

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE UN BIOCIDA CONVENCIONAL Y UN
BIOCIDA NO CONVENCIONAL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE BIOENSAYOS
DE TOXICIDAD AGUDA EN AMBIENTES ACUÁTICOS**

DIANA MARCELA CALIXTO GOMEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2004**

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE UN BIOCIDA CONVENCIONAL Y UN
BIOCIDA NO CONVENCIONAL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE BIOENSAYOS
DE TOXICIDAD AGUDA EN AMBIENTES ACUÁTICOS**

DIANA MARCELA CALIXTO GOMEZ

**Monografía para optar por el título de
Especialista en Química Ambiental**

**Director:
RICARDO RESTREPO MANRIQUE
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2004**

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCION | 13 |
| DEFINICION DEL PROBLEMA | 15 |
| OBJETIVOS | 17 |
| 1. REVISION BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 1.1 Corrosión Influenciada Microbiológicamente (CIM) | 18 |
| 1.1.1 Características generales de la biocorrosión | 19 |
| 1.1.1.1. Formación de Biopelículas | 21 |
| 1.1.2 Métodos Químicos en el Control de la biocorrosion | 24 |
| 1.1.3 BIOCIDAS CONVENCIONALES | 25 |
| 1.1.3.1 Biocidas oxidantes | 25 |
| 1.1.3.2 Biocidas no Oxidantes | 28 |
| 1.1.4 Biocidas No Convencionales | 30 |
| 1.2 PRUEBAS DE TOXICIDAD O BIOENSAYOS | 31 |
| 1.2.1 Tipos de Bioensayos | 32 |
| 1.2.1.1 Según el procedimiento | 32 |
| 1.2.1.2 Según el tipo de respuesta | 33 |
| 1.2.1.3 Según la infraestructura del laboratorio | 34 |
| 1.2.2 Especies usadas en bioensayos | 35 |
| 1.2.2.1 Selección de Especies | 35 |
| 1.2.2.2 Adaptabilidad de los organismos | 36 |
| 1.2.3 Condiciones generales para la ejecución de bioensayos | 40 |
| 1.2.3.1 Organismos experimentales | 40 |
| 1.2.3.2 Instalaciones del laboratorio | 40 |
| 1.2.3.3 Agua de dilución/control | 41 |
| 1.2.3.4 Propiedades y almacenamiento de las muestras | 42 |

| | |
|---|----|
| 1.2.3.5 Preparación de las soluciones de prueba | 42 |
| 1.2.4 Ensayos preliminares y definitivos | 43 |
| 1.2.5 Calculo, Análisis y Resultados de la prueba | 44 |
| 1.2.6 Bioensayos de Toxicidad Aguda con Cladóceros | 44 |
| 1.2.6.1 Generalidades de los Cladóceros | 44 |
| 1.2.6.2 Condiciones generales para la ejecución de bioensayos con Daphnia | 49 |
| 1.2.7 Bioensayos de toxicidad aguda con algas | 54 |
| 1.2.7.2 Condiciones generales para la ejecución de bioensayos con algas | 57 |
| 2. DISEÑO EXPERIMENTAL | 62 |
| 2.1 materiales | 62 |
| 2.1.1 Sustancias prueba | 62 |
| 2.1.2 Material biológico | 66 |
| 2.1.3 Soluciones de prueba | 66 |
| 2.2 METODOLOGIA PARA LOS BIOENSAYOS CON CLADÓCEROS | 67 |
| 2.2.1 Organismos de prueba | 67 |
| 2.2.2 Agua de dilución/cultivo | 68 |
| 2.2.3 Condiciones de los bioensayos | 68 |
| 2.2.4 Ensayos preliminares | 69 |
| 2.2.5 Ensayos definitivos | 71 |
| 2.3 METODOLOGIA PARA LOS BIOENSAYOS CON algas | 72 |
| 2.3.1 Organismos de prueba | 72 |
| 2.3.2 Agua de dilución/cultivo | 74 |
| 2.3.3 Condiciones de los bioensayos | 74 |
| 2.3.4 Ensayos preliminares | 75 |
| 2.3.5 Ensayos definitivos | 77 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSION | 78 |
| 3.1 RESULTADOS DE LA evaluacion con Daphnia pulex | 78 |
| 3.1.1 Ensayos preliminares | 79 |
| 3.1.2 Análisis estadístico con el método Probit | 82 |
| 3.1.3 Análisis de los resultados con una sustancia de referencia | 83 |

| | |
|--|----|
| 3.2 RESULTADOS DE LA EVALUACION CON Scenedesmus | |
| cf. subspicatus | 83 |
| 3.2.1 Análisis de los resultados con una sustancia de referencia | 86 |
| CONCLUSIONES | 87 |
| BIBLIOGRAFIA | 90 |
| ANEXOS | 94 |

LISTA DE TABLAS

| | Pag. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Grupos biológicos asociados con procesos de corrosión influenciada microbiológicamente. | 20 |
| Tabla 2. Adaptabilidad de los organismos como especies para bioensayos (CEPIS-OPS, 1997)(Henry, 1997). | 37 |
| Tabla 3. Clasificación taxonómica de los cladóceros | 45 |
| Tabla 4. Principales características de las especies más estudiadas del género <i>Daphnia</i> (López, 1996) | 46 |
| Tabla 5. Parámetros para la determinación de la calidad del agua de dilución o de cultivo (EPA, 1996). | 51 |
| Tabla 6. Preparación de agua reconstituida (Environmental Canada, 1990) | 53 |
| Tabla 7. Ventajas y desventajas del uso de algas en bioensayos | 55 |
| Tabla 8. Medio nutritivo recomendado para las pruebas estandarizadas de toxicidad con algas. | 61 |
| Tabla 9. Ficha de datos de seguridad del glutaraldehído. | 63 |
| Tabla 10. Ficha de datos de seguridad del molibdato de sodio. | 65 |
| Tabla 11. Resumen de las condiciones de la prueba para <i>Daphnia pulex</i> | 69 |
| Tabla 12. Resumen de las condiciones de la prueba para <i>Scenedesmus cf. subspicatus</i> . | 75 |
| Tabla 13. Ensayos preliminares con <i>Daphnia pulex</i> | 79 |
| Tabla 14. Ensayos definitivos con <i>Daphnia pulex</i> | 81 |
| Tabla 15. Resultados de CL_{50} y sus límites de confianza para los productos evaluados | 82 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Primera fase de la formación de la biopelícula | 23 |
| Figura 2. Segunda fase de la formación de la biopelícula | 23 |
| Figura 3. Tercera fase de la formación de la biopelícula | 24 |
| Figura 4. Anatomía de una hembra de <i>Daphnia</i> spp. | 47 |
| Figura 5. Reproducción partenogenética de <i>Daphnia</i> spp. | 48 |
| Figura 7. Cinética de crecimiento de una población de algas. | 56 |
| Figura 8. Desviaciones del crecimiento algal respecto a una curva de crecimiento normal | 57 |
| Figura 9. Especies de microalgas utilizadas en ensayos de toxicidad. | 58 |
| Figura 10. Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> cf. <i>subspicatus</i> | 84 |
| Figura 11. Porcentaje de Inhibición de crecimiento de <i>S.</i> cf. <i>subspicatus</i> vs. concentración de las sustancias de prueba | 85 |

LISTA DE FOTOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Fotografía 1. Acuarios para el cultivo y mantenimiento de cladóceros | 68 |
| Fotografía 2. Montajes de los ensayos preliminares con <i>Daphnia pulex</i> , para glutaraldehído y molibdato de sodio. | 70 |
| Fotografía 3. Adición de organismos de ensayo | 71 |
| Fotografía 4. Microfotografía de <i>Scenedesmus cf. subspicatus</i> | 73 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Anexo A. Resultados Método Probit | 95 |
| Anexo B. Evaluaciones tipo TIME KILL TEST | 99 |

RESUMEN

TITULO

EVALUACION ECOTOXICOLÓGICA DE UN BIOCIDA CONVENCIONAL Y UN BIOCIDA NO CONVENCIONAL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA EN AMBIENTES ACUÁTICOS*.

AUTOR

DIANA MARCELA CALIXTO GOMEZ**

PALABRAS CLAVES

Bioensayos, Toxicidad aguda, Biocorrosión, Bacterias sulfato reductoras, Biocidas.

DESCRIPCION O CONTENIDO

En esta monografía, se valoró el efecto toxicológico de dos agentes químicos con acción biocida. El primer biocida fue el glutaraldehído, utilizado comúnmente en la industria en general, para la prevención y control de la biocorrosión. El segundo biocida fue una sal de molibdato, la cual está siendo considerada como una alentadora alternativa para el control de la corrosión biológica por su reducido impacto ambiental.

Para su evaluación fueron realizados bioensayos de toxicidad aguda con dos especies acuáticas representativas de diferentes escalones de la cadena trófica, un productor *Scenedesmus cf. subspicatus* y un consumidor primario *Daphnia pulex*.

Según los ensayos realizados, la CL₅₀ y la CE₅₀ para el glutaraldehído fueron de 65 y 320 mg/L y para la sal de molibdato de 981 y 2000 mg/L respectivamente. Sin embargo, para conseguir un control efectivo del crecimiento bacteriano, la concentración de aplicación del glutaraldehído, en un sistema industrial real, debe oscilar entre 200 y 600 ppm. Por lo tanto, la disposición final de residuos con glutaraldehído, puede representar una seria amenaza para los productores y consumidores primarios de los ecosistemas acuáticos. Por otra parte, si la sal de molibdato puede ser aplicada en una concentración similar a la del glutaraldehído, este biocida puede convertirse en una alternativa ecológicamente amigable para el control de la biocorrosión.

* Monografía

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Especialización en Química Ambiental.
Director: Biol. Ricardo Restrepo Manrique.

SUMMARY

TITTLE

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION, IN AQUATIC ENVIROMENTS, OF CONVENTIONAL AND NON-CONVENTIONAL BIOCIDES TROUGH ACUTE TOXICITY BIOASSAYS*.

AUTOR

DIANA MARCELA CALIXTO GOMEZ**

PALABRAS CLAVES

Bioassays, Acute toxicity, Biocorrosion, Sulphate reducing bacteria, Biocides.

DESCRIPTION OR CONTENT

In this study, ecotoxicological effect of two chemical agents with biocide action was tested. One is glutaraldehyde, commonly used in industries to prevent and control biocorrosion. The second biocide was a molybdate salt, which is actually considered as an alternative for biological corrosion control due to reduced environmental impact.

Acute toxicity bioassays were performed using two representative aquatic species at different trophic chain levels. A producer, *Scenedesmus cf. subspicatus* and a primary consumer, *Daphnia pulex*.

According to the tests, LD₅₀ and ED₅₀ for glutaraldehyde were 65 and 320 mg/L and for molybdate salt were 981 y 2000 mg/L respectively. However, an effective glutaraldehyde concentration, to control bacterial growth, in a real system must oscillate in between 200 - 600 ppm. Final disposal of these solutions represent a serious threat for primary productors and consumers in aquatic ecosystems. On the other hand, if molybdate salt can be used in similar concentrations to those of glutaraldehyde, this biocide can become an environmentally friendly alternative for biocorrosion control.

* Essay.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Especialización en Química Ambiental.
Director: Biol. Ricardo Restrepo Manrique.

INTRODUCCION

Los sistemas naturales poseen la capacidad de soportar alteraciones originadas por la introducción de nuevas sustancias mediante los procesos internos de autodepuración. Cuando la cantidad y calidad de este tipo de sustancias contaminantes superan su capacidad de recuperación, el deterioro del ecosistema comienza a ser evidente, ocasionando en la mayoría de los casos, daños irreversibles tales como la reducción de las poblaciones de animales residentes, la desaparición de especies migratorias acuáticas e incluso la pérdida de la biodiversidad.

Los cuerpos de agua son considerados como los receptores temporales o finales de una gran variedad de agentes químicos producidos durante las actividades domésticas e industriales; estos vertimientos, principalmente aquellos generados por la industria, han ocasionado un evidente aumento en la contaminación de los sistemas acuáticos y por ende, la afectación de las especies y el desequilibrio del ecosistema. Por esta razón, durante la última década y en muchos países, se ha dado la introducción de legislaciones acerca del uso y control de nuevos productos químicos y la medición de parámetros tendientes a diagnosticar la calidad de agua de un ambiente determinado.

Inicialmente, para la detección de estas sustancias tóxicas en los cuerpos de agua se contempló la medición de los parámetros fisicoquímicos, pero estos últimos sólo permitieron cuantificar una pequeña proporción de sustancias sin poder evaluar su posible efecto sobre las poblaciones existentes en el medio. Debido a esta limitante, se comenzó a implementar el uso de metodologías que permitieran establecer los efectos producidos por los compuestos tóxicos en organismos biológicos, siendo estos considerados como finos sensores de los cambios que operan en el medio.

Una de las pruebas más empleadas es la realización de bioensayos, los cuales permiten determinar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa o de actividad desconocida sobre un tejido vivo, organismo o grupo de organismos (Gherardi-Goldstein, 1990); por lo tanto, es posible comparar la toxicidad de diferentes compuestos, conocer la sensibilidad y los efectos producidos en los organismos por las sustancias ensayadas.

En este estudio se evalúa el efecto ecotoxicológico de un biocida convencional, glutaraldehído, el cual es ampliamente utilizado por la industria colombiana para el tratamiento de la biocorrosión y que está ejerciendo un efecto negativo sobre los ambientes acuáticos; debido a esta situación, se está buscando nuevas opciones amigables con el ambiente, como lo es el molibdato de sodio, quien en la actualidad está siendo evaluado para el control de las poblaciones de bacterias sulfato reductoras a nivel de laboratorio. Con los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda se evalúa el impacto que puede ejercer cada uno de los biocidas ensayados sobre dos poblaciones representativas de la cadena alimenticia, los cladóceros (*Daphnia pulex*) y las algas unicelulares (*Scenedesmus cf. subspicatus*).

DEFINICION DEL PROBLEMA

La Corrosión Inducida o Influenciada Microbiológicamente (CIM), es una de las formas de deterioro más comunes y juega un papel relevante al producir entre el 30 y el 40% de toda la corrosión en los sistemas industriales en el mundo (Arroyave, 1997) (Pope, 1992).

Para la eliminación de los microorganismos causantes de corrosión, la única opción que puede ser usualmente implementada es el uso de tratamientos químicos a partir de una gran variedad de productos que actualmente se encuentran en el mercado y que se denominan biocidas. Los biocidas poseen mecanismos de acción muy variados (oxidantes y no-oxidantes), y su composición química también exhibe una gran heterogeneidad, ya que pueden ser aminas, amonios cuaternarios, glutaraldehídos, entre los más importantes (Boivin, 1995).

En un sistema real los agentes microbiocidas tienen efecto bacteriostático (inactivación sin pérdida de viabilidad de las bacterias) y en el mejor de los casos bactericida (eliminación de microbios). Sin embargo, la efectividad lograda contra las bacterias sésiles o adheridas como una biopelícula es muy baja (Videla, 1996), por lo que es necesario utilizar altas concentraciones del biocida, provocando ostensibles aumentos en los gastos y en el impacto ambiental.

En la actualidad, la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC), está desarrollando el proyecto titulado: Estudio del Efecto del Nitrato y el Molibdato sobre la Producción de Ácido Sulfhídrico (H_2S) y sobre la Población de Bacterias Sulfato Reductoras Asociadas a Procesos de Corrosión, en el cual se está determinando el uso potencial de las sales inorgánicas de molibdeno (Mo) como una innovadora alternativa de control y mitigación química de la biocorrosión, lo que constituye un avance en el desarrollo de sustancias biocidas no

convencionales más amigables con el medio ambiente y que permitirán un efectivo control a bajo costo atenuando el impacto sobre la naturaleza.

Por consiguiente, en este estudio se evaluará el efecto ecotoxicológico del molibdato de sodio propuesto como biocida no convencional mediante la aplicación de bioensayos de toxicidad aguda, con la finalidad de establecer su condición de “biocida verde” y su comportamiento frente a un biocida convencional usado actualmente por la industria. Teniendo en cuenta que el proyecto está considerado sólo en escala de laboratorio, la información generada en el presente trabajo podrá ser usada como soporte técnico durante el eventual proceso de aplicación en sistemas reales industriales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto ecotoxicológico de un biocida convencional y un biocida no convencional, mediante la aplicación de bioensayos de toxicidad aguda en ambientes acuáticos, para determinar el impacto ambiental que conlleva el uso a nivel industrial de estas sustancias químicas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Revisar qué tipo de organismos experimentales, procedimientos de evaluación y normatividad son empleados actualmente para la ejecución de bioensayos de toxicidad.
- Seleccionar los organismos experimentales más apropiados para la realización de los bioensayos en términos técnicos (susceptibilidad, disponibilidad, fácil mantenimiento, biología y comportamiento conocido, etc.) y económicos.
- Determinar la toxicidad aguda generada para cada uno de los biocidas a evaluar mediante la obtención de la Concentración Letal 50 (CL₅₀) o la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) y sus límites de confianza.
- Generar un protocolo estandarizado específico para bioensayos de toxicidad aguda en la evaluación de productos biocidas.

