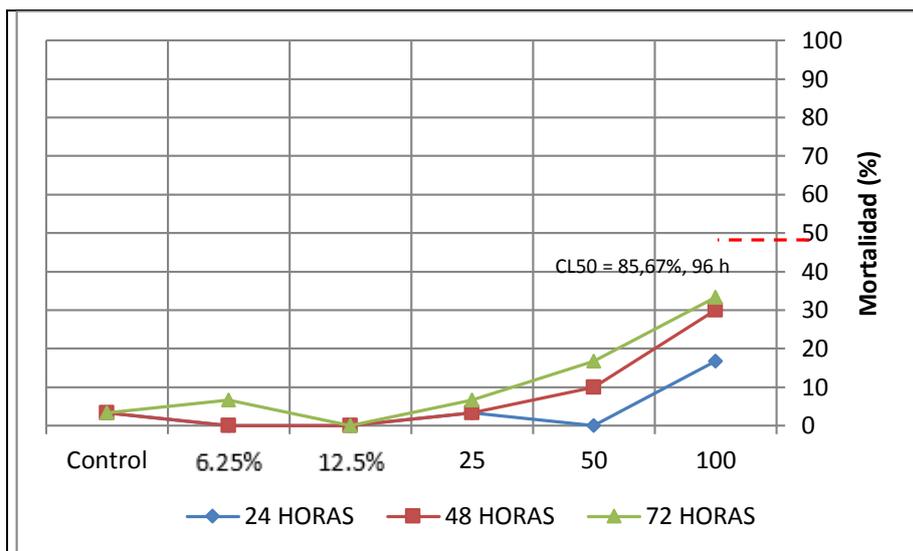
Si consideramos que su volumen del caudal de ingreso supera los 400 L/s y no tuviera ningún tratamiento, en un año significaría que 10220000 m³ de aguas residuales ingresan a la bahía interior de Puno; si esta cubeta contiene unos 39000000 m³ (Loza – Del Carpio *et al.*, 2016), ello significa que en ese año las aguas de la bahía interior tendrían una concentración de 26% de aguas residuales, suficiente para eliminar la mayoría de formas de vida de este ecosistema. Al parecer la presencia de las dos lagunas de oxidación de Espinar de alguna manera ha cumplido la función de depurar estas aguas tóxicas; sin embargo a la fecha, parece haber colapsado en sus capacidades y es muy probable que en poco tiempo se aprecien consecuencias más deplorables a este ambiente acuático y a la salud humana si no se implementa lagunas de tratamiento eficientes.

En cuanto a las aguas residuales que ingresan directamente por el Jr. 9 de octubre, en ningún caso evidenció algún nivel de toxicidad frente a *H. cuprea* y en la Figura 16 se muestra que en ningún bioensayo alcanza un valor para CL₅₀ (las líneas de tendencia no superan la línea roja punteada, por lo que se considera que se trata de aguas cuya toxicidad es mínima y su riesgo puede ser minimizado por la capacidad de resiliencia del ecosistema; aunque estas aguas son retenidas prácticamente por el embalse artificial del malecón de la Costanera, cerca al muelle de la ciudad de Puno.

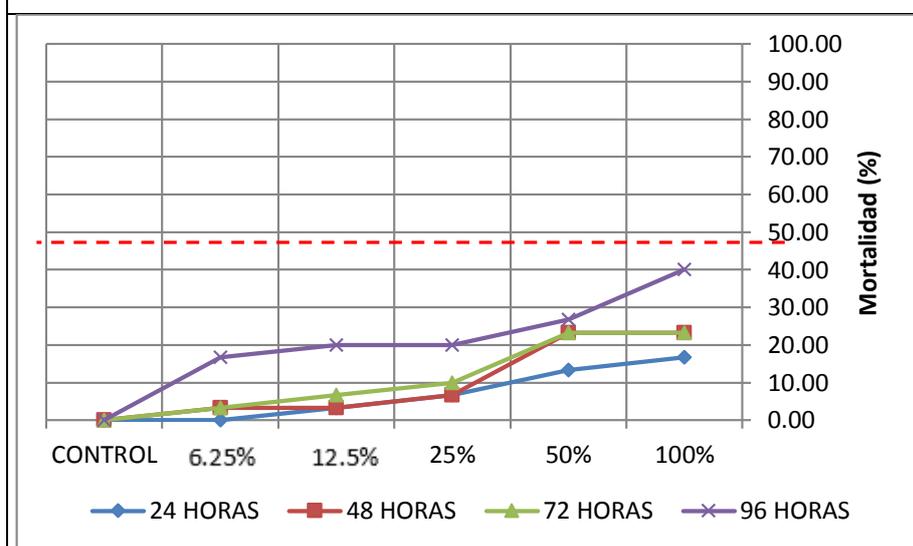
No se han realizado aún estudios ecotoxicológicos con *H. cuprea* del lago Titicaca, sin embargo existen reportes sobre especies de otras latitudes, principalmente con *H. azteca* y *H. curvispina*, incluyendo organismos diferentes a *Hyaella*.

Giusto (2014) y Giusto *et al.* (2014) Los resultados de estudios ecotoxicológicos con *H. curvispina* en sedimentos de aguas residuales en Argentina, reportaron que las mortalidades no fueron significativas.

(a)



(b)



(c)

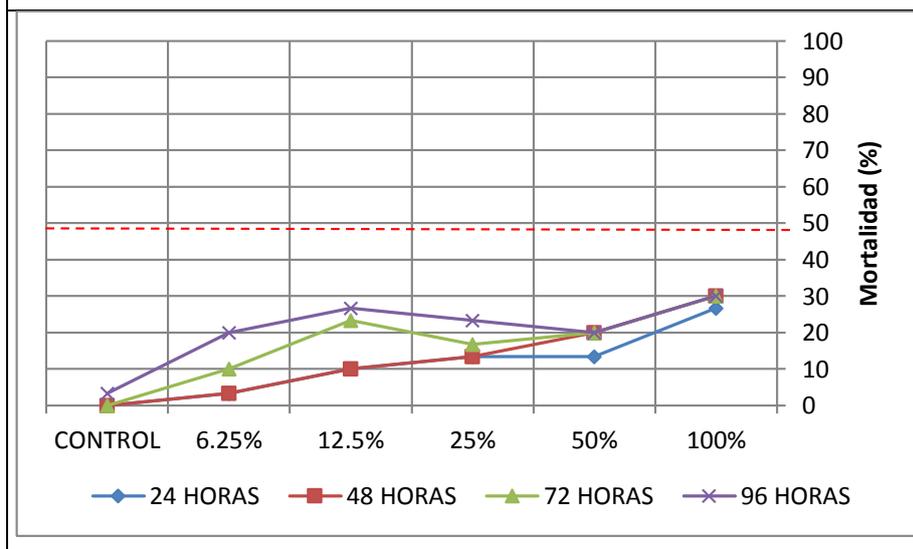


Figura 16. Mortalidad y CL₅₀ (línea punteada roja) para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales efluentes por el Jr. 9 de octubre (Punto de muestreo 2), agosto (a), octubre (b) y diciembre (c) 2016.

Las aguas residuales que ingresan directamente por el Jr. Ricardo palma e inmediaciones del HRMNB, tuvo un comportamiento variable en cuanto a su toxicidad (Figura 17), ya que en dos bioensayos (agosto y diciembre) mostraron una alta toxicidad, incluso casi similar al de Espinar (con CL_{50} de 15.52 % y 33.34 % respectivamente), pero en el mes de octubre su toxicidad fue menor que en todos los bioensayos para los cinco puntos evaluados, con un nivel de toxicidad casi nulo. Las aguas del desagüe de este punto, al parecer trae desechos líquidos domésticos de viviendas de las inmediaciones e incluso también del mismo hospital, cuyas características toxicológicas deben ser mucho más riesgosas para el ecosistema, por ello que en dos ocasiones estas aguas tuvieron una alta toxicidad; sin embargo en el mes de octubre probablemente no ingresaron desechos del nosocomio y sus aguas mostraron casi total inocuidad.