1. REVISION BIBLIOGRÁFICA

Esta revisión bibliográfica contempla inicialmente un conocimiento de la fenomenología biológica, electroquímica, metalúrgica y de superficie de la Corrosión Influenciada Microbiológicamente; los tipos y aplicación de los biocidas usados por la industria para la prevención, control y mitigación de la Biocorrosión. En segunda instancia se aborda el tema principal del estudio que es el bioensayo, en donde se expone los diferentes campos de aplicación, las especies más usadas, los requerimientos necesarios para llevar a cabo estos ensayos de toxicidad en especies de cladóceros y microalgas.

1.1 CORROSIÓN INFLUENCIADA MICROBIOLÓGICAMENTE (CIM)

La corrosión microbiológica o Biocorrosión es la iniciación o la aceleración de la cinética de la corrosión debido a la interacción entre los procesos metabólicos y la actividad microbiana con un metal (Watkins, 1994). A partir de la década del 80 se ha venido usando ampliamente la denominación de corrosión influenciada (o inducida) microbiológicamente, que en su aceptación inglesa (Microbiologically Influenced Corrosion), ha originado la sigla MIC (Videla, 1984).

La biocorrosión fue identificada por primera vez hace más de 100 años y descrita teóricamente desde 1934 (Peng, 1994). A pesar de ello, la CIM no había sido considerada como un serio problema, ni como un proceso de degradación importante de los sistemas industriales modernos hasta mediados de los años setenta, cuando los microbios fueron relacionados con el rápido picado de las paredes de tanques de agua construidos en acero (Videla, 1984).

En la actualidad este fenómeno se presenta en sistemas industriales de generación de energía, de proceso químico, en la industria láctea, del papel, aeronáutica, marítima y fluvial, de la producción de petróleo y del sector del gas

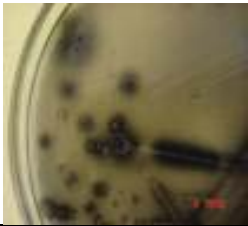
(Little, 1997). A pesar de ello esta problemática no se ha comprendido totalmente entre otras razones, por la amplia variedad de ambientes y microorganismos encontrados en estos sistemas los cuales operan a diferentes temperaturas, presiones y condiciones de humedad (CIC, 2003).


1.1.1 Características generales de la biocorrosión. En la generación de la corrosión biológica, los microorganismos se asocian en forma de nódulos o biopelículas las cuales se desarrollan de forma poco uniforme en tiempo y espacio. Estas capas median el intercambio de elementos entre el sustrato metálico y las sustancias transportadas provocando una importante modificación de la interfase metal/solución (Videla, 1996).

La presencia y cantidad de bacterias en contacto con el metal influencia la probabilidad de que se desarrolle la corrosión interna en estructuras de producción, procesamiento, transporte, almacenamiento y distribución de la industria en general (CIC, 2003) y depende de la clase y magnitud de los procesos metabólicos en los agentes microbianos. Tales procesos podrían definirse como reacciones químicas que posibilitan la toma de nutrientes del medio, con la consecuente eliminación y retorno de sustancias modificadas, produciendo fenómenos de despolarización catódica, alteración del equilibrio termodinámico del electrolito (medio que contiene el metal expuesto), aumento de las tasas de disolución y depósito de minerales, formación de áreas de oclusión, sitios anódicos y ataque ácido (Pope, 1995). Puede existir además una influencia mecánica, asociada al desarrollo de colonias y a la heterogeneidad creada sobre la superficie del metal, debido a la acumulación de depósitos de materiales diversos como óxidos, sulfuros y carbonatos de hierro y productos biológicos de desecho.

Existe una gran variedad de grupos biológicos asociados a los procesos de CIM, los cuales están conformados por cientos de especies con características propias. En la Tabla 1 se detallan los principales y más estudiados grupos (Little, 2000) (Herro, 1995) (Jenneman, 1998) (Lavoie, 1996) (Halbach, 2001) (Pope, 1986).

Tabla 1. Grupos biológicos asociados con procesos de corrosión influenciada microbiológicamente.

| GRUPO BIOLÓGICO | | PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS |
|---------------------------------------|---|---|
| Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) |  | Son un grupo de anaerobios obligados, heterótrofos que pueden ser aislados de una gran variedad de ambientes. Se han identificados ampliamente con CIM debido a la producción de H ₂ S y por causar procesos de despolarización catódica. Los principales grupos estudiados son <i>Desulfobacter sp.</i> y <i>Desulfotomaculum sp.</i> |
| Bacterias productoras de ácido (BPA) |  | Este amplio grupo de bacterias pueden producir ácidos orgánicos e inorgánicos los cuales producen una disminución del pH, acelerando el proceso de picado. A este grupo pertenecen bacterias aerobias como enterobacterias y <i>Thiobacillus sp.</i> y anaerobios como <i>Clostridium sp.</i> |
| Bacterias oxidadoras del azufre |  | Involucra a organismos autótrofos, acidófilos que producen grandes cantidades de ácido sulfúrico como producto de su metabolismo. Los principales géneros asociados son <i>Leptospirillum sp.</i> , <i>Sulfobacillus sp.</i> , <i>Sulfolobus</i> , etc., siendo estos últimos bacterias filamentosas. |
| Bacterias oxidadoras del hierro |  | Son capaces de oxidar el hierro ferroso (Fe ⁺²) a férrico (Fe ⁺³) produciendo depósitos de hidróxido férrico. Conforman este grupo el género <i>Gallionella sp.</i> , <i>Sphaerotilus sp.</i> y <i>Leptothrix sp.</i> |
| Bacterias productoras de <i>slime</i> |  | Son principalmente bacterias anaerobias facultativas, entre ellas el género <i>Pseudomonas sp.</i> , las cuales producen masas significativas de polímeros extracelulares, productos metabólicos, gases y agua. Son las principales formadoras de biopelículas y frecuentemente se encuentran asociadas con las BSR. |
| Hongos |  | Pueden producir grandes cantidades de ácidos orgánicos e inorgánicos como producto de su metabolismo. Son los principales agentes contaminantes en los tanques de almacenamiento de combustible en aviones. Las principales especies asociadas son <i>Cladosporium sp.</i> y <i>Hormoconis resinae</i> . |

| | | |
|-------|---|---|
| Algas |  | Producen tejidos densos y fibrosos en áreas soleadas. Estas formaciones de tejidos pueden establecer celdas de concentración diferenciales y permitir el crecimiento de anaerobios corrosivos debajo de su estructura, favoreciendo el desarrollo de la CIM. Además, pueden producir ácidos orgánicos que pueden llegar a afectar las infraestructuras metálicas. |
|-------|---|---|

Fuente: (Little, 2000) (Jenneman, 1998) (Pope, 1986) (CIC, 2004)

No es posible calificar un grupo fisiológico como más “corrosivo” que otro. Por ejemplo, la evidencia experimental sigue apoyando la designación de las BSR como agentes despolarizantes muy corrosivos (Teoría de la Despolarización Catódica), que gracias a su acción hidrogenásica oxidativa aumentan la concentración de iones hidrógeno por producción de sulfuro (Watkins, 1994); sin embargo, otros microbios como las bacterias productoras de *slime* (BPS) y las BPA, también generan grandes cantidades de iones hidrógeno a partir de la producción de ácidos orgánicos débiles, lo que constituye un escenario igualmente crítico.

1.1.1.1. Formación de Biopelículas. La biopelícula es considerada como una masa de material polimérico extracelular (MPE), conteniendo un 95% o más agua, diversos detritus inorgánicos y células microbianas dispuestas en conglomerados (*clusters*) que se encuentran separados por canales o túneles donde el transporte de sustancias es esencialmente convectivo (Cowan, 2000). Esta matriz polimérica es generada por las bacterias como un mecanismo de defensa y es catalogada como el verdadero responsable de los procesos de corrosión.

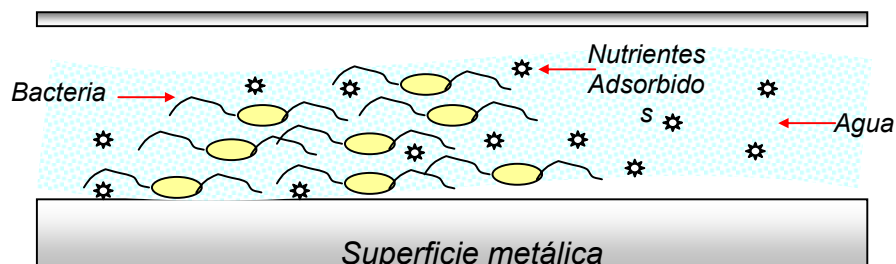
Dentro de las biopelículas los microorganismos trabajan sinérgicamente en forma de comunidades mezcladas, conformadas por diferentes tipos y grupos y cada tipo bacteriano ejecuta funciones diferentes dentro de la comunidad. Esta mutua colaboración permite a la asociación entera sobrevivir dentro de ambientes que resultarían hostiles e incluso mortales, para cada miembro si estos se desarrollaran en forma individual (Beech, 2000). Por ejemplo, en ambientes oxigénicos las bacterias anaeróbicas son inhibidas o eliminadas por la presencia de oxígeno. Dentro de una comunidad las bacterias aeróbicas residen en la capa más externa del nódulo, consumiendo el oxígeno presente en el agua. El resultado neto es la aparición de “microzonas” donde las bacterias anaeróbicas crecen y se desarrollan de forma abundante (Little, 2000).

El proceso de bioensuciamiento o formación de biopelículas, ocurre a grandes rasgos en tres fases, las cuales presentan las siguientes características (Pope, 1995):

- Adhesión de los microorganismos: En la primera fase están involucrados los microorganismos intrínsecos o asociados directamente al sistema. Estos son, por ejemplo, los provenientes de la formación en el caso de pozos de gas o petróleo y los microbios extrínsecos que contaminan las tuberías durante los procesos de construcción, operación, mantenimiento y reparación del sistema.

El sitio de adhesión de las bacterias está determinado por la adsorción previa de materia orgánica, inorgánica y agua sobre la superficie metálica inerte. (Figura 1). Además, el metal posee un perfil de anclaje y el proceso de fabricación del material potencia la unión definitiva e irreversible del microbio.

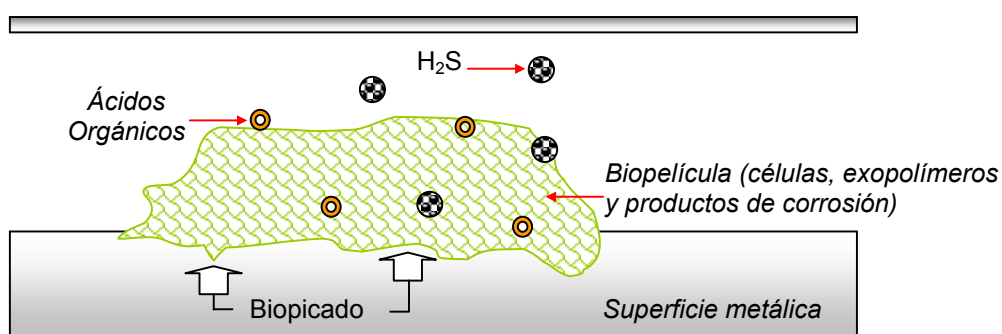
Figura 1. Primera fase de la formación de la biopelícula



Fuente: Autora.

- Crecimiento del nódulo e inicio del picado: Luego de una exitosa adhesión, se inicia la segunda fase. En la Figura 2 se exhibe sólo una fracción de toda la actividad que está referenciada debido a que en este punto una inmensa cantidad de reacciones químicas tienen lugar. La producción de desechos celulares y polímeros “pegajosos” que retienen material orgánico e inorgánico, contribuye a la aparición y desarrollo de los nódulos. Una vez formado el nódulo, éste permite que el microambiente interno se diferencie cada vez más del resto de la tubería. En este momento se inicia o acelera la corrosión.

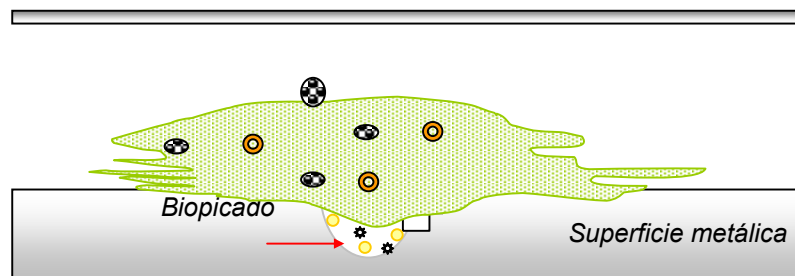
Figura 2. Segunda fase de la formación de la biopelícula



Fuente: Autora.

- Maduración del nódulo y del picado: en la tercera fase hay una continua formación de biopelícula, la cual en muchas ocasiones al sobrepasar el corte del flujo se desprende colonizando nuevas zonas más o menos alejadas del foco inicial. En esta etapa la maduración de la biopelícula guarda una relación directamente proporcional con el aumento de la profundidad y diámetro del picado (Figura 3).

Figura 3. Tercera fase de la formación de la biopelícula



Fuente: Autora

1.1.2 Métodos Químicos en el Control de la biocorrosion. La principal y más común aproximación para el control de los procesos de biodeterioro en los sistemas industriales en general, es el uso de biocidas. Un biocida, llamado también antimicrobiano o microbiocida es, en términos corrientes, una sustancia química que resulta tóxica para organismos vivos. Mientras un biocida con efecto bacteriostático simplemente retarda el crecimiento y desarrollo de las bacterias, uno con efecto bactericida, como su nombre sugiere, destruye la bacteria al dañar su estructura (Madigan, 2000).

Cuando se requiere seleccionar un biocida independientemente de su campo de aplicación, es necesario tener en cuenta las siguientes características (Chalut, 1996) (Boivin, 1995):

- Amplia efectividad y rango de acción en términos bactericidas.
- Ausencia de propiedades corrosivas.
- Facilidad para su transporte y aplicación.
- Ausencia o baja toxicidad que no dañe al ser humano y esté dentro de las regulaciones ambientales.
- Alta miscibilidad.
- Biodegradabilidad.
- Que su mecanismo de acción no sea contrarrestado por adaptaciones ambientales de los microorganismos.
- Compatibilidad con otros tratamientos químicos: inhibidores de corrosión, clarificantes, polímeros, etc.

Los biocidas pueden ser clasificados en dos grupos principales, los oxidantes y no oxidantes, los cuales se diferencian básicamente en el mecanismo de acción mediante el cual alteran el crecimiento y desarrollo bacterial.

1.1.3 BIOCIDAS CONVENCIONALES

1.1.3.1 Biocidas oxidantes. La acción de estas sustancias radica en un “efecto burning” o de fuerte oxidación de las estructuras bacterianas como la pared y la membrana celular. Los productos oxidantes son reconocidos por su alta efectividad sobre algas, hongos y bacterias, pero su eficacia disminuye drásticamente debido a que poseen baja residualidad y su acción es neutralizada por la presencia de materia orgánica y cambios de pH (Madigan, 2000).

Generalmente se emplean para el tratamiento de aguas con una baja Demanda Química de Oxígeno (DQO), y por lo tanto con una baja Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), lo que implica que las cantidades de bacterias son relativamente bajas (inferiores a 10^4 Bacterias por mililitro, Bact/ml). Las aguas de río empleadas

para surtir acueductos o para el recobro secundario de petróleo (aguas de producción), son unos de los pocos afluentes que por su composición química son propicios para el uso de este tipo de sustancias.

Las principales características de los agentes biocidas no oxidantes más usados se exponen a continuación:

Compuestos Clorados

a. Cloro: las formas activas de este elemento (ácido hipocloroso e hipoclorito), son eficaces contra todos lo microorganismos (Tuthill, 1998). El uso del cloro ofrece las siguientes ventajas (Boivin, 1995):

- Es económico.
- Posee un amplio espectro de acción.
- Es efectivo y el monitoreo de las concentraciones residuales es sencillo.

Su estrecha dependencia del pH, su baja efectividad contra las biopelículas y los peligros que al operario ofrece su manipulación constituyen sus mayores desventajas (Ostroff, 1979).

El hipoclorito de sodio y calcio son otra alternativa tan efectiva como el cloro con la ventaja de que su manipulación es menos peligrosa. Su uso puede verse limitado ya que son más costosos y la adición de grandes cantidades de calcio puede provocar problemas de “*scaling*” o producción de escamas o depósitos inorgánicos (Boivin, 1995).

b. Dióxido de cloro: Este gas es un agente oxidador fuerte que posee una alta eficiencia en el control bacteriano.

El Dióxido de Cloro (ClO_2) tiene las siguientes ventajas (Simpson, 2000):

- Es un microbicida altamente eficiente y amigable con el medio ambiente.
- Elimina los microbios de la fase planctónica, destruye biopelículas, remueve depósitos de sulfuro y desinfecta superficies.
- No se ioniza para formar ácidos débiles por lo que en un amplio rango de pH puede ser un efectivo desinfectante en concentraciones residuales de 0.2 y 0.8 ppm.
- Tolera altas concentraciones de materia orgánica.

Su principal desventaja es que por su sensibilidad a la presión y temperatura no puede ser transportado y debe generarse en campo a partir de cloruro de sodio, hipoclorito de sodio o ácido clorhídrico, mediante un proceso de electrocatálisis que puede resultar costoso (Boivin, 1995).

Bromo

Este agente es un análogo del cloro pero actúa mucho más rápido en aguas con un pH alrededor de 6.8. Habitualmente se emplea en forma de ácido hipobromoso (HOBr) el cual es un ácido más débil que el ácido hipocloroso, y se ioniza más rápidamente en aguas alcalinas. Se calcula que a un pH de 8.5, cerca del 80% del HOBr disponible permanece sin ionizarse y con una activa acción biocida.

Otra forma de este compuesto es el cloruro de bromo (BrCl), el cual corresponde a un gas similar al del cloro. Cuando reacciona con el agua forma una molécula de ácido hipobromoso y una molécula de ácido clorhídrico (HCl) (Freedman, 1986).

1.1.3.2 Biocidas no Oxidantes. Los agentes representativos de este grupo corresponden a compuestos organoazufrados, organobromurados, aminopropanos, aminas, dodecilguanidina, isotiazolones, glutaraldehído, carbonatos y sales de amonio cuaternario. Su desempeño independiente del pH y su extenso efecto de residualidad los hacen más eficaces que los oxidantes (Chalut, 1996). Su mecanismo de acción es radicalmente diferente al de los biocidas oxidantes ya que no actúan por medio de radicales libres oxidadores, sino que lo hacen bloqueando enzimas y cofactores esenciales en las vías metabólicas microbianas (Madigan, 2000).

Las principales características de los agentes biocidas no oxidantes más usados se dan a continuación:

Formaldehído

El formaldehído (HCHO), es usado generalmente como una solución acuosa al 37%. Su uso ha disminuido a pesar de su bajo costo, debido a que se necesitan altas dosis para alcanzar efectividad en el tratamiento.

Su principal desventaja es la sospecha sobre su carácter carcinogénico y el hecho de que se inactiva por combinación con amonio y sulfuro (Boivin, 1995).

Glutaraldehído

El glutaraldehído o 1,5-pentanedial ($\text{OCH}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$), es usado ampliamente en la industria del petróleo y se mezcla habitualmente con otros biocidas y surfactantes para aumentar su efectividad (Boivin, 1995). La actividad biocida del glutaraldehído se debe a la alcalinización del sulfidrilo, carboxilo, hidroxilo y grupos amino de los microorganismos, los cuales alteran el RNA, el DNA y la síntesis proteica (Espigares, 2002).

El Glutaraldehído ofrece las siguientes ventajas:

- Amplio especto de acción.
- Tolera altas salinidades, durezas y reacciona pobremente con el sulfuro.
- Es compatible con otros productos químicos para el control biológico.

Su mayor desventaja es la inactivación que sufre frente al amonio y aminas primarias.

Acroleína

Como biocida es muy efectivo por su amplio espectro de acción y gran capacidad de penetrar y disolver depósitos. Teniendo en cuenta que a temperatura ambiente se comporta como un gas tóxico, extremadamente irritante para ojos y mucosas y que debe ser inyectado mediante bombas que lo impulsan con nitrógeno libre de oxígeno, su uso se restringe por el alto riesgo, cuidadoso manejo y elevados costos que implica su utilización (Boivin, 1995).

Compuestos de Amonio Cuaternario

Constituyen el grupo de biocidas más antiguo del cual se tiene registro en la industria petrolera. Su uso está restringido para aguas con niveles de pH altos y sólidos disueltos totales bajos. Dentro de sus ventajas destacan su amplio espectro de acción, alta residualidad y baja reactividad con otros químicos. Como desventajas se pueden enumerar su acción espumante, inactivación en salmueras y lenta actividad (Boivin, 1995).

1.1.4 Biocidas No Convencionales. Es necesario generar innovadoras y eficaces alternativas no convencionales de control químico mediante nuevos “biocidas verdes” amigables con el medio ambiente, ya que la sostenibilidad económica y la protección ambiental han obligado a la creación de restricciones legales para el uso de los biocidas tradicionales, debido a su baja efectividad en campo, generando altos costos sin proveer verdaderas soluciones para el control y mitigación de las bacterias causantes de la corrosión en los sistemas industriales (C.I.C., 2004).

Las sales inorgánicas de molibdeno (Mo) poseen teóricamente, una efectiva acción bactericida sobre poblaciones de bacterias asociadas a procesos de corrosión, especialmente sobre la población sésil de BSR y cumplen con todos los requisitos exigidos para considerar su utilización, como un agente químico con acción biocida (Campaignolle, 1992).

El molibdeno, usualmente llamado “moli”, es un metal muy importante en la industria mundial. Fue descubierto por Carl Wilhelm Scheele en 1778 y obtuvo su nombre de la palabra griega molybdos. En su estado puro, el Molibdeno es un metal gris brillante y se comporta de manera similar al hierro con la diferencia que su punto de fusión es de 4730 °F y no 2795 °F como sucede con el hierro.

El molibdeno se encuentra sólo en unos pocos lugares en el planeta. Los mayores productores en el hemisferio oeste son los Estados Unidos en primer lugar, Chile en segundo y Canadá en tercer lugar. Con excepción de China, la producción en el resto del globo es muy discreta.

Luego del craqueo, el mineral de molibdeno es concentrado por flotación hasta la producción de grandes cantidades de molibdenita, la cual es sulfuro de molibdeno. Esta forma cristalina puede ser purificada y empleada en la industria de la fabricación de lubricantes. Sin embargo, la mayor cantidad de molibdenita es

concentrada y sometida a un proceso denominado tostación mediante el cual se remueve el sulfuro y se reemplaza por óxido. Este óxido conocido como óxido molíbdico técnico es la forma más fácil de añadir el molibdeno al acero sin perder mucho Molibdeno durante la operación de fundición. Una mezcla de óxido molíbdico y óxido de hierro puede ser reducido a ferromolibdeno por aluminio en una reacción térmica. Las fundidoras generalmente usan ferromolibdeno para añadir el molibdeno a la aleación de hierro y acero, y otros sectores prefieren el óxido molíbdico para algunos tipos de aceros.

En cuanto a la sal de molibdato de sodio, está siendo utilizada como componente de los inhibidores para el tratamiento de la corrosión en aguas de enfriamiento. Una importante característica del molibdato es su seguridad ambiental, debido a que no se considera como una sustancia tóxica; por esta razón, frecuentemente se ha ido sustituyendo aquellos inhibidores que contienen cromatos por las sales de molibdato (Freedman, 1986).

1.2 PRUEBAS DE TOXICIDAD O BIOENSAYOS

Los bioensayos, o pruebas de toxicidad son experimentos que miden el efecto de uno o más contaminantes en una o más especies, permitiendo evaluar el grado de toxicidad de una sustancia química, de un efluente, un cuerpo de agua, etc., mediante el uso de organismos vivos (Greenberg, 1992).

Las primeras pruebas de toxicidad aguda fueron desarrolladas por Penny y Adams (1863) y Weigelt, Asare y Schwab (1885), debido a la preocupación generada por el vertimiento de químicos tóxicos provenientes de las aguas residuales industriales. En 1924, Carpenter publicó el primero de varios de los documentos acerca de la toxicidad de los metales pesados de minas de plomo y zinc en peces. Ellis (1937) comenzó a utilizar *D. magna* como especie para la evaluación de la contaminación de ríos y Anderson (1944) amplió el trabajo de Ellis junto con el

inicio de la estandarización de los procedimientos para pruebas de toxicidad con *D. magna*. En 1951, Doudoroff realizó la primera publicación que condujo al primer procedimiento estandarizado, el cual fue eventualmente incluido en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. En busca de continuar el proceso de estandarización de las pruebas acuáticas, la EPA patrocinó un taller y publicó un documento titulado *Standard Methods for Acute Toxicity Test for Fish and Invertebrates*. Esta publicación ha sido el iniciador de subsecuentes estándares que han sido utilizados a nivel mundial (Hoffman, 1995).

1.2.1 Tipos de Bioensayos. Los ensayos de toxicidad se pueden clasificar de acuerdo al procedimiento, la duración del ensayo y la infraestructura del laboratorio.

1.2.1.1 Según el procedimiento: este tipo de ensayos de toxicidad comprende (Greenberg, 1992) (Restrepo, 1998):

- a. Ensayos de toxicidad con muestra única: Son aquellos que se realizan a partir de una sustancia química pura conocida o con una muestra única de aguas residuales complejas. Estos bioensayos permiten determinar la concentración necesaria para producir una cierta respuesta indicativa de toxicidad de las muestras evaluadas. El desarrollo de estos ensayos se realiza a nivel de laboratorio.
- b. Ensayos de toxicidad con efluentes: Se realizan para determinar la calidad toxicológica de un efluente de vertimiento constante o variable. El agua residual se toma continuamente de una conducción de descarga perforada en un punto apropiado, de modo que las diluciones de ensayo se reemplacen también continuamente, con diluciones del efluente análogas a las que se descargan en el momento. En estos bioensayos las diluciones permanecen

inalteradas, pero la toxicidad de cada dilución examinada fluctúa a lo largo del ensayo paralelamente a las fluctuaciones en la calidad del efluente.

- c. Ensayos de toxicidad de alarma en efluentes. Estos se realizan en el sitio de descarga y permiten determinar si las aguas receptoras del vertimiento o de otros contaminantes producen una respuesta medible, que por lo general es la muerte de los organismos de ensayo. Estos se exponen experimentalmente a la acción de las aguas del caso en jaulas u otro tipo de recipientes, o en acuarios, en que se bombea el agua. Estos ensayos se pueden hacer a distintas distancias de un desagüe, donde las aguas residuales se han diluido y naturalmente envejecido en grados diversos. A este también se le denomina bioensayo *in situ*.

1.2.1.2 Según el tipo de respuesta: Los bioensayos según el tipo de respuesta (Hoffman, 1995)(Restrepo, 1998), pueden clasificarse de la siguiente manera:

- a. Bioensayos agudos: Los bioensayos agudos cuantifican las concentraciones letales de una o más sustancias a una especie en particular y por lo general, son de corta exposición (24-48 horas). El tiempo del bioensayo debe ser constante y suficiente para que los efectos de las sustancias evaluadas proporcionen respuestas claras y bien definidas en las especies expuestas. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL50), y representa la concentración que causa la muerte al 50 % de la población experimental, en un tiempo determinado.
- b. Bioensayos crónicos: Por definición son bioensayos de larga exposición, generalmente días, semanas e incluso meses y se extiende sobre un periodo de vida de las especies utilizando como medida de la respuesta parámetros tales como capacidad reproductiva, crecimiento, longevidad, número de crías, etc. Son ensayos que utilizan concentraciones tan bajas que los factores

biológicos (como la edad) o los parámetros medioambientales (como temperatura), dentro de un rango ecológicamente razonable, ejercen una pequeña influencia en la susceptibilidad de los organismos. Se estima la concentración efectiva media (CE50), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del estadio de vida considerado o del ciclo de vida del organismo empleado.

1.2.1.3 Según la infraestructura del laboratorio: estos bioensayos pueden ser clasificados en (Greenberg, 1992) (Restrepo, 1998):

- a. Sistemas estáticos: se efectúa sin la renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo. Las desventajas están dadas por la posible degradación de las sustancias a ensayar y a la acumulación de las excretas de los animales en los recipientes durante el ensayo.

Según la renovación pueden subdividirse en:

- Sin renovación: los organismos se exponen a la misma solución de prueba el tiempo de duración del ensayo.

- Con renovación: los especímenes se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada, periódicamente (generalmente cada 24 horas). Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo.

- b. De flujo continuo: Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales, a través de

una fuente de suministro de agua y una unidad dosificadora de la sustancia a evaluar. Esta última, generalmente está dada por una bomba, una válvula, un sifón o una torre de distribución constante de las sustancias a ensayar y eliminan la mayoría de los efectos negativos que aparecen en los sistemas estáticos.

1.2.2 Especies usadas en bioensayos

1.2.2.1 Selección de Especies. Para obtener la máxima información de los bioensayos es necesario escoger los organismos más apropiados. Algunos autores (Henry, 1997) (GTC 31, 1996), han basado la selección de organismos experimentales en los siguientes criterios:

- a. Amplia distribución geográfica.
- b. Abundantes y disponibles todo el año.
- c. De importancia recreacional, económica y ecológica, local y nacional.
- d. De fácil mantenimiento en laboratorio. Los organismos deben presentar un tamaño adecuado a las facilidades de instalación y manejo.
- e. Buen conocimiento de su biología y comportamiento. Los organismos acuáticos frecuentemente tienen ciclos de vida y requerimientos de cultivo y de manejo complejos. Deben ser considerados sólo aquellos organismos de los que se tiene información suficiente en cada una de estas áreas.
- f. Las funciones biológicas a estudiar de fácil definición y observación.
- g. Susceptibles a exposiciones con sustancias xenobióticas. Garantizando cubrir el peor de los escenarios, y proporcionando resultados que ofrecen una alta protección al resto de la cadena trófica.

El uso de más de una especie permitirá una determinación más cuidadosa de toxicidad porque los organismos acuáticos varían en su respuesta a las sustancias tóxicas. Por ejemplo, los peces pueden ser más sensibles que los invertebrados a

una sustancia química, mientras que puede suceder lo contrario con otra sustancia química (GTC 31, 1996).

Además, deben ser incluidos en el ensayo, especies que representen diferentes niveles tróficos. Siguiendo estos criterios se han estandarizado las técnicas de bioensayo en diferentes organismos, buscando un representante de cada hábitat acuático, para poder tener una información más exacta del verdadero impacto de un contaminante en los ecosistemas (Restrepo, 1998).

1.2.2.2 Adaptabilidad de los organismos: antes de realizar la selección de las especies es muy importante conocer la adaptabilidad y el propósito que se persigue mediante los bioensayos. En la Tabla 2 se describen para los diferentes organismos su adaptabilidad y la frecuencia de uso en bioensayos.

Tabla 2. Adaptabilidad de los organismos como especies para bioensayos (CEPIS-OPS, 1997)(Henry, 1997).