Hecho que también es puesto en evidencia por Kudiak *et al.* (2016), en Polonia, con los bioensayos realizados con *Vibrio fisheri* y el ostrácodo *Heterocypris incongruens* para evaluar el riesgo ambiental de las aguas residuales desde los efluentes de 76 plantas de tratamiento, Los resultados demostraron que la toxicidad en algunas plantas disminuye y en otras no, e incluso empeora, por lo que cada uno tiene una toxicidad diferente.

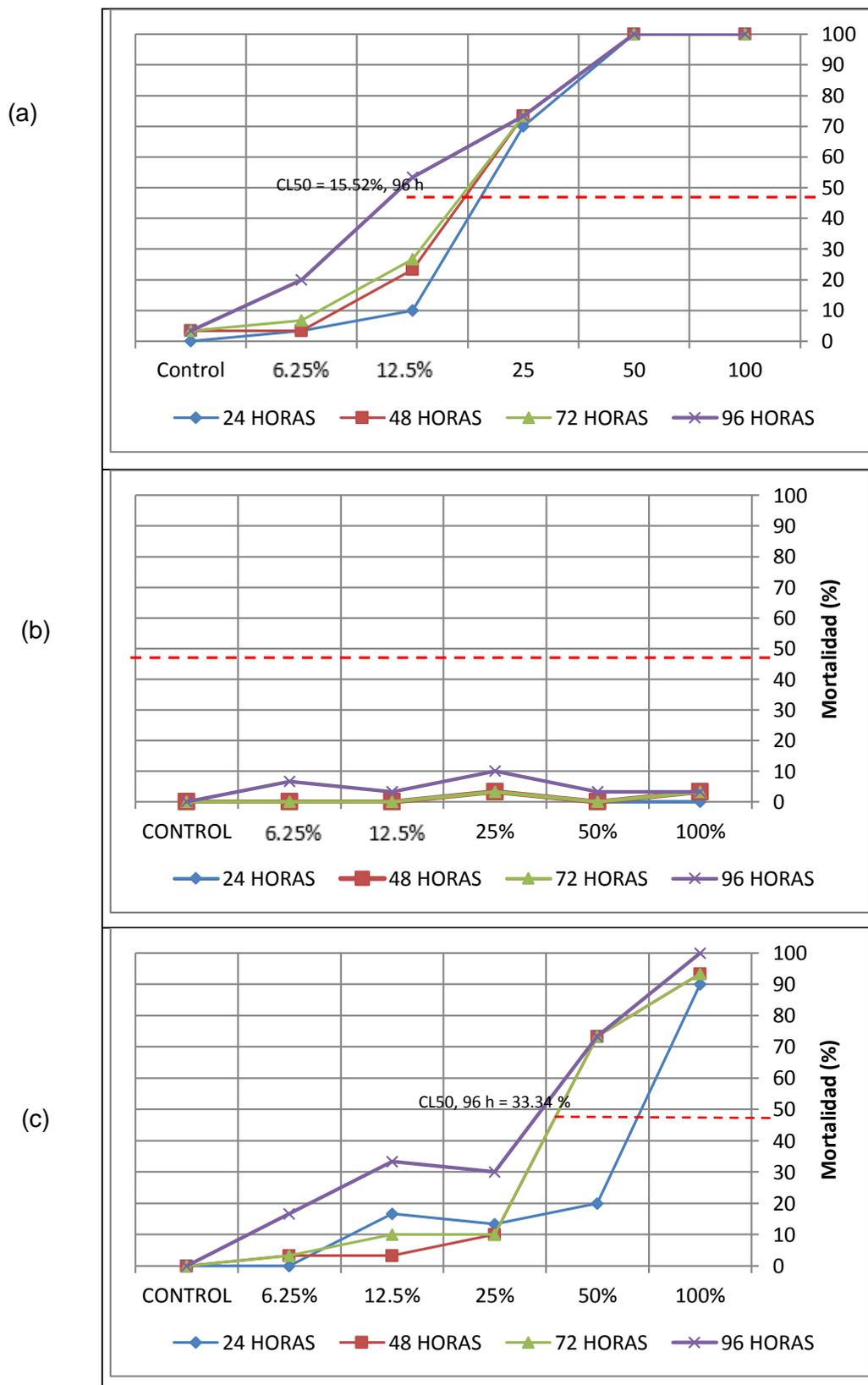
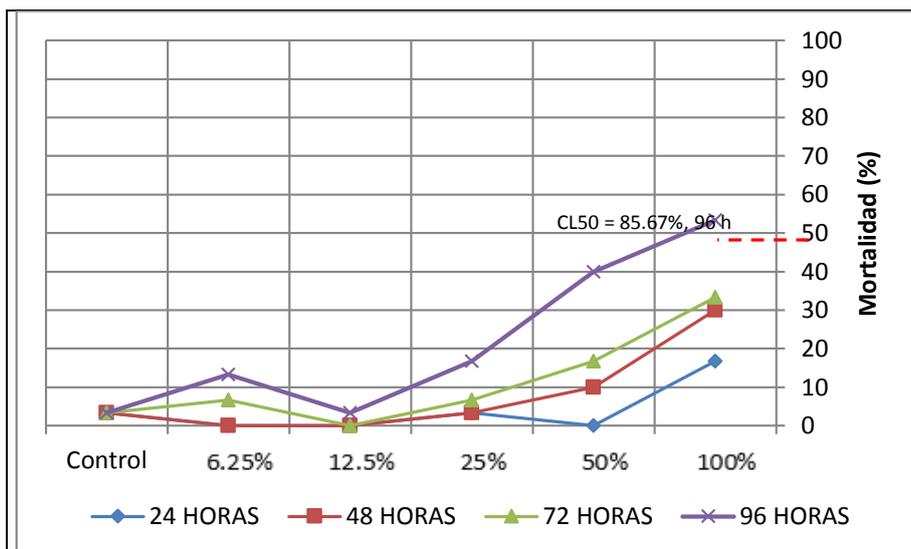


Figura 17. Mortalidad y CL₅₀ (línea punteada roja) para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales efluentes por el Jr. Ricardo palma (Punto de muestreo 3), agosto (a), octubre (b) y diciembre (c) 2016.

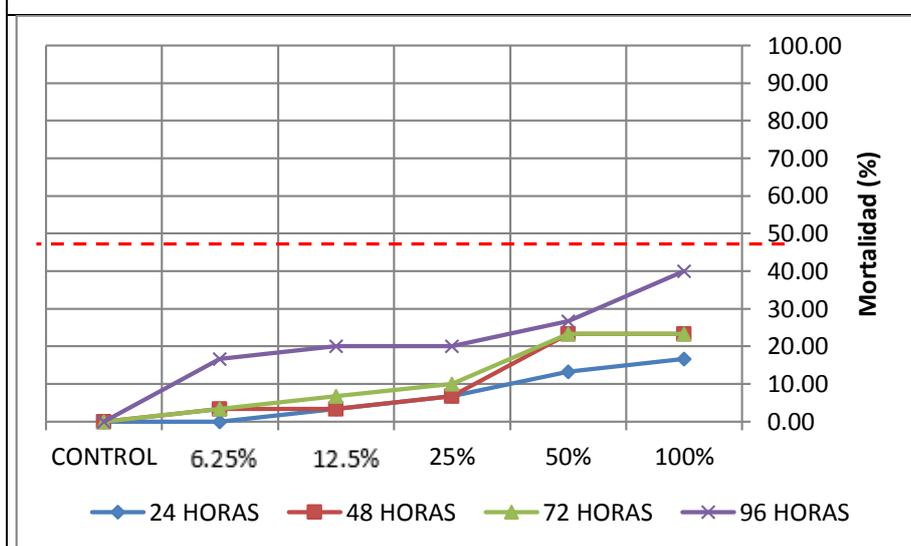
Las características ecotoxicológicas de las aguas residuales del barrio Vallecito también tuvieron poca trascendencia desde el punto de vista de su toxicidad, ya que sólo en una ocasión (agosto) evidenció algún nivel de riesgo, pero con relativa peligrosidad ya que su CL_{50} alcanzó hasta un 86.67%. Ello sugiere que sus aguas básicamente provienen de usos domésticos y de un número relativamente pequeño de viviendas (Figura 18).

Diferenciando con, Ingersol *et al.* (1998) en su evaluación de toxicidad de sedimentos de aguas residuales sobre neonatos de *H. azteca* en Norteamérica, encontraron efectos ecotóxicos básicamente crónicos que afectan el crecimiento y desarrollo de los individuos, niveles de mortalidad fueron hallados en concentraciones del 100%.

(a)



(b)



(c)

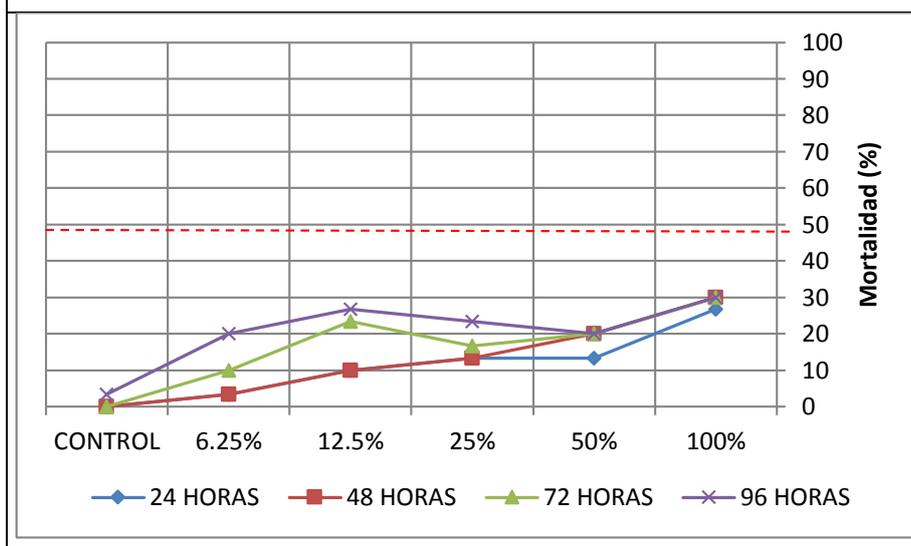


Figura 18. Mortalidad y CL₅₀ (línea punteada roja) para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales efluentes por el Barrio Vallecito (Punto de muestreo 4), agosto (a), octubre (b) y diciembre (c) 2016.

Finalmente las aguas residuales que ingresan directamente a la bahía de Puno por el barrio San José e inmediaciones de la UNA Puno, en las dos primeras ocasiones mostraron alto nivel de toxicidad, incluso mayores que la de Espinar, siendo su CL_{50} de 9.44 % para agosto y 8.85 % para octubre; se sugiere que esta condición es debido a que en este caudal ingresan aguas de la ciudad universitaria, conjuntamente con aguas procedentes de los diversos laboratorios, con sustancias altamente tóxicas. Pero en el mes de diciembre su toxicidad fue casi nula y podemos interpretar que esto fue así debido a que la muestra fue tomada cuando las labores académicas estuvieron suspendidas debido a un suceso de paro de la docencia y por tanto los laboratorios y otros servicios estaban suspendidos también. Hecho que también es puesto en evidencia por Kudiak *et al.* (2016), en Polonia, con los bioensayos de ecotoxicidad realizados con *Vibrio fisheri* y el ostrácodo *Heterocypris incongruens* cuyos resultados demostraron que la toxicidad en algunas plantas disminuye y en otras no, e incluso empeora, por lo que cada uno tiene una toxicidad diferente.

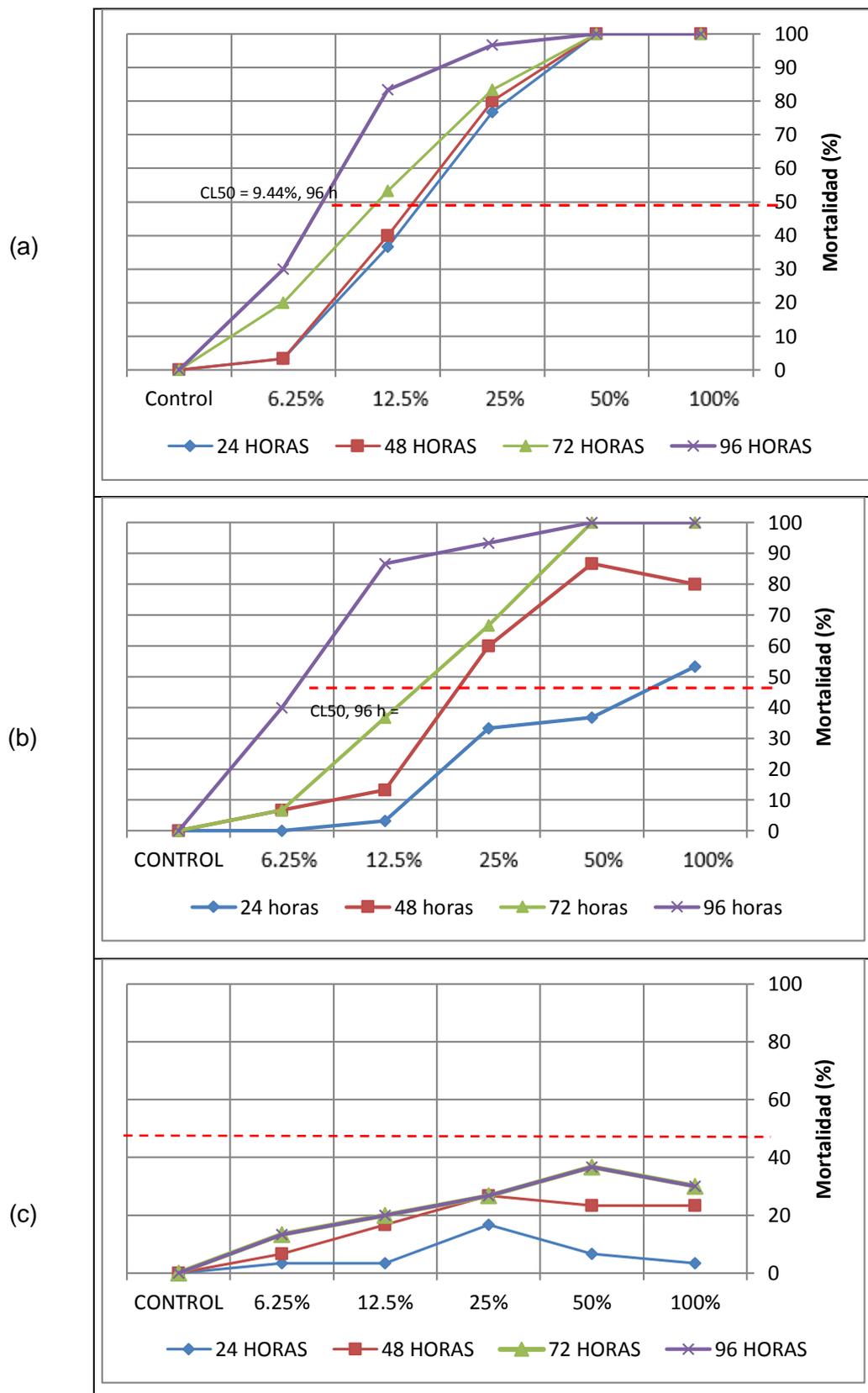


Figura 19. Mortalidad y CL₅₀ (línea punteada roja) para *H. cuprea* con diferentes concentraciones de aguas residuales efluentes por el Barrio San José - UNA (Punto de muestreo 5), agosto (a), octubre (b) y diciembre (c) 2016.