| ORGANISMOS PARA BIOENSAYOS | ADAPTABILIDAD DEL ORGANISMO | | USADO CON FRECUENCIA | OBSERVACIONES |
|----------------------------|-----------------------------|---|----------------------|---|
| | CULTIVO LABORATORIO | RECOLECCIÓN EN CAMPO | | |
| Algas | Excelente | Difícil de recolectar y de mantener un cultivo puro | Sí | Las algas representan un componente importante de cualquier comunidad acuática porque son el primer eslabón en la cadena alimenticia. Una sustancia tóxica no necesita ser directamente tóxica a los peces y otros animales acuáticos para impactar severamente sobre la salud de un sistema acuático. |
| Protozoos | Excelente | Muy difícil de recolectar | Muy limitado | Aunque los protozoos se cultivan fácilmente en el laboratorio, esta especie no hay sido ampliamente aceptada como un organismo estándar para bioensayos. Probablemente esto es debido a su pequeño tamaño y a las dificultades asociadas con la determinación de su respuesta a la sustancia tóxica, por ejemplo, el número de individuos vivos versus el número de muertos. |
| Invertebrados | | | | Los invertebrados son un grupo mucho más diverso que las algas o los peces, con diferencias dramáticas en su forma física, sus características históricas de vida y sus requisitos de cultivo. |
| PLANCTÓNICOS | | | | |
| Rotíferos | Bueno | Muy difícil de recolectar, cultivo puro | Limitado | Los rotíferos son invertebrados que son fácilmente cultivados en el laboratorio pero no han sido ampliamente utilizados, probablemente, debido a su pequeño tamaño. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una prueba que permite la eclosión de los organismos de prueba de los huevos secos y la evaluación de toxicidad rápida. Hasta la fecha esta prueba no ha sido usada extensivamente. |

| | | | | |
|-----------------|-----------|---|----------|---|
| Cladóceros | Excelente | Alta tasa de mortandad después de la recolección de campo | Sí | Los cladóceros, incluyendo dáfnidos, están dentro de los organismos más utilizados para bioensayos porque representa un eslabón intermedio importante en la cadena alimenticia ubicándose entre los productores primarios y los peces. Además presentan una alta sensibilidad a sustancias tóxicas en el agua, se encuentran en un amplio rango de hábitats, tienen un ciclo de vida corto y un pequeño tamaño para manejo en laboratorio. |
| Copépodos | Mediano | Alta tasa de mortandad después de la recolección de campo | Limitado | Los copépodos no han sido extensamente usados como organismos para bioensayos, aunque existen procedimientos y métodos de cultivo para varias especies. Los copépodos tienen reproducción sexual (se requieren de machos y hembras) y nadan muy rápidamente, haciendo difícil su captura. Es probable que estas características hayan limitado su uso en bioensayos. |
| Camarones | Bueno | Bueno | Sí | Los camarones, particularmente algunas especies de aguas saladas y de estuarios, tales como <i>Mysidopsis</i> sp., han sido usados extensivamente en bioensayos agudos. Los organismos pueden ser cultivados en el laboratorio o recolectados en el campo. Los camarones se reproducen sexualmente y por lo tanto los métodos de cultivo son algo más complicados que para los cladóceros. Sin embargo, se han cultivado camarones en forma satisfactoria en el laboratorio. |
| BÉNTICOS | | | | |
| Anélidos | Mediano | Mediano | Limitado | Los anélidos no han sido muy usados para bioensayos de agua dulce aunque las pruebas de agua salada con animales recolectados en el campo son más comunes. Existen protocolos para cultivo y pruebas para ambos grupos. |
| Insectos | Bajo | Mediano | Sí | Los insectos acuáticos son un grupo increíblemente diverso de organismos. La característica más sobresaliente relacionada a bioensayos es que las larvas o los organismos jóvenes son acuáticos, mientras que los adultos son terrestres y aéreos. Esta característica complica el proceso de cultivo de laboratorio, aunque se han desarrollado métodos exitosos para especies tales como <i>Chironomus</i> . Muchos insectos acuáticos pueden recolectarse de ríos o lagos y transferirse al laboratorio satisfactoriamente. El |

| | | | | |
|------------|-----------|---|----|--|
| | | | | problema principal está asociado con los cortos ciclos de vida, lo que significa que la etapa apropiada puede no estar disponible todo el año. |
| Moluscos | Bueno | Mediano | Sí | Los moluscos incluyen caracoles, almejas y ostras. Los caracoles no son estrictamente organismos bentónicos pero son apropiados para bioensayos porque ellos pueden criarse en el laboratorio y recolectarse del campo. Sin embargo, muy raras veces son considerados como organismos estándares para bioensayos. |
| Crustáceos | Bajo | Mediano | Sí | Los anfípodos son crustáceos bentónicos que han sido usados satisfactoriamente en bioensayos, principalmente, recolectados del campo. Si una fuente de anfípodos es identificada, existe suficiente información en la literatura para desarrollar protocolos para su examen. |
| Peces | Excelente | Alta tasa de mortandad después de la recolección de campo | Sí | Los peces todavía están considerados por muchos toxicólogos acuáticos como los organismos de prueba más apropiados porque tienen la importancia más directa a los seres humanos. Los peces ofrecen la ventaja adicional de permitir análisis biológicos más sofisticados tales como estudios histológicos y patológicos. Además, debido a que los peces son consumidos directamente por los seres humanos, la información acerca de la concentración de las sustancias tóxicas en sus tejidos es un componente importante de un programa toxicológico. |

Fuente: Autora

1.2.3 Condiciones generales para la ejecución de bioensayos. Las condiciones generales que deben ser mantenidas para desarrollar un ensayo de toxicidad con organismos acuáticos, están basadas en los siguientes aspectos: una apropiada fuente de organismos de experimentación sanos, un aporte abundante de agua de calidad deseada y un espacio idóneo con un equipo de mantenimiento, cultivo y pruebas adecuados.

1.2.3.1 Organismos experimentales. Los organismos experimentales deben ser proporcionados a partir de cultivos de laboratorio, distribuidores comerciales o colecciones de campo de organismos silvestres. Cuando se recolectan especies silvestres no siempre es posible asegurar la ausencia de exposición de las especies a sitios contaminados, por lo tanto, se debe tomar una muestra individual para determinar si hay acumulados pesticidas, metales pesados o tóxicos que se pretendan ensayar (Greenberg, 1992).

1.2.3.2 Instalaciones del laboratorio. Para desarrollar este tipo de ensayos es necesario contar con apropiadas adecuaciones físicas y materiales, que permitan mantener un ambiente propicio para el desarrollo y mantenimiento de las especies de prueba.

Ubicación: Las instalaciones del cultivo preferiblemente deben encontrarse aisladas de las instalaciones experimentales, con la finalidad de prevenir o reducir la posibilidad de contaminación por volátiles liberados desde las muestras y soluciones de prueba (Environmental Canada, 1990).

Ventilación: las instalaciones deben encontrarse bien ventiladas y aisladas de contaminantes como polvo, gases tóxicos, etc. que puedan afectar a los organismos experimentales.

Regulación de la temperatura: Para obtener la temperatura deseada del agua de dilución es usado dispositivos de calentamiento o enfriado según las condiciones que requiere el organismo de prueba. Para pruebas estáticas con organismos de agua templada se puede utilizar un recinto caliente o una incubadora con controles termostáticos. Para organismos de agua fría, se puede recurrir a sitios aislados con temperatura constante regulada a través de aire acondicionado. En general, los organismos no deben estar expuestos a cambios rápidos en la temperatura del agua, específicamente más de 3°C en un periodo de 24 horas (Greenberg, 1992).

Composición de los materiales: Los recipientes de cultivo y accesorios que entran en contacto con los organismos experimentales deben estar fabricados en materiales no tóxicos (vidrio, acero inoxidable, materiales de Nalgene, porcelana o polietileno). Materiales tales como cobre, bronce, metal galvanizado, plomo y caucho natural no deben ser usados durante la manipulación del cultivo, las muestras para ensayo, el agua de dilución y las soluciones de prueba (EPA, 1996).

1.2.3.3 Agua de dilución/control. La elección del agua de dilución depende de algunas variables incluyendo los materiales a ensayar, la dureza de la solución a probar y la dureza y tipo de agua a la cual, los organismos experimentales han sido aclimatados. Por consiguiente, el agua de dilución/control puede ser obtenida de aguas subterráneas, aguas superficiales sin contaminación (de ríos o lagos), agua municipal declorada y de una fuente no contaminada o agua reconstituida de un pH y una dureza apropiadas (EPA, 1996).

Idealmente, la calidad del agua de cultivo y del agua de dilución/control deberían ser idénticas o esencialmente la misma; en caso contrario, es importante que la dureza de todas las soluciones de prueba no difieran apreciablemente del agua de cultivo. Además, antes de comenzar el ensayo, debe determinarse la dureza del

agua de dilución para comprobar que ésta no vaya a afectar a las especies que van a ser expuestas (Environmental Canada, 1990).

1.2.3.4 Propiedades y almacenamiento de las muestras: debe obtenerse la mayor cantidad de información relacionada con el producto que se desea evaluar, incluyendo solubilidad en agua, presión de vapor, estabilidad química, constantes de disociación, n-octanol (coeficiente de partición del agua) y biodegradabilidad. Además, otros datos como la fórmula estructural, el grado de pureza, el grado de impurezas y la presencia y cantidad de aditivos. Este tipo de información puede consultarse en las hojas de seguridad del químico o MDSS (material data safety sheets) .

El envase que contiene la sustancia química de prueba, debe ser sellado y etiquetado con el nombre del químico y los datos de recepción. Debe mantenerse rigurosamente las condiciones de almacenamiento como temperatura, protección de la luz, etc. para garantizar la conservación de la naturaleza del químico (Greenberg, 1992).

1.2.3.5 Preparación de las soluciones de prueba: la preparación de cada una de las concentraciones de los químicos puede realizarse tanto individualmente o mediante la preparación de una solución stock. Para la preparación de estas soluciones deben emplearse el agua de dilución/control.

Durante el transcurso del ensayo, es conveniente examinar cada una de las soluciones de prueba para evidenciar cambios en el químico (por ejemplo, color de la solución y opacidad, precipitación o floculación del químico). En lo posible puede optarse por la medición de la concentración del químico, a cada una de las soluciones preparadas, con el fin de comprobar su estabilidad. Si esta medición indica que hubo una pérdida mayor del 20% durante la prueba, debe reevaluarse el

método por uno en el que las soluciones sean reemplazadas continuamente (ver numeral 1.2.1.3. Flujo continuo) (Greenberg, 1992).

1.2.4 Ensayos preliminares y definitivos. En los ensayos de toxicidad aguda el efecto adverso detectado es la muerte de la especie de prueba y la medida de evaluación es la dosis letal 50 (DL50) o la muerte del 50% de los organismos en un periodo de tiempo especificado (ASTM E729-88a). La prueba en su totalidad, consta de dos ensayos denominados preliminares y definitivos.

Ensayos preliminares: este ensayo es empleado para determinar el intervalo de toxicidad de la sustancia de prueba que será cubierto en el ensayo definitivo. Es una prueba de corta duración, mínimo 24 horas y máximo 48 horas. Los organismos son expuestos a una amplia gama de concentraciones, usualmente en una proporción logarítmica, tal como 0.1, 1, 10, 100 ppm y un control o “blanco”. Debe incluirse concentraciones que eliminen a todos los organismos, y otras que maten a pocos o a ninguno (GTC, 1996).

Ensayos definitivos: a partir de los ensayos preliminares se obtiene el intervalo de la dosis letal para que, posteriormente, se proceda a efectuar el ensayo definitivo el cual debe ser realizado utilizando diferentes concentraciones (por lo general de 5 a 7 y obtenidas a partir de una serie geométrica) dentro del intervalo de toxicidad detectado en los ensayos preliminares. Este ensayo se evalúa a las 48 horas y en algunos casos especiales, como en bioensayos con peces, se reportan los resultados con 96 horas de exposición (GTC, 1996).

1.2.5 Calculo, Análisis y Resultados de la prueba. La precisión de una prueba biológica está limitada por diversos factores entre los que se incluye la variación biológica interindividual que es normal dentro de una especie. Los estudios realizados con una especie escogida al azar no soportan una información precisa sobre la toxicidad que ejerce un compuesto sobre otras especies o estadíos biológicos o sobre una biota completa. Una prueba realizada con una especie tan sólo aporta una estimación precisa de la toxicidad referente a especies de tamaño, edad y condición fisiológica similares, en aguas de características parecidas y bajo condiciones de ensayo semejantes (Greenberg, 1992).

Los datos de las pruebas de toxicidad aguda se pueden reportar como la proporción de muertes en cada nivel de concentración por periodo de exposición; lo que se conoce como relación dosis-respuesta y corresponde a un modelo sigmoideal. La curva dosis-respuesta muestra que el porcentaje de mortalidad se incrementa rápidamente, pero luego se estabiliza a medida que la concentración aumenta, pero esta curva puede convertirse en una línea recta al transformar las respuestas a una escala diferente (por ejemplo, a la escala Probit) (Mejía, 1995).

Los métodos computacionales más ampliamente utilizados para el cálculo de la DL_{50} y sus límites de confianza son el Probit, Finney, Logit, Media Flotante y Litchfield-Wilcoxon (Greenberg, 1992).

1.2.6 Bioensayos de Toxicidad Aguda con Cladóceros

1.2.6.1 Generalidades de los Cladóceros: dentro de los organismos comúnmente utilizados en los bioensayos de toxicidad se encuentran los cladóceros, también llamados pulgas de agua, los cuales son microcrustáceos pertenecientes al mismo orden pero a diferentes familias entre ellas Daphnidae, Moinidae, entre otras (Ver Tabla 3).



Tabla 3. Clasificación taxonómica de los cladóceros

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| PHYLUM | Arthropoda | Arthropoda |
| CLASE | Crustácea | Crustácea |
| SUBCLASE | Braquiopoda | Braquiopoda |
| SUPERORDEN | Diplostraca | Diplostraca |
| ORDEN | Cladóceras | Cladóceras |
| SUBORDEN | Eucladóceras | Eucladóceras |
| SUPERFAMILIA | Chydroidea | Chydroidea |
| FAMILIA | Daphnidae | Moinidae |
| GÉNERO | Daphnia | Moinodaphnia |

Del género *Daphnia*, las especies más utilizadas para la ejecución de bioensayos de toxicidad son *Daphnia magna* y *Daphnia pulex*. Estas especies son organismos limnéticos que constituyen uno de los mayores componentes del zooplancton en el agua dulce a nivel mundial y los herbívoros predominantes en los lagos; son encontrados en las márgenes de la vegetación de ríos, lagos y charcos, siendo *D. pulex* más cosmopolita en su distribución que *D. magna*.

Las daphnias son euritérmicas, sólo pocas especies poseen una distribución geográfica limitada por la temperatura. Estos organismos no toleran concentraciones inferiores a un mg/L de oxígeno disuelto y casi todas se encuentran en aguas con un pH entre 6.5 y 8.2 unidades.

Tabla 4. Principales características de las especies más estudiadas del género *Daphnia* (López, 1996)

| <i>Daphnia magna</i> | |
|---|--|
|  | <p>Es la mayor de las especies y alcanza un tamaño de 5 a 6 mm. Se pueden criar en gran cantidad, en espacios relativamente pequeños. Las recién nacidas miden 0,8 a 1 mm de largo y se pueden observar sin ayudas ópticas. Se sabe que las hembras de <i>D. magna</i> viven hasta 4 meses a 20°C. Se alimenta de bacterias, algas y levaduras, junto con extractos de suelo y materiales orgánicos como harina de semilla de algodón, harina de arenque, hierba seca en polvo, gránulos de alevines de trucha enriquecidos. Estas especies se encuentran naturalmente solo en aguas duras (>150 mg/L).</p> |
| <i>Daphnia pulex</i> | |
|  | <p>Esta especie alcanza un máximo de longitud de 3,5 mm. Reside principalmente en charcos, secciones estancadas de corrientes y ríos. <i>D. pulex</i> puede encontrarse naturalmente tanto en aguas duras como blandas.</p> |

Fuente: (López, 1996)

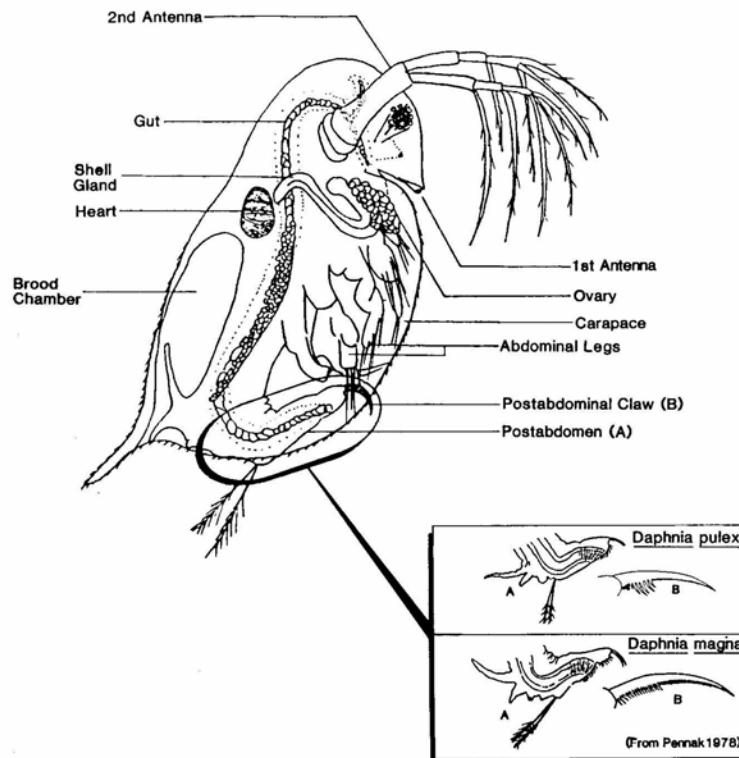
Anatomía

Los dáfnidos presentan un caparazón (bivalvo) que encierra al tronco, pero no a la cabeza y suele terminar posteriormente en una espina apical. La cabeza porta un sólo ojo nauplio mediano, también posee antenas frecuentemente largas y utilizadas en la natación. Además, presenta de cuatro a seis pares de apéndices troncales y el potsabdomen está girado ventralmente hacia delante. El postabdomen lleva dos garras grandes usadas principalmente para la limpieza del

caparazón, las cuales permiten la diferenciación entre las especies de *D. magna* y *D. pulex* (Figura 4).

La natación es llevada a cabo por los movimientos hacia abajo de las segundas antenas grandes. La mayoría de estos organismos son pálidos y transparentes.

Figura 4. Anatomía de una hembra de *Daphnia* spp. En el recuadro se puede observar la diferencia entre *D. pulex* y *D. magna*, por la forma y tamaño de las garras del postabdomen (Enviromental Canada, 1990).



Fuente: (Enviromental Canada, 1990).

Ciclo de vida

La reproducción de la *Daphnia* puede limitarse a producir hembras por partenogénesis diploide o asexualmente (Figura 5) cuando se mantienen condiciones de cultivo adecuadas, asegurando así un suministro de animales experimentales cuya variabilidad genética se limita a la heterocigosis del padre. Si el medio se torna desfavorable se reproducen sexualmente, apareciendo en la población hembras que producen huevos de resistencia llamados epifios y machos, los cuales fecundarán estos huevos. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables estos epifios darán hembras partenogenéticas (Enviromental Canada, 1990).