4.3.4. Características ecotoxicológicas de las aguas residuales evaluadas

En la Tabla 13 se observan los resultados finales sobre la toxicidad de las aguas residuales de cada punto de muestreo y basado en su CL_{50} y las unidades tóxicas agudas (Uta) se concluye que las aguas residuales que ingresan a las lagunas de oxidación de Espinar son altamente tóxicas, los desagües que ingresan por el Jr. Ricardo Palma – HRMNB y por el barrio San José - UNA se consideran tóxicas y finalmente las desagües que ingresan por el Jr. 9 de Octubre y el barrio Vallecito fueron caracterizadas como no tóxicas. Sin embargo estas condiciones toxicológicas fueron muy variables de acuerdo al mes de evaluación, lo cual queda evidenciado en los elevados valores de sus coeficientes de variabilidad (desde 43 a 121%).

Tabla 13. Valores de la CL_{50} finales para cada punto de muestreo de aguas residuales, incluyendo sus estadísticos descriptivos y las Uta promedios, durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.

MESES	Espinar	Jr. 9 de Octubre	Jr. R. Palma	Barrio Vallecito	Barrio San José UNA
Agosto	22.71	115.7	15.52	85.67	9.44
Octubre	9.59	180.19	233	117.09	8.85
Diciembre	11.62	102.92	33.34	197.91	133.62
Promedio	14.64	132.94	93.95	133.56	50.64
DE	7.06	41.42	120.75	57.90	71.87
EE	4.08	23.94	69.79	33.47	41.54
CV	48.24	31.16	128.52	43.35	14.93
Promedio UTa	6.83	0.75	1.06	0.75	1.97

Cuadros con fondo rojo significan altamente tóxicos, amarillos tóxicos y verdes no tóxicos.

Con respecto a la mortalidad ocasionada en *H. cuprea* por las diferentes concentraciones de las aguas residuales, según meses y lugares, el ANVA bajo el diseño factorial $3 \times 5 \times 6$ muestra que entre meses no se evidenció diferencias significativas, pero según el lugar o punto de muestreo y de acuerdo a las concentraciones de las dosis impuestas en los bioensayos si se observaron diferencias estadísticas (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de varianza en diseño factorial 3*5*6 (meses, lugares y concentraciones) para las mortalidades de *H. cuprea* durante los bioensayos, durante los meses de noviembre y diciembre del 2016.

Fuente	Suma de cuadrados		Media cuadrática	F calculada	Significación (P)
	tipo II	GL			
Modelo	3024.777(a)	12	252.065	67.537	0.000
Meses	14.862	2	7.431	1.991	0.143
Lugar	191.735	4	47.934	12.843	0.000
Concentración	378.337	5	75.667	20.274	0.000
Error	291.115	78	3.732		
Total	3315.892	90			

R cuadrado = 0.912 (R cuadrado corregida = 0.899) CV=4.38

Aplicando la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$) para diferenciar los niveles en estas diferencias, se aprecia que en cuanto a lugares, las aguas residuales de Espinar y San José – UNA ocasionaron las más altas mortalidades, siendo ambas similares, luego las aguas residuales del Jr. Ricardo Palma, con las del barrio Vallecito fueron estadísticamente similares y finalmente, las aguas que ocasionaron significativamente menos mortalidades a *H. cuprea* que los otros lugares fueron los procedentes del Jr. 9 de Octubre (Tabla 15). En cuanto a las concentraciones o dosis de las aguas residuales, la del 100%, 50% y 25% fueron estadísticamente similares, así como las dosis al 12.5 y 6.25%, siendo todos estos tratamientos significativamente diferentes del control (sin aguas residuales) (Tabla 15). Lo adecuado es que en el control no exista algún nivel de mortalidad, sin embargo en el presente estudio alcanzó en promedio en todos los bioensayos una mortalidad del 1.55%, valor que se considera adecuado ya que un supuesto y criterio importante a tener en cuenta para los bioensayos de toxicidad es que el control no debe tener más de un 10% de mortalidad (USEPA, 2000; Díaz – Baéz *et al.*, 2008) y en nuestro estudio no se superó este límite.

Tabla 15. Porcentajes de mortalidad de *H. cuprea* por el tóxico (aguas residuales) según cada factor evaluado. Letras diferentes entre filas expresan diferencias significativas a la prueba de Tukey ($P>0.05$), durante los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016.

MESES	LUGARES DE MUESTREO	CONCENTRACIONES
Agosto = 41.76%	(A) Espinar = 59.07 % (A)	100% = 63.99 % (A)
	Barrio San José – UNA = 53.15 % (AB)	50% = 47.5 % (AB)
Octubre = 33%	(A) Jr. R. Palma – HRMNB = 34.99 % (BC)	25% = 43.11 % (AB)
	Barrio Vallecito = 20.93 % (CD)	12.5% = 35.35 % (BC)
Diciembre = 32.78%	(A) Jr. 9 de Octubre = 11.11 % (D)	6.25% = 15.35 % (C)
		Control = 1.55 % (E)

En la actualidad no existen estudios referidos a la toxicidad aguda de aguas residuales evaluados mediante *Hyalella cuprea*, especie nativa del lago Titicaca, aunque existen estudios por ejemplo en *Hyalella azteca* y *Hyalella curvispina*, en Norteamérica y Argentina respectivamente, pero en evaluaciones de sedimentos de aguas residuales y para determinar toxicidad crónica y sub letal. Así, Giusto (2014) y Giusto *et al.* (2014), estudiaron la toxicidad crónica para *H. curvispina* en Argentina y demostraron que constituyen eficientes organismos para medir la toxicidad crónica y sub letal de sedimentos procedentes de aguas residuales urbanas.

Sin embargo se cuentan con algunos reportes de bioensayos con aguas residuales pero con otras especies, principalmente *Daphnia magna* y *Daphnia pulex*. Tyagi *et al.* (2007) reportaron que el cladóceros *D. magna* es sensible a la toxicidad de aguas servidas y puede ser utilizado en bioensayos para determinar la eficiencia de la depuración de niveles de toxicidad de plantas de tratamiento; basado en ello indican que las plantas de tratamiento en su nivel primario, secundario y terciario remueven niveles de toxicidad en 24%, 76% y 100% respectivamente.

En cambio García *et al.* (2006) en México, utilizando *D.pulex* encontró en plantas de tratamiento de aguas residuales, que en el nivel primario la toxicidad del efluente tiene un promedio de 2.11 Uta y en el nivel de tratamiento secundario 1.25 Uta, lo que significa que

aún al final de todo el proceso de depuración, las aguas siguen manteniendo niveles de toxicidad. En comparación con nuestro estudio, las Uta tuvieron valores similares, pero muy por debajo de las UTa de las aguas residuales que llegan a Espinar, que alcanzaron 6.83 Uta en promedio de todos los meses, a pesar de que las especies del género *Hyalella* suelen ser más resistentes a los tóxicos, lo detallan diferentes autores en la Tabla 9.

Javidmehr *et al.* (2015) estudio los efectos de algunos parámetros fisicoquímicos en la supervivencia de *H. azteca*, encontrando que estas sobreviven conductividades entre 646 y 3900 uS/cm y las aguas residuales evaluadas en nuestro estudio tuvieron niveles de conductividad dentro de ese rango por lo que probablemente este factor no afectó en demasía a *H. cuprea*; estos autores también mencionan que el pH óptimo para la sobrevivencia de *H. azteca* es de 8.01 a 8.51, para nuestro caso las aguas residuales tuvieron un pH un poco por encima de 7; si las condiciones de tolerancia son similares entre estas dos especies, es probable que este parámetro haya influenciado también en la mortalidad durante los bioensayos con *H. cuprea*.

En general, las aguas residuales son mezclas complejas de elementos químicos y tóxicos, los que individualmente o en su conjunto (causando sinergias) pueden determinar sus niveles de toxicidad y de riesgo para los ecosistemas (Villegas – Navarro *et al*, 1999), y en el presente estudio fueron esas condiciones y esas características de las aguas residuales que fueron evaluadas y determinadas a través del anfípodo nativo *H. cuprea*.

V. CONCLUSIONES

- Se ha logrado desarrollar y adaptar una metodología para la crianza y mantenimiento del anfípodo *Hyalella cuprea* en condiciones de laboratorio; resultando como alimento más adecuado, el alimento para peces, con adiciones eventuales de hojas de lechuga. El amplexus tuvo una duración de 2.6 días; las crías a los 10 días alcanzan 1.56 mm, obteniéndose individuos neonatos utilizados para los bioensayos, con tamaños entre 1.5 a 3 mm (hasta los 20 días de nacidos).
- Las características fisicoquímicas de las aguas residuales la laguna de oxidación de Espinar, obtiene los rangos de OD entre 0.88 a 2.97 en promedio para todos los puntos evaluados, según norma (ECA) debe estar ≥ 5 mg/L, el pH algo más de 7 en todos los casos, la conductividad desde 961 a 2165 uS/cm, según norma (ECA) debe estar < 1000 uS/cm, los TDS entre 530.5 y 1236.5, según norma (ECA) de estar ≤ 25 ; y 55.32 y 409.64 para DBO_5 en la zona de Espinar, superando los LMP establecidos en la norma peruana para las aguas residuales que es de < 100 mg/L. Concluyéndose que la zona de Espinar no es apta para la vida acuática, y que su calidad ambiental acuática se encuentra en deterioro.
- Los resultados de los bioensayos de ecotoxicidad para *H. cuprea* indican que el efluente de aguas residuales de CL_{50} en la planta Espinar es muy tóxico con una Uta de 6.83 en promedio; otro efluente importante desde su toxicidad es el de Jr. Ricardo Palma, con una Uta de 1.06 resultando ligeramente tóxico y del barrio San José – UNA con una Uta de 1.97 calificado como moderadamente tóxico. A diferencia de los efluentes del Jr. 9 de Octubre con una Uta de 0.71 y del barrio Vallecito con Uta de 0.75, caracterizándose como no tóxicas. En los niveles de mortalidad de *H. cuprea* ante los cinco efluentes en el ANVA y prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) no hubieron diferencias significativas entre meses, pero sí entre lugares y concentraciones.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de toxicidad crónica y efecto sub letal de los sedimentos de las aguas residuales de la ciudad de Puno, para determinar los efectos toxicológicos a nivel fisiológico y bioquímico en *H. cuprea*.
- Se recomienda hacer una evaluación general de la cantidad y caudal de las aguas residuales que ingresan de forma directa a la bahía interior de Puno.
- Se recomienda emprender estudios más detallados sobre crianza artificial de *Hyalella cuprea* para mejorar y optimizar la tecnología de producción de este anfípodo con fines de uso en análisis ecotoxicológico.
- Se sugiere implementar un Laboratorio de Ecotoxicología en la Universidad Nacional del Altiplano Puno, donde se realicen estudios y monitoreos permanentes de la calidad ecotoxicológica de los recursos hídricos y edáficos de la región Puno.

VII. LITERATURA CITADA

- Adams, S.M. 2003. Establishing causality between environmental stressors and effects on aquatic ecosystems. *H. Ecol. Risk Assess*; 19: 17-35.
- Adelman I. L. Smith y G. Siesennop. 1976. Acute toxicity of sodium chloride, pentachlorophenol, Guthiont, and hexavalent chromium to fathead minnows (*Pimephales promelas*) and goldfish (*Carassius auratus*). *J Fish Res Board Can* 33: 203–208.
- Beltran, D., R. Palomino, E. Moreno, C. Gamarra y D. Montesinos. 2015. Calidad de agua de la bahía interior de Puno, lago Titicaca durante el verano del 2011. *Revista peruana de biología*. 22 (3): 335 – 340.
- Bertoletti E, Zagatto PA. 2008. *Ecotoxicología Acuática, Principios e Aplicaciones*, Ed. Rima, 472 páginas.
- Arenzon, A., R. Fontana Pinto, P. Colombo y M. Raya-Rodriguez. 2003. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (9): 2188–2190.
- ASTM. 1993. Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates E1383-93. Annex A1. *Hyalella azteca*. In: ASTM1993 Annual Book of Standards Vol. 11.04: 1183–1185.
- Call, D.J., Brooke, L.T., Ankley, G.T., Benoit, D.A. y Hoke, R.A. 1994. Appendix G: Biological Effects Testing Procedures. In *Great Lakes Dredged Material Testing and Evaluation Manual*. U.S. Environmental Protection Agency Regions II, III, V, Great Lakes National Program Office, and U.S. Army Corps of Engineers, North Central Division.
- Calow, P. Forbes. 2003. *Book of Ecotoxicology*. Sheffield, UK: Blackwell Science Ltd. 478p.
- Capó, M. 2007. *Principios de ecotoxicología*. Editorial Tebar, España. 320 p.
- Casset, M.A., Momo, F. y Giorgi, A. 2001. Dinámica poblacional de dos especies de anfibios y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del río Luján (Argentina). *Ecología Austral*. 11: 79-85.

- CTGA - Comisión Técnica de Gestión Ambiental de Puno. 2008. Evaluación de las aguas residuales de la ciudad de Puno, Planta Espinar. Informe Técnico. Puno, Perú.
- Couillard, Y., L.C. Grapentine, U. Borgmann, P. Doyle, S. Masson. 2008. The amphipod *Hyalella azteca* as a biomonitor in field deployment studies for metal mining. *Environmental Pollution* 156: 1314–1324.
- Decreto Supremo N° 021-2009-VIVIENDA. Valores máximos admisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario.
- Decreto Supremo N° 015 – 2015 – MINAM.
- Decreto Supremo N° 003 – 2010 – MINAM.
- Dejoux, C. 1991. Los Anfípodos. En. El lago Titicaca, síntesis del conocimiento limnológico actual. *Claude Dejoux y André Ittis* (edit.). Orstom - Hisbol. La Paz Bolivia. p: 353 – 362.
- De March, B. G. 1981. *Hyalella azteca* (Saussure). En: Handbook for the culture of selected freshwater invertebrates. Lawrence, S.G. (Ed.). Edited by Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 54. Department of Fisheries and Oceans. Ottawa. p: 61 – 77.
- Díaz Báez M.; G. Bulus y Y. Pica - Granados. 2004. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En: Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Edit. Gabriela Castillo Morales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa, ON. p: 99 – 112.
- Díaz Báez, M.C., Y. Pica Granados y A. Ronco. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, la experiencia en México. P. Ramírez - Romero y A. Mendoza - Cantú (Compiladoras). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología, México D.F. p: 17 – 32.