Desde su nacimiento hasta la maduración, las dafnias experimentan una serie de mudas. La periodicidad de las mudas depende principalmente de la temperatura y de la oferta ambiental de alimento. En el ciclo de vida de *Daphnia* se presentan cuatro estados de desarrollo: huevos, juvenil, adolescente y adulto. Los huevos partenogenéticos se desarrollan en el ovario y son liberados a la cámara embrionaria (Mejía, 1995).

Figura 5. Reproducción partenogenética de *Daphnia spp.* Se pueden observar los huevos partenogenéticos.



Fuente: (Mejía, 1995).

En el primer instar el joven o neonato, morfológicamente similar al adulto, es liberado de la cámara embrionaria al exterior en un periodo de dos días. En este estadio se presentan pocos instares (de tres a cinco) pero se da un crecimiento rápido en tamaño y volumen. En el periodo adolescente sólo se presenta un instar, al final de éste y en el primer instar adulto, el animal muda y los primeros huevos partenogénéticos alcanzan su máximo desarrollo (Mejía, 1995).

D. pulex presenta tres a cuatro instares siendo joven, un instar cuando es adolescente y de 18 a 25 instares en la adultez; la duración de cada uno puede ser desde un día hasta varias semanas, dependiendo de las condiciones ambientales.

Cuando las condiciones de cultivo son óptimas, la hembra de *D. magna* libera las primeras crías en 10 días a 20°C, y en 7 días a 25°C. A partir de entonces, las crías son liberadas cada 3 o 4 días a 20°C y cada 2 o 3 días a 25°C. Se producen 20 o más crías por puesta, siempre que las condiciones de cultivo se mantengan adecuadas. Una sola hembra puede producir hasta 400 crías durante su vida (Greenberg, 1992).

1.2.6.2 Condiciones generales para la ejecución de bioensayos con Daphnia

a. Selección de las especies: La selección de las especies de Daphnia para las pruebas de toxicidad depende de la dureza del agua de control o dilución; cuando esta última es menor de 80 mg/L se recomienda ensayar con *D. pulex* y si el agua tiene un valor mayor o igual de 80 mg/L se usa como organismo experimental *D. magna*. Una disminución en el valor de la dureza del agua puede ocasionar la mortalidad de los individuos de *D. magna* por estrés osmótico, asimismo, un estrés subletal podría afectar la resistencia a la sustancia que está siendo ensayada (Environmental Canada, 1990).

Para el ensayo de toxicidad, son utilizados los neonatos dáfnidos de ≤ 24 horas de nacidos, los cuales son obtenidos por la transferencia de hembras grávidas (cuya edad debe oscilar entre 2 a 4 semanas) desde un cultivo a recipientes pequeños con agua de dilución. Es importante que todos los organismos usados para la prueba provengan del mismo cultivo (Greenberg, 1992).

b. Mantenimiento de los cultivos: el agua de los cultivos de dáfnidos debe reemplazarse al menos semanalmente y la población debe mantenerse en aproximadamente 20 animales o menos por cada litro de agua. Si el medio no es reemplazado semanalmente y la población no es reducida a un nivel aceptable, los productos residuales de los individuos se acumularán y podrían causar una disminución de la población o la producción de machos y/o epifios. Una densidad menor a la anterior, de tan sólo cuatro adultos por litro, puede generar mejores resultados al evitar la producción de epifios, en particular con *D. magna*.

Una alternativa para el mantenimiento es comenzar con nuevos cultivos cada semana, usando agua fresca y neonatos del cultivo de la semana anterior. Los cultivos de tres (3) edades sucesivas pueden mantenerse fácilmente (madres, hijas y nietas), conservando réplicas de cada recipiente representativo de cada edad (evitando la pérdida de la totalidad de la población ante cualquier eventualidad en el recipiente). De esta manera, los adultos de 2 a 5 semanas tendrán siempre la capacidad de proporcionar los neonatos para las pruebas (Environmental Canada, 1990)..

c. Iluminación: la intensidad de la luz no debe exceder los 800 lux en la superficie del agua. Se recomienda el uso de luces fluorescentes frías. El foto periodo normalmente es de 16 ± 1 h : 8 ± 1 h, ciclo luz : oscuridad (EPA, 1996).

d. Agua: la fuente de agua para el cultivo de los dáfnidos puede obtenerse a partir de agua superficial o subterránea no contaminadas, agua para consumo

humano o agua reconstituida ajustada a una dureza dada. El agua suministrada es aceptable cuando garantiza la supervivencia, salud, crecimiento y reproducción de las especies.

La calidad del agua usada para el mantenimiento y ensayos con cladóceros debe ser monitoreada mediante la determinación de los siguientes parámetros: dureza, alcalinidad, cloro residual (si es agua de grifo), pH, materia orgánica total, demanda química de oxígeno (DQO), conductividad, sólidos suspendidos, oxígeno disuelto, gases disueltos totales, temperatura, nitrógeno, nitratos, metales y pesticidas organofosforados (EPA, 1996). La concentración de los principales parámetros considerados para la determinación de la calidad del agua, se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros para la determinación de la calidad del agua de dilución o de cultivo (EPA, 1996).

| SUSTANCIA | CONCENTRACIÓN MÁXIMA |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Dureza (como CaCO ₃) | 180 mg/L |
| Material particulado | 20 mg/L |
| Materia orgánica total | 2 mg/L |
| DQO | 5 mg/L |
| Amonio | 20 µg/L |
| Cloro residual | < 3 µg/L |
| Pesticidas organofosforados totales | 50 ng/L |

Fuente: (EPA, 1996)

Si es usada agua para consumo humano, debe garantizarse una efectiva eliminación del cloro residual hasta una concentración de ≤ 0.002 mg/L. El uso de filtros con carbón activado y la radiación ultravioleta es recomendada para este propósito. Además debe evitarse utilizar un agua que se encuentre sobresaturada de gases.

e. Temperatura: la temperatura del agua de cultivo puede mantenerse en un rango de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, mediante el uso de incubadora, baño de agua, temperatura ambiental controlada o regulación de la temperatura del acuario. Si el cultivo está siendo manejado fuera de este rango, la temperatura se ajustará gradualmente ($\leq 3^\circ\text{C}/\text{día}$) hasta los valores esperados y mantenerse por un mínimo de dos semanas (Mejía, 1996).

f. Oxígeno Disuelto: el agua para los cultivos puede ser aireada vigorosamente antes de su uso con el fin de saturarla con oxígeno y reducir alguna sobresaturación con gases. Seguida de la aireación, el agua puede mantenerse sin airear por aproximadamente 0.5 horas antes de su uso en los cultivos, permitiendo la liberación de burbujas de aire y el equilibrio final del pH, el oxígeno disuelto y otros gases. El oxígeno disuelto contenido en los cultivos no debe ser menor del 60% de saturación de aire. Puede mantenerse este nivel de OD mediante la aireación con bombas (Enviromental Canada, 1990).

g. pH: el pH usado para el cultivo de *Daphnia* debe mantenerse entre 6.0 - 8.5; pero los valores considerados como óptimos se encuentran en un rango de pH de 6.5 - 8.5.

h. Dureza: el agua natural ya sea de superficie, subterránea o agua declorada de grifo, es usada para el cultivo y como agua de dilución y si *D. magna* es el organismo experimental, se recomienda un agua con una dureza entre 80 a 250 mg/L. En cuanto a *D. pulex* se puede usar un agua natural con una dureza entre 10 a 250 mg/L. El agua con una dureza mayor de 250 mg/L no puede ser empleada excepto en donde el efecto de la dureza del agua en la toxicidad aguda esta bajo investigación.

El agua reconstituida es otra alternativa para los procedimientos que requieren cierto grado de estandarización del agua de cultivo o de dilución. Se recomienda

utilizar un agua reconstituida blanda con los siguientes valores de dureza según la especie: para *D. pulex* una dureza total de 40 a 48 mg/L y para *D. magna* entre 80 a 100 mg/L (EPA, 1996).

La preparación del agua reconstituida con una dureza determinada se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de agua reconstituida (Enviromental Canada, 1990)

| TIPO DE AGUA | REACTIVOS (mg/L) | | | | CALIDAD FINAL DEL AGUA | |
|----------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------|-----|-------------------------------------|---------|
| | NaHCO ₃ | CaSO ₄ ·2H ₂ O | MgSO ₄ | KCl | Dureza (mg/L CaCO ₃) | pH |
| Muy blanda | 12 | 7.5 | 7.5 | 0.5 | 10-13 | 6.4-6.8 |
| Blanda | 48 | 30 | 30 | 2 | 40-48 | 7.2-7.6 |
| Moderadamente blanda | 96 | 60 | 60 | 4 | 80-100 | 7.4-7.8 |
| Dura | 192 | 120 | 120 | 8 | 160-180 | 7.6-8.0 |
| Muy dura | 384 | 240 | 240 | 16 | 280-320 | 8.0-8.4 |

Fuente: (Enviromental Canada, 1990)

Los dáfidos deben ser cultivados por un tiempo mínimo de siete (7) días en agua con una dureza idéntica o similar a la que se utilizará como agua de dilución.

i. Alimentación: la alimentación es requerida durante el cultivo de los dáfidos. El alimento usado debe ser suficiente y adecuado para mantener los organismos experimentales en un estado nutricional que soporte la actividad metabólica normal, asegurando los criterios de salud mínimos.

Las Daphnias pueden ser alimentadas con cultivos de algas verdes (*Selenastrum capricornutum* y/o *Chlorella pyrenoidosa*) y una mezcla de dos o más especies, particularmente entre algas verdes y diatomeas tales como *Nitzschia frustulum*

(Mejía, 1996). Otra alternativa de alimentación conjuga una alimentación con algas y un preparado de levaduras y carne de trucha.

j. Criterios de salud: los cultivos de *Daphnia* empleados en pruebas de toxicidad deben cumplir con los siguientes criterios de salud (Environmental Canada, 1990):

- Ausencia de epifios en el cultivo.
- Menos del 25% de stock de crías pueden morir dentro del periodo de siete días precedentes a la prueba, asumiendo un cultivo con mezcla de edades.
- El tiempo para la primera cría no puede exceder de 12 días.
- Las hembras de 2 a 5 semanas deben producir en promedio un total de 15 o más neonatos por camada.

1.2.7 Bioensayos de toxicidad aguda con algas

Generalidades de las algas: Las algas son habitantes ubicuos de los cuerpos de agua y organismos representativos de la comunidad fitoplanctónica. Su importancia ecológica reside principalmente en dos aspectos, el primero está relacionado con su acción como indicadores biológicos de calidad del agua, y en segundo lugar, por su papel como productores primarios, señalando que el efecto de un compuesto xenobiótico sobre esta población, puede acompañar cambios en la producción secundaria. Este último evento, puede generar efectos destructivos sobre la cadena alimentaria produciendo graves modificaciones sobre la estructura y funcionamiento de los ecosistemas. Por esta razón, ensayos de laboratorio con estos organismos pueden dar información valiosa para el manejo y protección ambiental de estos sistemas.

Las principales ventajas y desventajas encontradas en la aplicación de algas para pruebas de toxicidad, se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Ventajas y desventajas del uso de algas en bioensayos

| VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE ALGAS EN BIOENSAYOS | |
|--|---|
| VENTAJAS | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Existen sustancias químicas tóxicas para las algas tales como los herbicidas que pueden reducir la productividad del agua receptora, pero que no afectarán a los peces ni a los invertebrados. ▪ Se detectará la presencia de nutrientes que pueden incrementar la eutroficación y resultar en la muerte de los peces y los invertebrados. ▪ La prueba de algas ayuda a determinar cuáles descargas son los principales contribuyentes de nutrientes y eutroficación. Los nutrientes estimularán el crecimiento de algas en el cuerpo receptor y resultarán en condiciones indeseables y toxicidad para los peces a través de los bajos niveles de oxígeno disuelto cuando el exceso de algas muere. ▪ Existe información adecuada sobre cultivos y procedimientos de pruebas para muchas especies. ▪ Los requerimientos de equipo y de espacio no son amplios ni costosos. |
| DESVENTAJAS | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Dificultades para el mantenimiento de un cultivo puro. ▪ Las sustancias químicas que sólo son tóxicas para animales no serán detectadas por algas. ▪ La numeración de las algas en las soluciones, al final del período de prueba, puede ser larga y requerir tanto como un día completo para su realización. |

Fuente: (Henry, 1997)

Crecimiento de las algas

El crecimiento de las microalgas unicelulares en un medio líquido sigue un modelo de crecimiento exponencial:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

donde,

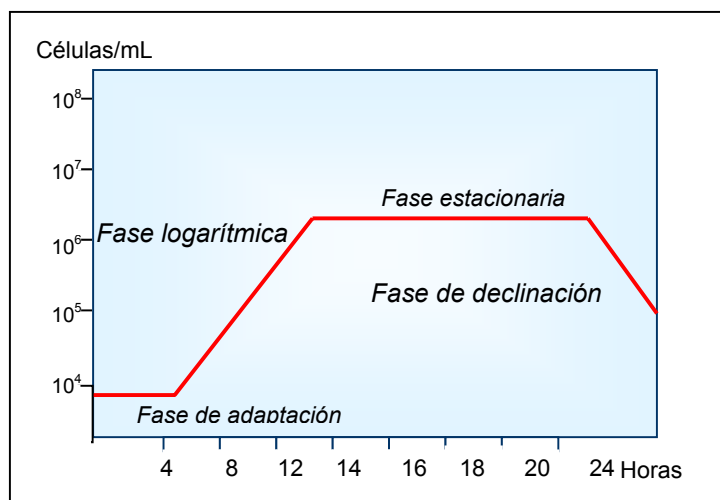
N: corresponde al número de organismos (peso seco o número de células por mililitro).

μ : tasa de crecimiento específico.

En este modelo, N representa el límite impuesto por el medio y, μ es el índice de crecimiento de la población, el cual se hace constante y, máximo cuando no hay limitación de nutrientes ni de dióxido de carbono. Bajo estas condiciones, μ es un parámetro que permite establecer la capacidad de crecimiento de la población.

Una vez inoculadas, un número conocido de células en el medio de cultivo, la población iniciará su crecimiento describiendo un patrón típico como el presentado en la Figura 6. Este patrón incluye, una fase de adaptación o fase LAG, una fase de crecimiento exponencial o logarítmico LOG, una fase estacionaria, una fase de declinación y una fase de muerte.

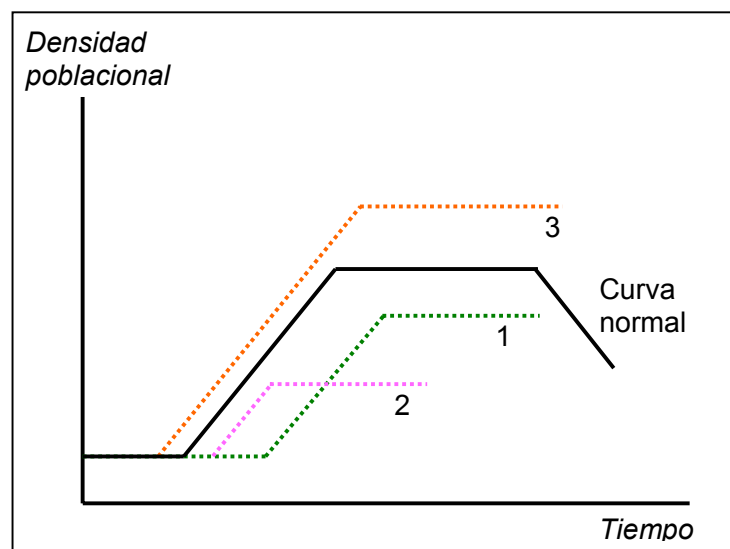
Figura 7. Cinética de crecimiento de una población de algas.



Fuente: Autora

Cuando una población de algas es expuesta a un tóxico, el modelo exponencial se desvía del normal y las alteraciones observadas, pueden incluir efectos como (Figura 8): incremento de la fase LAG (1), reducción de la tasa de crecimiento μ y de la productividad (2), o la estimulación de la tasa de crecimiento y del rendimiento celular (Díaz-Baez, 1996).

Figura 8. Desviaciones del crecimiento algal respecto a una curva de crecimiento normal (Díaz-Baez, 1996).