- Díaz Báez, M., Y. Pica Granados y M. C. Sobrero. 2008. Aseguramiento y control de calidad de los ensayos de toxicidad. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. Patricia Ramírez Romero y Ania Mendoza Cantú (Compiladoras.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México D. F. p: 347 – 360.
- DIGESA – Dirección General de Salud Ambiental. 1999. Evaluación de la eficiencia de la Planta de Tratamiento Espinar: parámetros microbiológicos y fisicoquímicos. Ministerio de Salud, Puno Perú.
- Di Marzio, W. D. 2005. Evaluación de la ecotoxicidad de efluentes industriales y Municipales. Ingeniería Sanitaria y Ambiental – AIDIS, 82: 88 – 93.
- De los Ríos-Escalante, A. Mansilla y C. B. Anderson. 2012. Revisión de la distribución de *Hyalella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda) en la Patagonia e islas adyacentes. Lat. Am. J. Aquat. 40(2): 462-466.
- De los Ríos-Escalante P., J. Morrone y R. Rivera. 2012. Distributional patterns of the South American species of *Hyalella* (Amphipoda: Hyalellidae). Gayana 76(2): 153-161.
- EMSA Puno – Empresa Municipal de Saneamiento Básico. 2007. Evaluación Planta de Tratamiento Espinar. Puno. Informe Técnico Institucional.
- Espigares García, J. y J. A. Pérez López. 1990. Aguas residuales y composición. Universidad de Granada. Servicio de publicaciones, España. 22 p.
- Ferrari L. 2005. Ecotoxicological assessment for receiving waters with premetamorphic tadpoles acute assay. Chemosphere 59:567-575.
- García, V., J.C. Sánchez, V. Pacheco, C. Ávila, T. Pavón y P. Guerrero. 2006. Respuestas de toxicidad de bioensayos empleados en la evaluación de aguas residuales de la industria. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química. Toluca, México. 10 p.
- Giusto A, Salibian A, Ferrari L. 2014. Biomonitoring toxicity of natural sediments using juvenile *Hyalella curvispina* (Amphipod) as test species: evaluation of early effect endpoints. Ecotoxicology. 23: 293-303.

- Giusto A. 2014. Efectos de la Contaminación por metales pesados sobre Anfipodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UBA.
- González, E. y L. Watling. 2003. Two new species of *Hyaletta* from Lake Titicaca, and redescrptions of four others in the genus (Crustacea: Amphipoda). *Hydrobiologia* 497: 181–204.
- González, E. 2003. The freshwater amphipods *Hyaletta* Smith, 1874 in Chile (Crustacea: Amphipoda). *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 623-637.
- González, E. y L. Watling. 2003. Two new species of *Hyaletta* from Lake Titicaca, and redescrptions of four others in the genus (Crustacea: Amphipoda). *Hydrobiologia* 497: 181–204.
- Griffith, M.B., Kaufmann, P.R., Herlihy, A.T. y Hill, H.B. 2001. Analysis of macroinvertebrate assemblages in relation to environmental gradients in Rocky Mountain streams. *Ecol. Appl.*, 11: 489–505.
- Grosso, L.E. y Peralta, M. 1999. Anfípodos de agua dulce Sudamericanos. Revisión del género *Hyaletta* Schmitt. I. *Acta Zool. Lilloana*, 45: 79–98.
- IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 2014. Evaluación de la calidad ambiental del lago Titicaca. Informe Técnico. Puno, Perú.
- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment Test. In: "Fundamental of aquatic toxicology". Rand, G. M. (eds) Taylor and Francis, Washinton, DC. pp: 231-255.
- Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Dwyer, F.J., Hardesty, D.K. y Kemble, N.E. 1998. Use of sublethal endpoints in sediment toxicity tests with the amphipod *Hyaletta azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 1508-1523.
- Ingersoll, C.G., Steevens, J.A., y MacDonald, D.D., eds., 2014, Evaluation of toxicity to the amphipod, *Hyaletta azteca*, and to the midge, *Chironomus dilutus*; and bioaccumulation by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*, with exposure to PCB-contaminated sediments from Anniston, Alabama: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2013–5125. 122 p.

- Javidmehr, A., P. Kass, L. A. Deanovic, R.E. Connon, I. Werner. 2015. 10-Day survival of *Hyalella azteca* as a function of water quality parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 115: 250–256.
- JICA. 2000. Análisis de sedimentos de la bahía interior de Puno, Lago Titicaca. Puno, Perú. Informe Técnico Institucional.
- Jorgensen SE. (editor). (2010). *Ecotoxicology, a derivative of Encyclopedia of Ecology*. New York: Elsevier-Academic Press, 402 pp.
- Loza – Del Carpio, A., C. Gamarra y N. Condori. 2016. Caracterización morfobatimétrica y estimación de sedimentos de la bahía interior de Puno, lago Titicaca, mediante tecnología SIG. *Rev. Investig. Altoandin.* 18 (2): 237 – 248.
- Lopretto, E.C. 1983. Contribución a la bioecología del anfípodo dulceacuícola *Hyalella Pampeana* Cavalieri. Desarrollo embrionario. *Limnobios*, 2(7): 471-490.
- Kudiak, B. M. Wiczerzak, G. Yotova, S. Tsakovski, V. Simeonov, J. Namiesnik. 2016. Environmental risk assessment of Polish wastewater treatment plant Activity. *Chemosphere* 160: 181 – 188.
- Mihelcic, J. y J. Zimmerman. 2012. *Ingeniería ambiental, fundamentos, sustentabilidad, diseño*. Edit. Alfaomega. México. 696 p.
- Milani, D., Reynoldson, T.B., Borgmann, U. y Kolasa, J. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(4): 845-854.
- Newman, M. C. 2001. *Population ecotoxicology*. Wiley, USA. 228 p.
- Newman, M.C. y Unger, M.A. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Eds. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Northcote T.G., Morales, P., Levy, S. D. A. y Greaven, M. S. 1991. *Contaminación en el Lago Titicaca, Perú. Capacitación, Investigación y manejo*. Puno. Perú.

- Orias, F. y Y. Perrodin. 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Science of the Total Environment* 454–455: 250–276.
- Orias, F. y Y. Perrodin. 2014. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*. 115 (2014) 31–39.
- Pacoricona, F., R. Kistritz y R. Berolatti. 1991. Manejo de las aguas residuales en Puno: problemas y soluciones alternativas. En: *Contaminación en el lago Titicaca, Perú: capacitación, investigación y manejo*. T. Northcote, P. Morales, D. Levy y M. Greaven (Eds): 257 – 276. Vancouver, Canadá. Northburn Printers and Stationers Ltd.
- Pennak, R.W. 1989. *Freshwater Invertebrates of the United States*. John Wiley and Sons, Inc., New York. 628 p.
- Peluso, M. L. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Ciencias Biológicas. 170 p.
- Planes, E. y J. Fuchs. 2015. Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Ciencias e Investigación*. 63 (2): 45 – 62.
- Portugal Mendonca, E., A. Picado, S. M. Paixão, L. Silva, M. A. Cunha, S. Leitão, I. Moura, C. Cortez, F. Brito. 2009. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *Journal of Hazardous Materials*. 163: 665–670.
- Repetto, M., P. Sanz. 1995. *Glosario de terminos toxicológicos*. IUPAC-AET. Version Española. 77 p.
- Ronco, A.E., Camilion, C. y Manassero, M. 2001. Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Geochemistry and Health*, 23:89-103

- Ronco, A.; M. Díaz y Y. Pica. 2004. Conceptos generales. En: Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Edit. Gabriela Castillo Morales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa, ON, Canadá. P: 17 – 22.
- Ronco, A.; M. Díaz y Y. Pica. 2004. Elementos básicos requeridos para la implementación de pruebas en análisis rutinarios. En: Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Edit. Gabriela Castillo Morales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa, ON, Canadá. P: 31 – 36.
- Rust, A.J., Burgess, R.M., McElroy, A.E., Cantwell, M.E. y Brownawell, B. J. 2004. Role of source matrix in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to deposit-feeding benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(11): 2604-2610.
- Saldaña, P. A. Lerdo de Tejada, M. A. Gómez y R. López. 2005. La importancia de incluir análisis de toxicidad en descargas Industriales y municipales que afectan a los cuerpos receptores, caso: bacteria luminiscente, *Photobacterium phosphoreum*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 11 p.
- Solano A. E. 2007. Ensayo de toxicidad aguda al efluente de la PTAR del municipio de chía mediante la utilización de semillas de *Lactuca sativa* y propuesta para su utilización como agua de riego para hortalizas. Tesis Ingeniero Ambiental y Sanitario. Universidad de la Salle, Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Bogotá, Colombia. 168 p.
- Somma, A., A. Giusto y L. Ferrari. 2011. Manual de producción de *Hyaella curvispina* en laboratorio. Edit. Utopias, Buenos Aires, Argentina. 25 p.
- Soupilas, A., C.A. Papadimitriou, P. Samaras, K. Gudulas, D. Petridis. 2008. Monitoring of industrial effluent ecotoxicity in the greater Thessaloniki area. *Desalination* 224: 261–270.
- Suárez, G, T. Romero y E. Perigo. 2007. Toxicidad de residuales líquidos de un Central Azucarera sobre la langosta espinosa *Panulirus argus* Latreille 1804. Centro de Investigaciones pesqueras –Instituto de Oceanología, Cuba. 9 p.
- Turk, J. y Turk, A. 1984. *Environmental Science*. 3rd edition, Saunders College Publishing, USA.

- Tyagi, V.; A. Chopra, N. Durgapal y A. Kumar. 2007. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of Municipal Sewage Treatment Plant. J. Appl. Sci. Environ. 11 (1): 61 – 67.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1993. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Cuarta edición. Weber, C.I., Ed., EPA-600/4-90-027.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1994. Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Tercera edición. EPA 600/4-91-002.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2000. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates Second Edition. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA 600/R- 99/064.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. 266 p.
- USEPA ECOTOX Data Bank, AQUIRE (Aquatic toxicity Information Retrieval) database. 2016. U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, Minnesota, USA. <http://www.epa.gov/ecotox>
- Villegas- Navarro, A, Romero Gonzalez, MC y Rosas Lopez, E. 1999. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewater. *Environmental International*. 25: 619- 624.
- Wieczerzak, M., J. Namieśnik y B. Kudlak. 2016. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. *Environment International* 94: 341–361.
- Wright, D.A. y Welbourn, P. 2002. *Environmental Toxicology*. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge University Press. 630 p.

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 16.Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua Decreto Supremo N° 015-2015-MINAN. Categoría 4: Conservación del ambiente acuático

CATEGORIA 4

		CATEGORÍA 4				
PARÁMETRO	UNIDAD	E1: LAGUNAS Y LAGOS	E2: RÍOS		E3: ECOSISTEMAS MARINO COSTERAS	
			COSTA Y SIERRA	SELVA	ESTUARIOS	MARINOS
FÍSICOS - QUÍMICOS						
Aceites y grasa (MEH)	mg/L	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cianuro Total	mg/L	0,0052	0,0052	0,0052	0,001	0,001
Color (b)	Color verdadero escala Pt/Co	20 (a)	20 (a)	20 (a)	**	**
Clorofila A	mg/L	0,008	**	**	**	**
Conductividad	(uS/cm)	1 000	1 000	1 000	**	**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	5	10	10	15	10
Fenoles	mg/L	2,56	2,56	2,56	5,8	5,8
Fósforo Total	mg/L	0,035	0,05	0,05	0,124	0,062
Nitratos (NO ₃ ⁻)	mg/L	13	13	13	200	200
Amoniaco	mg/L	1,9	1,9	1,9	0,4	0,55
Nitrógeno Total	mg/L	0,315	**	**	**	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥5	≥5	≥5	≥4	≥4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8 – 8,5	6,8 – 8,5
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	≤ 25	≤ 100	≤ 400	≤ 100	30

Anexo 2.

Tabla 17. Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domesticas o Municipales. DECRETO SUPREMO N° 003-2010-MINAM.

**LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
 PARA LOS EFLUENTES DE PTAR**

PARÁMETRO	UNIDAD	LMP DE EFLUENTES PARA VERTIDOS A CUERPOS DE AGUAS
Aceites y grasas	mg/L	20
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 mL	10,000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	100
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	200
pH	unidad	6.5-8.5
Sólidos Totales en Suspensión	mL/L	150
Temperatura	°C	<35

PANEL FOTOGRÁFICO

Figura 20. Laguna de oxidación Espinar



Figura 21. Toma de muestras en la laguna de oxidación Espinar



Figura 22. Zona de ingreso de aguas residuales a la laguna de oxidación de Espinar



Figura 23. Efluente de agua residual en el Jr. 9 de Octubre



Figura 24. Toma de muestras de agua residual y medición de caudal en el barrio Vallecito



Figura 25. Flujo de agua residual del Jr. Ricardo Palma para ingresar a la bahía interior de Puno



Figura 26. Toma de muestras e ingreso de aguas residuales desde el barrio San José



Figura 27. Acopio de individuos de *H. cuprea* desde la crianza en laboratorio



Figura 28. Evaluación de las crías de *H. cuprea* en laboratorio

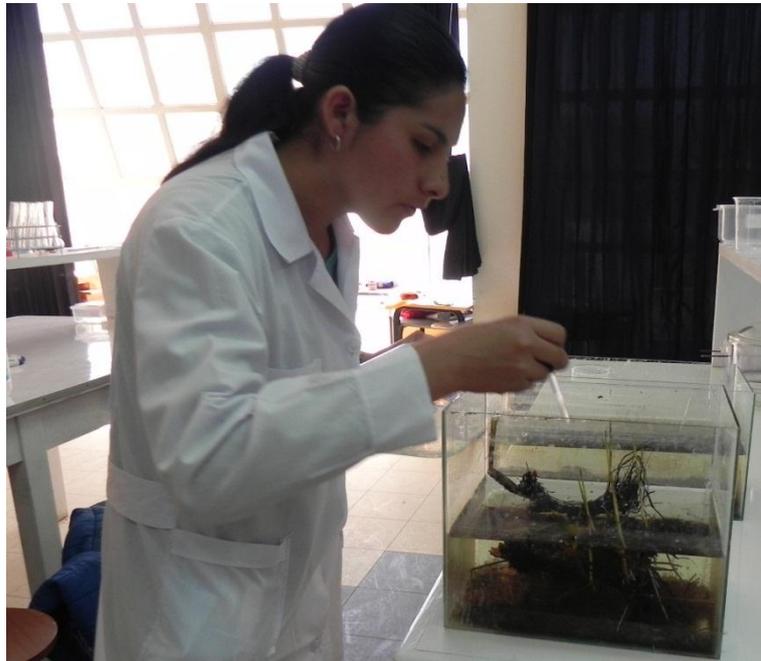


Figura 29. Envases para las pruebas ecotoxicológicas en laboratorio

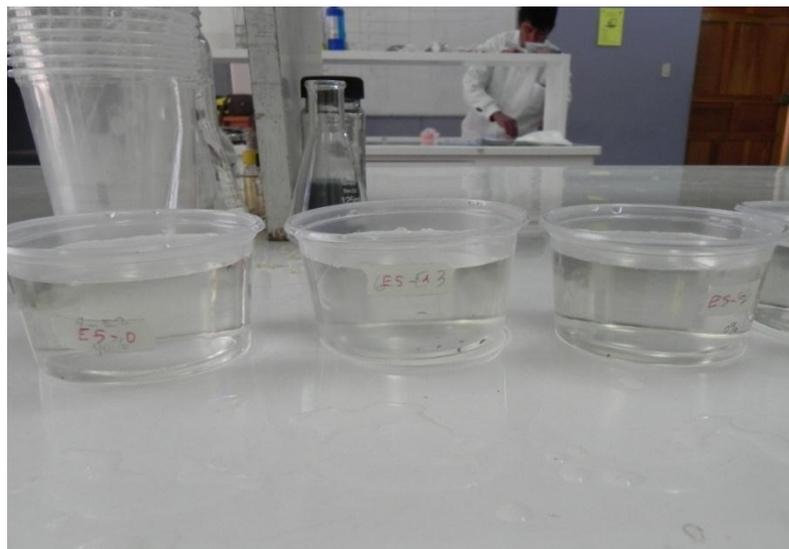


Figura 30. Traslado de individuos de *H. cuprea* a los envases para los bioensayos