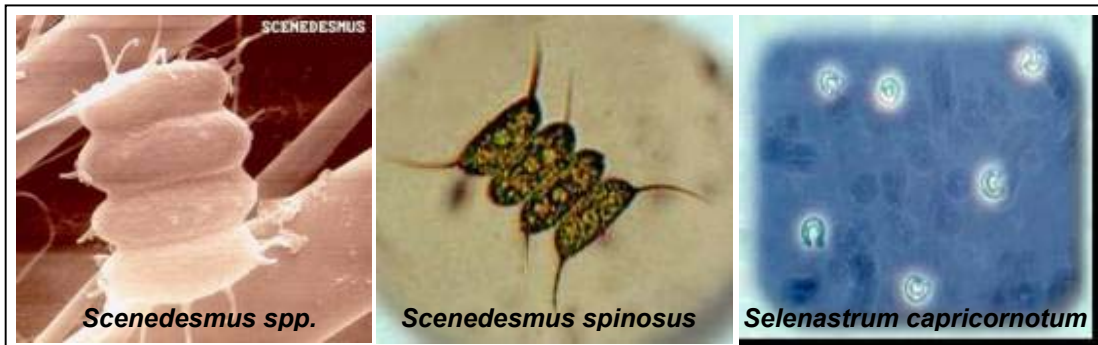
Fuente: (Díaz-Baez, 1996).

1.2.7.2 Condiciones generales para la ejecución de bioensayos con algas

a. Selección de las especies: dentro de los géneros frecuentemente utilizados para este tipo de ensayos se encuentran algas verdes de los géneros *Selenastrum sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Chlamydomonas sp.* y *Chlorella sp.*; algunos estudios sugieren que las especies de *Chlorella* no son tan sensibles como *Selenastrum sp.* y *Scenedesmus sp.* (Díaz-Baez, 1996). Debido a que muchas de las especies recomendadas en los protocolos internacionales, no son especies de esta latitud,

se recomienda evaluar especies nativas y desarrollar protocolos de prueba correspondientes de forma que se logre resultados comparativos con los obtenidos a nivel internacional (Greenberg, 1992).

Figura 9. Especies de microalgas utilizadas en ensayos de toxicidad.



Fuente: (http://www2.udec.cl/bioensayos/recursos_biologicos.html)

Características: las especies ideales de algas para bioensayos deben tener las siguientes características:

- Ser representativas de un eslabón importante en la cadena alimenticia.
- Muchas especies de algas verdes y diatomeas son alimento para el zooplancton y, por lo tanto, son apropiadas para bioensayos. Otras especies, tales como el alga filamentosa azul-verde, no son una buena fuente de alimento para organismos superiores en la cadena alimenticia y frecuentemente son indeseables debido a los problemas de sabor, olor y subproductos que son tóxicos para los animales.
- Presentar una alta tasa de crecimiento que permita estimar los cambios de biomasa en el tiempo de exposición estudiado.

Disponibilidad en cultivo puro: el aislamiento de un cultivo puro del agua natural requiere de mucho tiempo y habilidad. Las algas pueden crecer en una célula

simple o en pequeños grupos de células suspendidos en el agua. La preparación de las algas para la prueba requiere de una suspensión uniforme de las células algales.

En relación con las formas filamentosas o las colonias grandes de células, este tipo de formas no pueden prepararse fácilmente en una suspensión uniforme. Asimismo, en el conteo microscópico, una forma común de determinar el crecimiento algal, no es posible determinarse con formas filamentosas. En cuanto a las especies que crecen adheridas a superficies, estas no son tan deseables como las especies que crecen flotando libremente en el agua (Díaz-Baez, 1996).

Suficiente información sobre requisitos para el crecimiento de nutrientes: las especies de algas varían en sus requisitos para cultivos, tales como nutrientes, temperatura, luz y aireación. Estos requisitos se establecen a través de pruebas exhaustivas y los de muchas especies ya son conocidos.

Fácilmente cultivables a temperatura ambiente: las especies algales que requieren soluciones complejas de nutrientes o condiciones especiales de temperatura y luz complicarán innecesariamente el bioensayo. Asimismo, deben evitarse las especies con períodos de descanso o ciclos complejos de vida. Preferentemente, las especies de prueba deben mantenerse en una fase vegetativa de crecimiento por períodos indefinidos de tiempo, cuando se les abastece de solución fresca de nutrientes regularmente (Greenberg, 1992).

Capaz de crecer en cultivos de agar: los cultivos puros de algas pueden frecuentemente mantenerse por un año o más en cultivos de agar dentro de un refrigerador oscuro. Las especies que se adaptan a estas condiciones son deseables como un abastecimiento inmediato de cultivo puro y pueden mantenerse siempre listas con poco esfuerzo.

b. Mantenimiento del cultivo: los organismos son mantenidos en medio sólido estéril, utilizando el medio indicado en la Tabla 8 y adicionando agar-agar en una concentración entre el 1,5-2%. Los cultivos madre para las pruebas de toxicidad, son preparados a partir de estos cultivos axénicos. Para un adecuado mantenimiento se recomienda transferir semanalmente 1 o 2 ml de cultivo madre a un nuevo medio bajo condiciones de esterilidad y bajo las mismas condiciones de temperatura, luz y fotoperiodo que se utilizan para las ensayos de toxicidad (Romero, 2002).

El inóculo para la prueba debe prepararse 2 a 3 horas antes de comenzarla, centrifugando el cultivo a 1000 gravedades durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en un volumen de medio nutritivo. La densidad celular del inóculo debe ajustarse a un valor que la densidad inicial en los recipientes de ensayo sea de 10^4 células/ml.

c. Iluminación: para el cultivo se mantiene una condición de iluminación artificial que debe ser suficiente para sustentar un crecimiento exponencial. La tasa de crecimiento aumenta con la intensidad luminosa, y depende de la temperatura.

d. Temperatura: cada especie algal tiene una temperatura óptima de crecimiento para una intensidad de luz determinada. Es importante que el aporte de luz sea uniforme en todos los recipientes utilizados ya que pueden originarse variaciones inducidas por la iluminación.

e. Nutrientes: las algas son cultivadas y expuestas en un medio líquido enriquecido cuyos elementos más representativos se presentan en la Tabla 8. Teniendo en cuenta, que las algas bajo una condición limitada de nutrientes no sigue la cinética de Monod, la tasa de crecimiento será función de los nutrientes intracelulares.

Tabla 8. Medio nutritivo recomendado para las pruebas estandarizadas de toxicidad con algas.

| MACRONUTRIENTES | MICRONUTRIENTES |
|---------------------------------------|---|
| NaNO ₃ | H ₃ BO ₃ |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | MnCl ₂ .4H ₂ O |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | ZnCl ₂ |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | FeCl ₃ .6H ₂ O |
| K ₂ HPO ₄ | CoCl ₂ .6H ₂ O |
| NaHCO ₃ | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O |
| NaSiO ₃ .9H ₂ O | CuCl ₂ .2H ₂ O |
| | Na ₂ EDTA.2H ₂ O |
| | NaSeO ₃ .5H ₂ O |

Fuente: (Díaz-Baez, 1996).

f. Dióxido de carbono y pH: la fuente de carbono de las algas es el dióxido de carbono disuelto. Dada las condiciones de esterilidad mantenida en los cultivos de laboratorio y el alto contenido de biomasa, el dióxido de carbono puede volverse limitativo. Cuando la biomasa aumenta, la demanda de CO₂ excede la transferencia de éste de la fase gaseosa a la líquida. Bajo esta condición, la población obtendrá el dióxido del bicarbonato presente en el medio, lo cual induce un aumento del pH. Al disminuir la tasa de crecimiento, disminuye la utilización de CO₂, generando una disminución del pH de la solución por formación de bicarbonatos.

Para evitar estas variaciones de pH, los métodos recomiendan agitación continua o aireación con aire enriquecido (0,1% CO₂) y controlar la biomasa mediante un inóculo adecuado. No se recomienda utilizar amortiguadores o búferes ya que pueden inducirse precipitaciones o formación de complejos (Díaz-Baez, 1996).

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la evaluación de la ecotoxicidad de los productos biocidas propuestos, se llevaron a cabo bioensayos de toxicidad aguda en condiciones estáticas, sin renovación de agua de dilución ni de las sustancias en estudio y con dos (2) organismos prueba de diferentes niveles tróficos (un productor y un consumidor primario).


Se realizaron, inicialmente, ensayos preliminares para establecer el intervalo de concentraciones a evaluar y por último, fueron ejecutados los ensayos definitivos. Como variable respuesta se determinó la concentración letal media para las pruebas con *Daphnia pulex* y la concentración efectiva media para las pruebas con microalgas. El análisis estadístico aplicado a los resultados fue el método Probit.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Sustancias prueba. En este estudio fueron evaluados dos (2) productos biocidas.

- *Glutaraldehído*: este agente químico fue suministrado a la Corporación para la Investigación de la Corrosión (C.I.C.) por una empresa especializada en el control químico de la corrosión, para valorar su eficacia contra el crecimiento y desarrollo de una población de bacterias sulfato reductoras (BSR) provenientes de agua de recobro secundario de la industria del petróleo, utilizando la prueba tipo Time Kill Test (ver Anexo B). Las principales características de este producto se relacionan en la Tabla 9.

Tabla 9. Ficha de datos de seguridad del glutaraldehído.

| 1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO | |
|--|--|
| Nombre comercial | 6112 |
| Descripción | Glutaraldehído o pentanedial |
| Uso | Biocida |
| No. UN/ID | 3265 |
| No. CAS | 111-30-8 |
| 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS | |
| Apariencia | Incoloro |
| Estado físico | Líquido |
| Olor | Aldehído |
| Gravedad específica | 1.13 g/ml |
| PH | 3.1-4.5 |
| Solubilidad en agua | Soluble |
| Estructura química |  |
| 3. IDENTIFICACIÓN DE PELIGROS | |
| Clasificación | Corrosivo |
| Peligros salud humana | Daños irreversibles a los ojos por su corrosividad, irritación en la piel, puede ser fatal si es ingerido, causa problemas respiratorios si es inhalado. |
| Peligro ambiental | Contacto con fuentes de agua, aire, suelo; causa contaminación severa. |
| 4. CONTROLES DE EXPOSICIÓN Y PROTECCIÓN PERSONAL | |
| Protección respiratoria | Respirador NIOSH-Cartucho orgánico |
| Ventilación | Local, general |
| Guantes protectores | Químicamente resistentes |
| Protección para ojos | Careta "Total Face" |
| Otros | Overoles para manejo de químicos, lavajos, duchas |
| Límites de exposición | 0.2 ppm |
| 5. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD | |
| Estabilidad | Estable |
| Evitar | Ácidos y bases fuertes |
| Productos peligrosos por combustión | Óxidos de carbono |

| 6. MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS | |
|--|--|
| Rutas de contacto | Inhalación, ingestión, absorción e inyección. |
| Primeros Auxilios | <i>Ojos:</i> lavar con abundante agua durante 15 minutos y llevar al médico. <i>Piel:</i> retirar la ropa contaminada y lavar con abundante agua. <i>Ingestión:</i> no inducir al vómito. No dar nada de tomar. Llevar al médico. <i>Inhalación:</i> suministrar aire fresco. Llevar al médico. |
| 7. MEDIDAS PARA EXTINCIÓN DE INCENDIOS | |
| Punto de ignición | No aplica |
| Agentes de extinción | Agua, polvo químico |
| Escala de riesgos | Salud: (3) Inflamabilidad: (0) Reactividad: (0) |
| 8. MEDIDAS EN CASO DE VERTIMIENTO AMBIENTAL | |
| <p>Detenga/reduzca la fuga siempre y cuando no sea peligroso, evite que el derrame llegue a un cuerpo de agua, aisle y demarque el área.</p> <p><i>Si el derrame es en una carretera:</i> tapone las cunetas colocando sacos de arena y conduzca el fluido a un declive hueco, recupere el fluido para disponerlo adecuadamente.</p> <p><i>Si el derrame es en la ciudad:</i> evite que llegue hasta el alcantarillado, recólectelo y dispóngalo.</p> <p><i>Si llega al cuerpo de agua:</i> avise a la comunidad para que no use el agua hasta solucionar el problema.</p> | |

- *Molibdato de sodio:* el segundo producto evaluado es el molibdato de sodio dihidrato de la marca MERCK. Esta sustancia química actualmente está siendo evaluada en la C.I.C para determinar su efecto sobre la producción de ácido sulfhídrico y el crecimiento de las BSR. Las principales características de este producto se relacionan en la Tabla 10.

Tabla 10. Ficha de datos de seguridad del molibdato de sodio.

| 1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO | |
|--|--|
| Nombre comercial | Molibdato de sodio |
| Descripción | Molibdato de sodio dihidratado |
| Uso | Determinaciones de fosfato |
| No. EC | 231-551-7 |
| No. CAS | 10102-40-6 |
| 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS | |
| Estado físico | Sólido (cristales) |
| Color | Blanco |
| Olor | Inodoro |
| Densidad | 3.28 g/cm ³ (20 °C) |
| pH | 9 (840 g/l, H ₂ O, 20 °C) |
| Solubilidad en agua | 840 g/l (20 °C) |
| Punto de fusión | 687°C |
| Fórmula química | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O |
| 3. IDENTIFICACIÓN DE PELIGROS | |
| Clasificación | Producto no peligroso según la Directiva 67/548/CEE. |
| Peligro ambiental | Contacto con fuentes de agua, aire, suelo; causa contaminación severa. |
| 4. CONTROLES DE EXPOSICIÓN Y PROTECCIÓN PERSONAL | |
| Protección respiratoria | Necesaria en presencia de polvo. |
| Ventilación | Local, general |
| Guantes protectores | Innecesario |
| Protección para ojos | Precisa |
| Otros | Lavar las manos al término del trabajo. |
| 5. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD | |
| Estabilidad | Información no disponible. |
| Materiales a evitar | Información no disponible. |
| Información complementaria | Eliminación de agua de cristalización por calefacción. |
| 6. MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS | |
| Primeros Auxilios | <p><i>Ojos:</i> lavar con abundante agua manteniendo abiertos los párpados.</p> <p><i>Piel:</i> retirar la ropa contaminada y lavar con abundante agua.</p> <p><i>Ingestión:</i> beber abundante agua; en caso de malestar consultar al médico.</p> <p><i>Inhalación:</i> suministrar aire fresco. Llevar al médico.</p> |

| 7. MEDIDAS PARA EXTINCIÓN DE INCENDIOS | |
|---|--|
| Riesgos especiales | Incombustible |
| Medios de extinción adecuados | Adaptar a los materiales en el contorno. |
| 8. MEDIDAS EN CASO DE VERTIMIENTO AMBIENTAL | |
| <p><i>Medidas de precaución relativas a las personas:</i> evitar la inhalación de polvo. <i>Medidas de protección del medio ambiente:</i> no lanzar por el sumidero. <i>Procedimiento de recogida/limpieza:</i> recoger en seco y proceder a la eliminación de residuos. Aclarar. Evitar la formación de polvo.</p> | |

2.1.2 Material biológico. Las especies utilizadas para los ensayos corresponden al microcrustáceo *Daphnia pulex*, el cual fue proporcionado por un Laboratorio de Referencia al Laboratorio de Bioensayos del Instituto Colombiano del Petróleo (I.C.P.), y la microalga *Scenedesmus cf. subspicatus* obtenida de una muestra de fitoplancton de la ciénaga Miramar ubicada en Barrancabermeja (Santander) e identificada por medio de las claves taxonómicas de Whitford *et al*, 1968, Prescott, 1970, Parra *et al*, 1983 y Komarek & Fott, 1983. Las dos especies mencionadas están siendo mantenidas en el Laboratorio de Bioensayos del I.C.P. y fueron suministradas para el desarrollo de las pruebas de este estudio.

2.1.3 Soluciones de prueba. Para la preparación de las soluciones de prueba se utilizaron balones volumétricos y el agua empleada fue agua de dilución oxigenada. Las soluciones fueron preparadas 24 horas antes de la ejecución de los ensayos.

2.2 METODOLOGIA PARA LOS BIOENSAYOS CON CLADÓCEROS

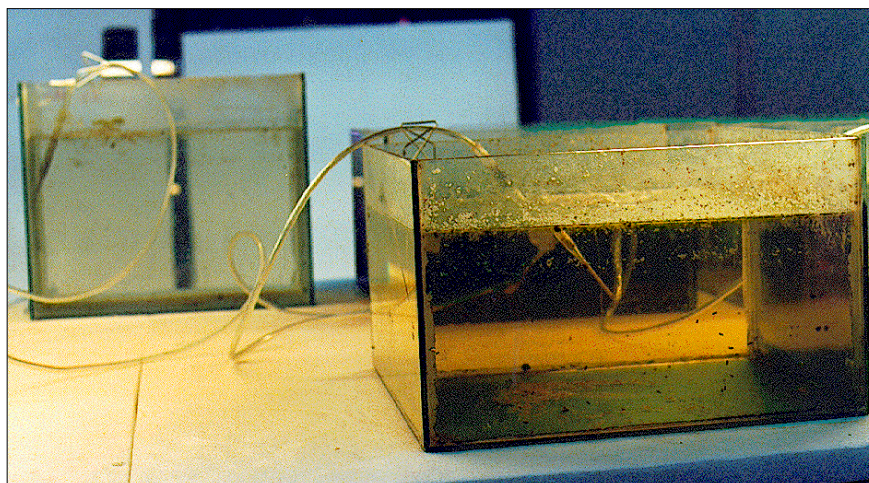
2.2.1 Organismos de prueba. *Cultivo:* las especies de *Daphnia pulex* fueron mantenidas en laboratorio bajo las siguientes condiciones.

- Acuarios de cultivo de 30 × 20 × 30 cm con un volumen de 13 litros de agua (Fotografía 1).
- Temperatura ambiente de 21°C ±2
- Suministro de oxígeno continuo mediante el uso de bombas de acuario.
- Fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad
- La alimentación consiste en la adición de 5 ml de inóculo de alga *Chlorella vulgaris* (2×10^5 cel/ml por cada 10 litros de agua, cada 48 horas).
- El agua de cultivo es renovada en un 80% semanalmente aspirando el fondo del acuario con lo cual se evita su envejecimiento y la degradación de la materia orgánica. El agua suministrada al acuario es aireada durante 24 horas antes de su adición al cultivo.

Debido a que los ensayos preliminares y definitivos se desarrollaron en las instalaciones de la C.I.C., fue seleccionado un laboratorio que conservara las mismas condiciones o muy similares a las mencionadas anteriormente. Las especies de *D. pulex* suministradas para las pruebas fueron hembras de reserva de tres (3) semanas de nacimiento.

Obtención de neonatos: las madres se colocaron en vasos de precipitado de 800 ml con una concentración de 10 especies por recipiente. Los neonatos liberados fueron retirados de los recipientes con la ayuda de una pipeta Pasteur y transferidos a un vaso de precipitado de 500 ml previamente lavado y esterilizado.

Fotografía 1. Acuarios para el cultivo y mantenimiento de cladóceros (Laboratorio de Bioensayos, ICP).



Fuente: (Laboratorio de Bioensayos, ICP).

2.2.2 Agua de dilución/cultivo. El agua de dilución utilizada para los bioensayos con *Daphnia pulex* corresponde a agua potable comercial (marca Agua Cristal), la cual registró unos valores de dureza que la clasificaban entre blanda y moderadamente blanda, siendo apropiada para el mantenimiento de esta especie.

En todos los ensayos, el agua de dilución/cultivo fue oxigenada durante dos horas usando bombas de acuario. Los parámetros fisicoquímicos de calidad del agua que fueron controlados durante los ensayos son pH, conductividad, dureza y oxígeno disuelto.

2.2.3 Condiciones de los bioensayos. La metodología empleada para los ensayos con *Daphnia pulex* se basó en los siguientes documentos: EPA, 1994, APHA, 1992 y Environment Canada, 1990.

Los ensayos letales realizados, tanto preliminares como definitivos, se entienden como pruebas estáticas de 48 horas, desarrolladas en vasos de polipropileno

inerte con capacidad de 40 ml y un volumen total empleado de 30 ml. Fueron evaluadas de 3-4 concentraciones y un (1) control, con 4 réplicas por concentración; a cada uno de los recipientes fueron añadidos cinco (5) organismos prueba (neonatos de 24 horas de nacimiento) y durante la ejecución de la prueba no fueron alimentados (Tabla 11).

Tabla 11. Resumen de las condiciones de la prueba para *Daphnia pulex*

| CONDICIONES DE LA PRUEBA PARA BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA UTILIZANDO <i>Daphnia pulex</i> | | |
|---|---------------|----------------------------------|
| TIPO DE PRUEBA | | Estático sin renovación |
| PUNTO FINAL | | Muerte |
| TIEMPO | | 48 horas |
| AGUA DE CONTROL/ DILUCIÓN | ORIGEN | Agua envasada Cristal (Postobon) |
| | TEMPERATURA | 21°C |
| | PH | 7.98 |
| | DUREZA | 62 mg/L |
| | CONDUCTIVIDAD | 272 µS/cm |
| ORGANISMOS | | Neonatos 24 horas |
| TEMPERATURA | | 21°C |
| AIREACIÓN | | Ninguna |
| VOLUMEN DE EXPOSICION | | 30 ml |
| NUMERO DE REPLICAS | | 4 |
| NUMERO DE CONCENTRACIONES | | 3-4 y un blanco |
| NUMERO DE ORGANISMOS POR CONCENTRACION | | 5 |
| ALIMENTACIÓN | | Ninguna |

Fuente: Autora

2.2.4 Ensayos preliminares

1. Preparación de las soluciones prueba. El rango de concentraciones seleccionado para cada uno de los productos se describe a continuación:

| PRODUCTO | CONCENTRACIÓN (mg/L) | | | |
|--------------------|----------------------|----|-----|------|
| Glutaraldehído | 0 (Blanco) | 1 | 100 | 1000 |
| Molibdato de sodio | 0 (Blanco) | 10 | 100 | 1000 |

Para la preparación del rango de concentraciones del Glutaraldehído, se preparó una solución madre de 1000 ppm; para determinar la cantidad de producto agregado a la solución madre se utilizó la densidad registrada en la ficha de datos correspondiente a 1.13 g/ml; posteriormente, se efectuaron las siguientes diluciones. En cuanto al molibdato de sodio, se preparó igualmente una solución madre de 1000 ppm y se efectuaron las subsiguientes diluciones.

2. Se agregaron 30 ml de cada una de las soluciones de prueba a los recipientes plásticos.

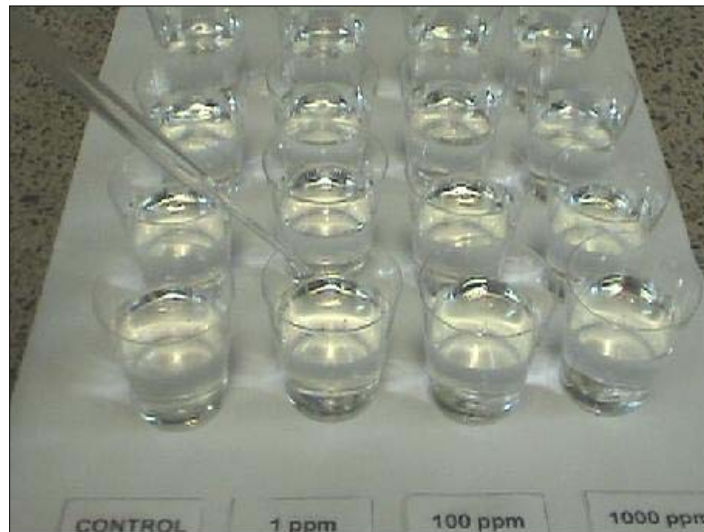
Fotografía 2. Montajes de los ensayos preliminares con *Daphnia pulex*, para glutaraldehído y molibdato de sodio.



Fuente: Autora

3. Finalmente, con la ayuda de una pipeta Pasteur se agregaron 5 neonatos de 24 horas de nacidos a cada recipiente.

Fotografía 3. Adición de organismos de ensayo



Fuente: Autora

4. Se registró la hora de comienzo.

5. Se determinó y registró la mortalidad y sobrevivencia de los organismos a las 24 y 48 horas.

2.2.5 Ensayos definitivos

Para la determinación del rango de concentraciones para los ensayos definitivos fueron usados los resultados obtenidos de los ensayos preliminares. Como límite inferior se empleó la concentración que presentó una mortalidad de cero y como límite superior la que tuvo un efecto de 100% de mortalidad. Las concentraciones intermedias se definieron utilizando una serie geométrica. En total se fijaron 3-4 concentraciones por agente químico.

En los ensayos definitivos fue utilizado el mismo procedimiento descrito en los ensayos preliminares con un tiempo de evaluación de 48 horas.

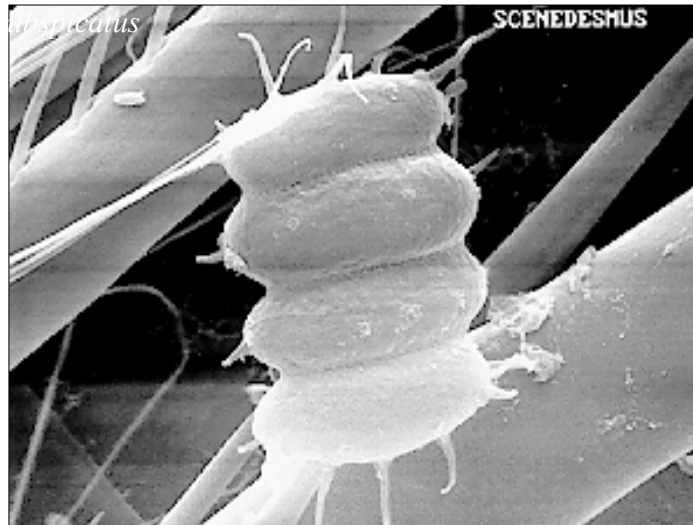
2.3 METODOLOGIA PARA LOS BIOENSAYOS CON ALGAS

2.3.1 Organismos de prueba

Cultivo: Para obtener un cultivo uniespecífico de la especie seleccionada se utilizaron metodologías que permiten garantizar que los cultivos no presenten contaminaciones ya sea por la presencia de otras algas o de bacterias; específicamente consistía en la preparación de un medio de cultivo específico (ISO, 1989) para ésta especie y la realización de técnicas de aislamiento en medios sólidos (medio de cultivo con 2% de agar-agar) y repiques en medios líquidos a partir de una colonia única.

Los repiques en medio líquido se realizaron semanalmente y para los cultivos en medio sólido cada 3 meses, controlando microscópicamente la morfología y pureza del cultivo. Para el mantenimiento de la cepa de *Scenedesmus* cf. *subspicatus* (Fotografía 4) se realizaron cultivos con medio líquido, reemplazando cada 48 horas el 20% del volumen total, por medio nutritivo fresco; de esta forma, se mantiene el organismo en fase de crecimiento.

Fotografía 4. Microfotografía de *Scenedesmus cf. subspicatus*



Fuente: Laboratorio de Microscopía electrónica-ICP

Todos los procedimientos y materiales utilizados para el aislamiento y mantenimiento de este organismo, se desarrollaron en condiciones de esterilidad.

Las algas se mantuvieron en suspensión constantemente por medio de un “shaker” o mesa de agitación a 100 r.p.m.

Curva de crecimiento: para iniciar el bioensayo, se realizó un precultivo, a partir del cual se obtuvo la curva de crecimiento; de esta forma, es posible calcular el tiempo de incubación necesario para obtener una cantidad apropiada de células e iniciar los cultivos de ensayo. Dicho precultivo se incubó bajo las mismas condiciones del ensayo y fue utilizado cuando comenzó la fase exponencial de crecimiento.

Para la determinación de la concentración de células fue usado el recuento con cámara de Neubauer; antes de comenzar el bioensayo preliminar, debe verificarse la densidad adecuada de células por mililitro.

Conociendo la concentración de células y estando ajustada la curva de crecimiento, se determina la tasa de crecimiento por medio de la siguiente fórmula:

$$m = (\text{Log } N1 - \text{Log } N2) / (t1 - t2)$$

donde,

N1 : Concentración de células para el tiempo t1 en el rango de crecimiento exponencial.

N2 : Concentración de células para el tiempo t2 en el rango de crecimiento exponencial.

2.3.2 Agua de dilución/cultivo. Para la preparación de los medios nutritivos de la especie de *Scenedesmus* fue usada agua destilada; sin embargo, para la ejecución de los bioensayos se utilizó agua potable comercial, debido a que las soluciones de prueba fueron preparadas con esta última.

En todos los ensayos, el agua de dilución/cultivo fue oxigenada durante dos horas usando bombas de acuario.

2.3.3 Condiciones de los bioensayos. La metodología empleada para estas pruebas se basó en los protocolos de ISO, 1989 y ASTM, 1990.

Los bioensayos con algas consistieron en pruebas estáticas de 96 horas, siendo evaluadas 3-4 concentraciones y cuatro (4) réplicas de cada una; para los ensayos se utilizaron erlenmeyers de 250 ml, con un volumen total de solución de 120 ml. La respuesta de la población fue medida a través de los cambios en la densidad celular comparados con el control. Los resultados son aceptados cuando la concentración de células sea mayor de 2×10^5 cel/ml al finalizar la prueba y la variabilidad entre las réplicas no sea mayor al 20%.

Tabla 12. Resumen de las condiciones de la prueba para *Scenedesmus cf. subspicatus*.

| CONDICIONES DE LA PRUEBA PARA BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA UTILIZANDO <i>Scenedesmus cf. Subspicatus</i> | | |
|--|------------------------------|----------------------------------|
| TIPO DE PRUEBA | Estático sin renovación | |
| VARIABLE RESPUESTA | % Inhibición del crecimiento | |
| TIEMPO | 96 horas | |
| AGUA DE CONTROL/ DILUCIÓN | ORIGEN | Agua envasada Cristal (Postobon) |
| | TEMPERATURA | 21°C |
| | PH | 8 |
| | CONDUCTIVIDAD | 272 µS/cm |
| | DUREZA | 62 mg/L |
| DENSIDAD INICIAL | 2×10^4 | |
| TEMPERATURA | 21°C | |
| AIREACION | Shaker, 100 r.p.m. | |
| VOLUMEN DE EXPOSICION | 120 ml | |
| NUMERO DE REPLICAS | 4 | |
| NUMERO DE CONCENTRACIONES | 3-4 y un blanco | |
| RENOVACIÓN DEL MEDIO | Ninguna | |

Fuente: Autora

2.3.4 Ensayos preliminares

1. Preparación de las soluciones de prueba. Para la preparación de las concentraciones fue empleado el mismo procedimiento descrito en las pruebas para *Daphnia*.

| PRODUCTO | CONCENTRACIÓN (mg/L) | | | |
|--------------------|-----------------------------|----|-----|------|
| Glutaraldehído | 0 (Blanco) | 1 | 100 | 1000 |
| Molibdato de sodio | 0 (Blanco) | 10 | 100 | 1000 |

2. Obtención del inóculo. A partir de los resultados conseguidos en la curva de crecimiento para la especie evaluada, se determinó el tiempo de incubación necesario para obtener un inóculo óptimo para los ensayos, el cual correspondió a un periodo de 2 - 3 días.

3. Montaje. Las soluciones de prueba, el agua de dilución y el inóculo algal fueron adicionados a los erlenmeyers de 250 ml, completando un volumen total de 120 ml. La proporción del volumen total y la cantidad de nutrientes fue de 10:1, mientras que la cantidad de inóculo algal adicionado fue de 10 ml, alcanzando la densidad celular de 2×10^4 células por mililitro para el inicio del bioensayo. Simultáneamente, los controles se montaron con agua de dilución y medio de cultivo más el inóculo algal.

4. Porcentaje de Inhibición de crecimiento. El conteo de densidad celular se efectuó cada 24 horas hasta completar el tiempo de finalizar la prueba, es decir, 96 horas. El cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento algal se determinó mediante la variación en la tasa de crecimiento durante el tiempo de exposición, comparado con el control, de esta forma se evalúa el efecto sobre la población y se calcula la concentración efectiva (CE50), siendo la concentración en la cual la sustancia inhibe el crecimiento al 50% de la población durante un tiempo determinado.

El porcentaje de inhibición de crecimiento se determinó por la siguiente fórmula:

$$IC = (m_{\text{contr}} - m_{\text{tox}} / m_{\text{contr}}) * 100$$

donde,

m_{contr} : crecimiento algal del control cada 24 horas.

m_{tox} : crecimiento algal de la sustancia prueba cada 24 horas.

2.3.5 Ensayos definitivos. Para la determinación del rango de concentraciones para los ensayos definitivos fueron usados los resultados obtenidos de los ensayos preliminares. Como límite inferior se empleó la concentración que presentó una mortalidad de cero y como límite superior la que tuvo un efecto de 100% de mortalidad en los ensayos preliminares. Las concentraciones intermedias se definieron utilizando una serie geométrica. En total se fijaron 3-4 concentraciones por agente químico.

En los ensayos definitivos fue utilizado el mismo procedimiento descrito en los ensayos preliminares con un tiempo de evaluación de 96 horas.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 RESULTADOS DE LA EVALUACION CON *Daphnia pulex*

El glutaraldehído, uno de los biocidas que más han sido estudiados, es considerado como un producto que se destaca por su alta efectividad para el control de microorganismos y su capacidad de biodegradación; por estas razones, se le ha atribuido una gran variedad de usos, desde el tratamiento de aguas industriales hasta la esterilización de instrumentos médicos que no pueden tolerar métodos de esterilización a altas temperaturas.

De igual forma, se ha evidenciado que esta sustancia química puede generar efectos nocivos en el ambiente, especialmente sobre las poblaciones acuáticas y, algunos estudios demuestran que una porción sustancial del glutaraldehído se ha considerado como no biodegradable (McIlwaine).

En este estudio, durante la fase de selección de las sustancias de prueba, se efectuó la revisión de 10 fichas de seguridad de diferentes productos biocidas comercializados y aplicados en la industria colombiana, para obtener información relacionada con el impacto que estos ejercen en el medio ambiente; sin embargo, la mayor parte de la información investigada sólo relacionaba los efectos directos en humanos o animales y en ninguno de los productos se encontró algún tipo de información ambiental. Por esta razón, se decidió evaluar un producto biocida, el cual contiene glutaraldehído como sustancia activa, mediante la ejecución de bioensayos de toxicidad aguda para comprobar su efecto nocivo en ambientes acuáticos.