Figura 31. Preparación de las diferentes concentraciones de los tratamientos con aguas residuales



Figura 32. Preparación de los bioensayos y vista al fondo de los acuarios de crianza de *H. cuprea*



Figura 33. Bioensayos con las baterías de las unidades experimentales

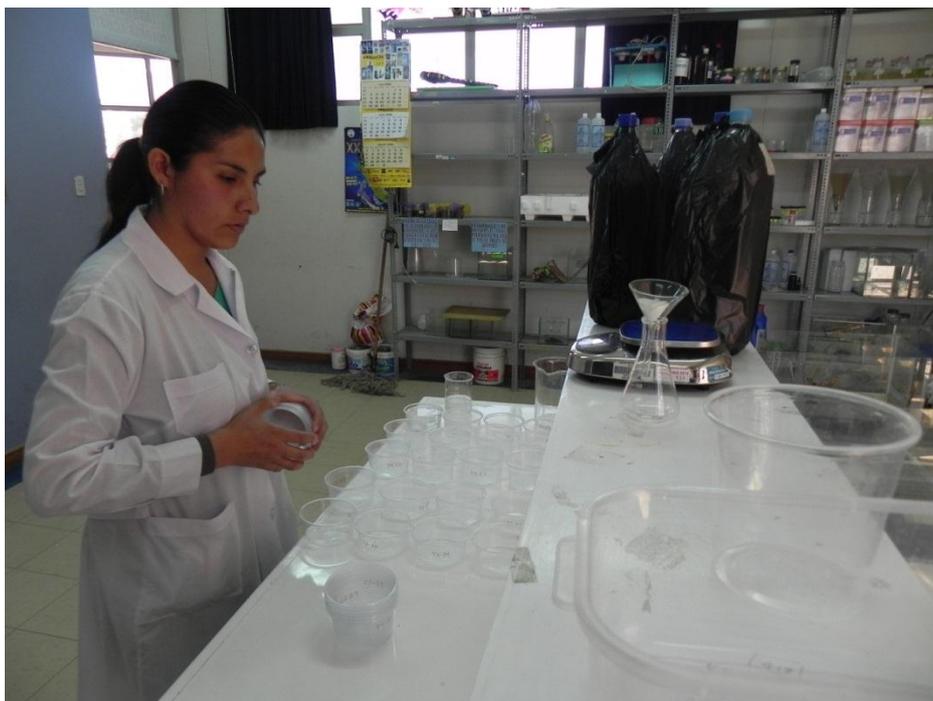
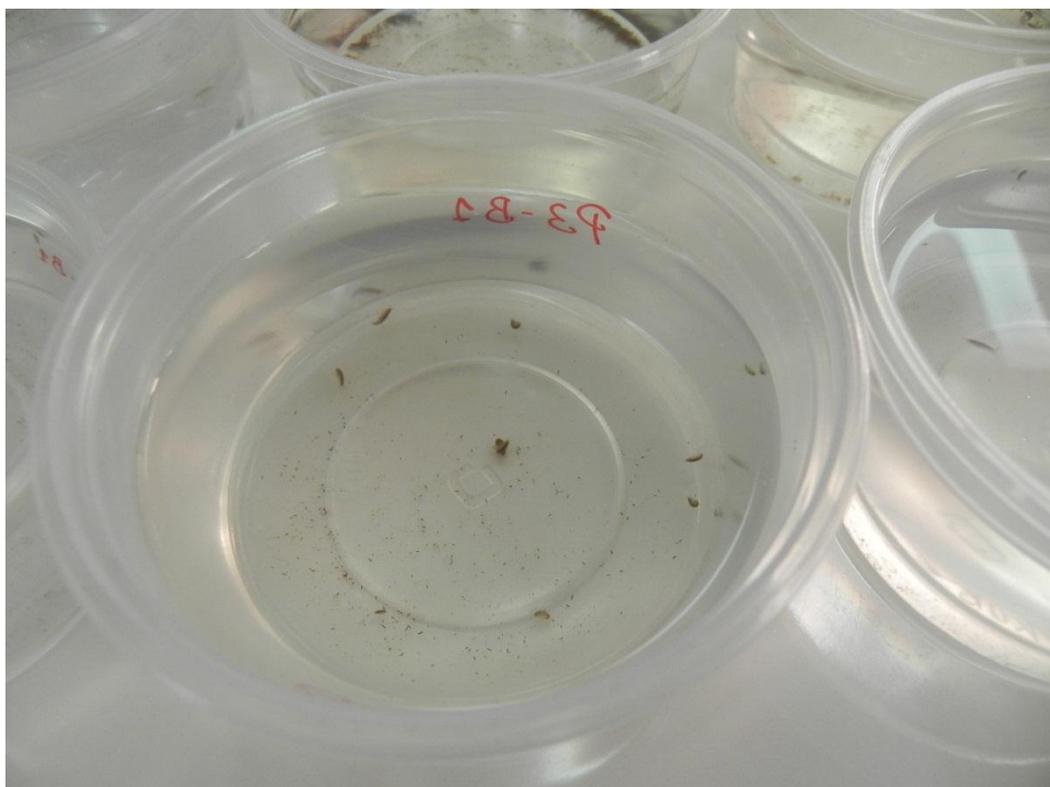


Figura 34. Conteo de individuos *H. cuprea* a las 96 horas del bioensayo

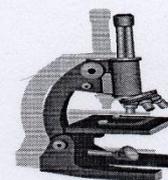


Figura 35. Mortandad de individuos de *H. cuprea* a las 96 horas del bioensayo sometidas a las aguas residuales del Barrio Ricardo Palma.





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE ECOLOGÍA
LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA



CONSTANCIA

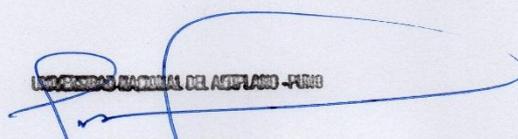
EL QUE SUSCRIBE COORDINADOR DE LABORATORIO DEL AREA DE
ECOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

HACE CONSTAR:

Que la Bachiller YOVANA PALAO MAMANI, egresada de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional Del Altiplano, ha realizado su trabajo de Investigación Titulado BIOENSAYOS DE ECOTOXICIDAD AGUDA DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE PUNO SOBRE *Hyaella cuprea* (ANFIPODA HYALELLIDAE) CULTIVADA EN LABORATORIO, en el LABORATORIO DE ECOLOGIA ACUATICA de la Escuela Profesional de Biología de la UNA – PUNO, entre los meses de mayo a diciembre del 2016.

Se emite la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente

Puno, 20 de Enero del 2017


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
M.Sc. Alfredo L. Loza Del Carpio
FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS
Asociado T.C.