Al mismo tiempo, se consideró evaluar el molibdato de sodio debido a que es una sustancia que está siendo valorada como una innovadora alternativa para el control y mitigación de la biocorrosión por su bajo impacto ambiental y porque permite un efectivo control a bajo costo.

Para evaluar estas dos sustancias fueron utilizadas dos especies, *D. pulex* y *S. subspicatus*, y los resultados se presentan a continuación.

3.1.1 Ensayos preliminares. En primera instancia, se realizaron los ensayos preliminares a partir de los cuales se obtuvieron las siguientes mediciones:

Tabla 13. Ensayos preliminares con *Daphnia pulex*

| ENSAYOS PRELIMINARES CON <i>Daphnia pulex</i> GLUTARALDEHIDO | | | | |
|---|---------|-----------------------|------------------------|----------|
| CONCENTRACION | REPLICA | No. ORGANISMOS PRUEBA | No. ORGANISMOS MUERTOS | |
| | | | 24 horas | 48 horas |
| 0 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| | 2 | | 0 | 0 |
| | 3 | | 0 | 0 |
| 1 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| | 2 | | 0 | 0 |
| | 3 | | 0 | 0 |
| 100 | 1 | 5 | 3 | 5 |
| | 2 | | 4 | 5 |
| | 3 | | 4 | 5 |
| 1000 | 1 | 5 | 5 | 5 |
| | 2 | | 5 | 5 |
| | 3 | | 5 | 5 |

| ENSAYOS PRELIMINARES CON <i>Daphnia pulex</i> MOLIBDATO DE SODIO | | | | |
|---|---------|----------------------------|------------------------|----------|
| CONCENTRACION | REPLICA | No. ORGANISMOS POR REPLICA | No. ORGANISMOS MUERTOS | |
| | | | 24 horas | 48 horas |
| 0 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| | 2 | | 0 | 0 |
| | 3 | | 0 | 0 |
| 10 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| | 2 | | 0 | 0 |
| | 3 | | 0 | 0 |
| 100 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| | 2 | | 0 | 0 |
| | 3 | | 0 | 0 |
| 1000 | 1 | 5 | 5 | 5 |
| | 2 | | 4 | 5 |
| | 3 | | 5 | 5 |

Fuente: Autora

A partir de estos resultados se determinó el rango de concentración para la ejecución de los ensayos definitivos; para el producto biocida conteniendo glutaraldehído, se determinó que el rango debería ubicarse entre 1 y 100 ppm y para el molibdato de sodio entre 100 y 1000 ppm.

Los resultados obtenidos en los ensayos definitivos se relacionan en la Tabla 14.

Tabla 14. Ensayos definitivos con *Daphnia pulex*

| ENSAYOS DEFINITIVOS CON <i>Daphnia pulex</i> GLUTARALDEHIDO | | | | |
|--|--------------|-----------------------|------------------------|----------|
| CONCENTRACION | No. REPLICAS | No. ORGANISMOS PRUEBA | No. ORGANISMOS MUERTOS | |
| | | | 24 horas | 48 horas |
| 120 | 4 | 20 | 20 | 20 |
| 100 | 4 | 20 | 20 | 20 |
| 80 | 4 | 20 | 16 | 20 |
| 60 | 4 | 20 | 4 | 7 |
| 40 | 4 | 20 | 1 | 2 |
| Control | 4 | 20 | 0 | 1 |

| ENSAYOS DEFINITIVOS CON <i>Daphnia pulex</i> MOLIBDATO DE SODIO | | | | |
|--|--------------|-----------------------|------------------------|----------|
| CONCENTRACION | No. REPLICAS | No. ORGANISMOS PRUEBA | No. ORGANISMOS MUERTOS | |
| | | | 24 horas | 48 horas |
| 1200 | 4 | 20 | 18 | 20 |
| 1000 | 4 | 20 | 6 | 8 |
| 800 | 4 | 20 | 2 | 5 |
| 600 | 4 | 20 | 0 | 2 |
| 400 | 4 | 20 | 0 | 1 |
| Control | 4 | 20 | 0 | 1 |

Fuente: Autora

3.1.2 Análisis estadístico con el método Probit. El método Probit se usa para el análisis de pruebas binomiales y proporciona una estimación de la CL₅₀ de una sustancia tóxica con precisión. El proceso consiste en graficar los porcentajes de mortalidad acumulados en función de las concentraciones de la sustancia de prueba, obteniéndose una curva sigmoideal; luego los porcentajes de los ejemplares afectados son convertidos a Probits o unidades de probabilidad y las concentraciones del tóxico son convertidas a logaritmo, así al graficar los resultados, la línea sigmoideal se convierte en una línea recta de la cual se puede estimar la concentración letal media y su precisión.

Los datos resultantes de las pruebas definitivas fueron ingresados en un programa computadorizado denominado Trac Biomonitoring Services Laboratory Versión 2.5 (Anexo A), para su análisis mediante el método Probit; los resultados de concentración letal 50 y sus límites de confianza para los dos productos biocidas evaluados son presentados en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de CL₅₀ y sus límites de confianza para los productos evaluados

| DATOS | GLUTARALDEHIDO | MOLIBDATO DE SODIO |
|-----------------------------------|----------------|--------------------|
| CL50 | 64 | 981 |
| Límites de confianza (95%) | 55.30 - 66.13 | 925.68 - 1039.10 |

Fuente: Autora

Los resultados de las evaluaciones con *Daphnia pulex*, indican que la concentración letal media para el glutaraldehído fue de de 64 mg/L y para el molibdato de sodio de 981 mg/L; por lo tanto, se puede deducir que el

glutaraldehído exhibió una toxicidad considerablemente alta, 15 unidades más, en relación con la exhibida por el molibdato de sodio.

3.1.3 Análisis de los resultados con una sustancia de referencia. Durante la evaluación del efecto ecotoxicológico de las sustancias de prueba, se recomienda efectuar conjuntamente bioensayos con sustancias de referencia o de una toxicidad conocida, con la finalidad de conocer la sensibilidad de la especie ensayada respecto a una sustancia altamente tóxica. Entre las sustancias utilizadas con mayor frecuencia se encuentran el dicromato de potasio, el cloruro de mercurio y el nitrato de bario.

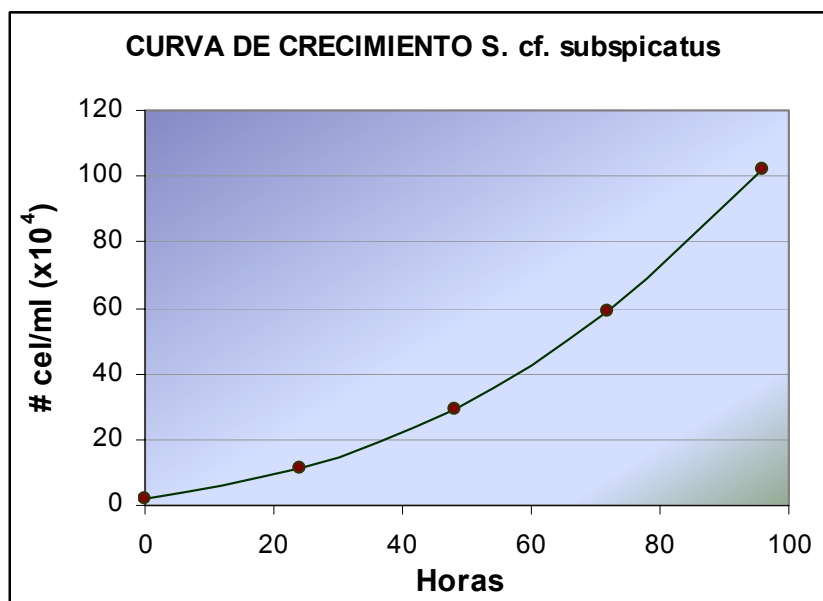
Según los datos consultados en la literatura (Pérez-Davinson, 2002), el intervalo de sensibilidad de *Daphnia pulex* para una sustancia de referencia como el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), está ubicado entre 0,01 y 0.03 mg/L. Con estos valores es posible afirmar que *D. pulex*, es una especie que exhibe una sensibilidad muy alta a los agentes tóxicos y por lo tanto, según los datos presentados para el glutaraldehído, puede confirmarse no sólo su alta toxicidad respecto al molibdato de sodio sino también en relación con el dicromato de potasio.

3.2 RESULTADOS DE LA EVALUACION CON *Scenedesmus cf. subspicatus*

La curva de crecimiento de los precultivos de *Scenedesmus cf. subspicatus* se presentan en la Figura 10. Los inóculos de las pruebas fueron extraídos de los precultivos cuando las células se encontraban en fase logarítmica, además, las células de los inóculos antes del inicio de cada prueba se observaron para verificar el estado de los precultivos, como morfología y la posible contaminación por otras algas. Para poder determinar el tiempo de incubación necesario para obtener el inóculo, fue realizada la curva de crecimiento de la microalga. Los datos arrojados

por la curva realizada en este estudio muestran que es necesario incubar durante 2-3 días para alcanzar un inóculo de 2×10^4 para los ensayos.

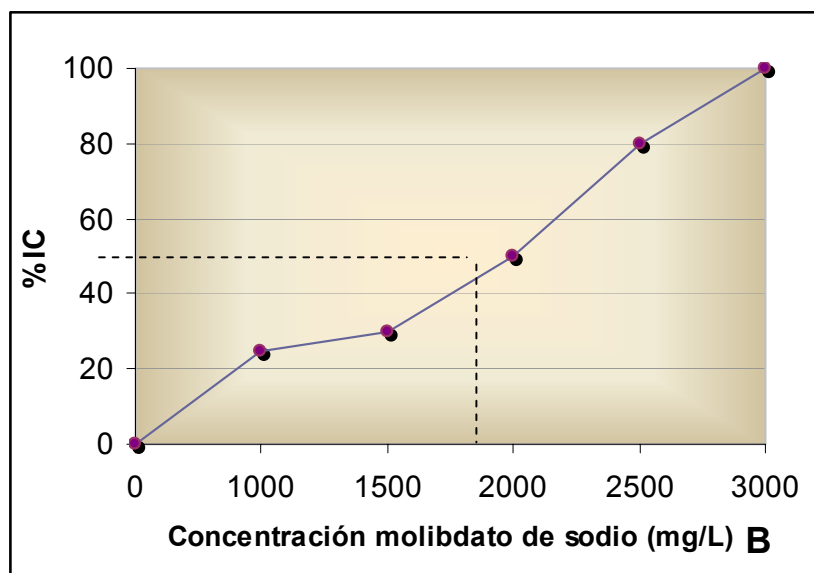
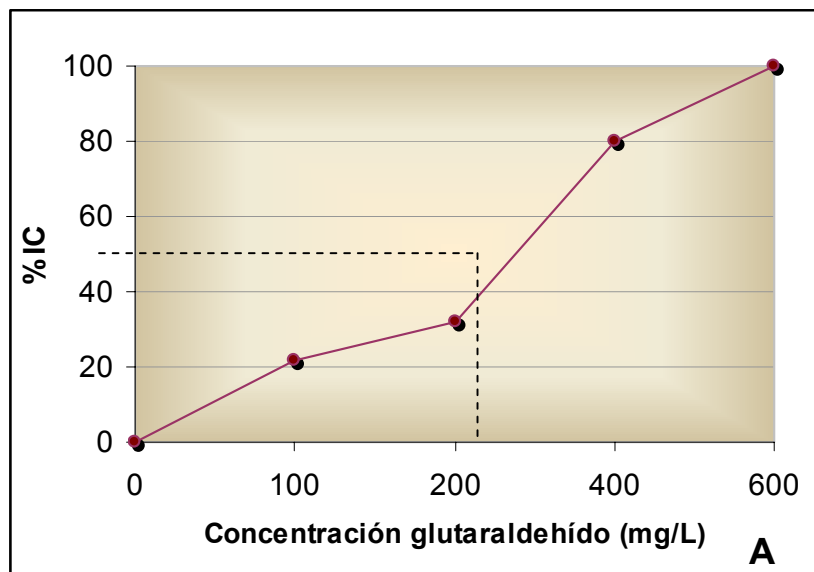
Figura 10. Curva de crecimiento de *Scenedesmus cf. Subspicatus*



Fuente: Autora

Los resultados obtenidos en los ensayos definitivos utilizando como especie de prueba *Scenedesmus cf. subspicatus*, tanto para glutaraldehído como para molibdato de sodio, son presentados en la Figura 11.

Figura 11. Porcentaje de Inhibición de crecimiento de *S. cf. subspicatus* vs. concentración de las sustancias de prueba. En las Figuras A y B se puede determinar la concentración de glutaraldehído y molibdato de sodio que producen la inhibición del 50% de la población.



Fuente: Autora

Los resultados de las evaluaciones con *S. cf. subspicatus*, indican que la concentración efectiva media para el glutaraldehído fue de 320 mg/L y para el molibdato de sodio de 2000 mg/L; de igual forma que en las evaluaciones para *D. pulex*, el glutaraldehído produce efectos adversos a la población de algas con una menor concentración, en este caso en una proporción 6 veces menor, en relación con el molibdato de sodio.

3.2.1 Análisis de los resultados con una sustancia de referencia. Según los datos consignados en la norma ISO, 1989, cuando el *S. cf. subspicatus* entra en contacto con una solución de dicromato de potasio, la inhibición del 50% de la población ocurre cuando esta sustancia se encuentra en una concentración de 0.84 mg/l, por lo tanto, esta microalga presenta una alta sensibilidad a las sustancias tóxicas. Cuando se comparan los valores obtenidos para el glutaraldehído con aquellos registrados para el dicromato de potasio, es posible catalogar esta sustancia como altamente tóxica; en cuanto al molibdato de sodio, la CE₅₀ es bastante mayor y puede clasificarse como una sustancia con una toxicidad baja.

CONCLUSIONES

Los biocidas juegan un papel muy importante y son típicamente usados en la industria en general, debido a su capacidad de controlar el crecimiento de microorganismos asociados con una gran variedad de problemas en sistemas de procesamiento de agua. Estos problemas pueden abarcar desde la formación de biopelículas que originan el desprendimiento de partículas sólidas produciendo el taponamiento de filtros y tuberías, hasta la corrosión de superficies metálicas en los sistemas de transporte de la industria del petróleo y del gas. Sin embargo, cada día es más evidente el impacto que están ejerciendo estas sustancias sobre el ecosistema, generando interrogantes como dónde y cuándo deben ser usados y cuáles son los límites que garanticen la ausencia de daños irreversibles en el ambiente.

Luego de la valoración de los efectos ecotoxicológicos producidos por dos sustancias con acción biocida, sobre organismos pertenecientes a ambientes acuáticos naturales, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que, desde el punto de vista ecotoxicológico, el cladóceros *Daphnia pulex* fue más sensible que la microalga *Scenedesmus cf. subspicatus*, cuando son expuestos a productos con acción biocida.
- De acuerdo a los ensayos de toxicidad aguda realizados, la CL₅₀ para *Daphnia pulex* fue de 65 ppm y la CE₅₀ para *Scenedesmus cf. subspicatus* fue de 320 ppm.

- Según los valores obtenidos en los ensayos TKT efectuados en la C.I.C., para la determinación de las concentraciones de aplicación del glutaraldehído en un sistema real, se encontró que la concentración efectiva para el control de las BSR es de 200 ppm (Anexo 2). Sin embargo, los ensayos tipo TKT son desarrollados bajo condiciones de laboratorio que no emulan las condiciones del sistema real en su totalidad, por lo tanto, estos resultados constituyen un punto de partida para la estructuración de las estrategias de aplicación y seguimiento del tratamiento químico en campo. En este escenario, las concentraciones y dosis recomendadas de aplicación obtenidas en el laboratorio pueden variar durante los ensayos en el sistema real, presentándose con mayor frecuencia la aplicación de concentraciones más altas (hasta 600 ppm) que las obtenidas, para evitar una disminución del efecto aniquilante del químico por acción de variables como el tipo de flujo, caudal, cambios de temperatura, pH y presencia de contaminantes, variaciones muy comunes en un sistema industrial real.

Por consiguiente, el impacto que puede generar la disposición final de los residuos conteniendo glutaraldehído a un cuerpo de agua, en concentraciones mayores a 200 ppm, representa una seria amenaza para los productores de los ecosistemas acuáticos (microalgas) y los consumidores primarios (zooplancton), quienes son la base de los ecosistemas acuáticos.

- En el caso de los ensayos para la valoración del efecto de la sal de molibdato, para *Daphnia pulex* se obtuvo una CL₅₀ de 981 ppm y para *Scenedusmus cf. subspicatus* una CE₅₀ de 2000 ppm.

Como se había mencionado anteriormente, el molibdato de sodio está siendo evaluado por la C.I.C, como una opción alternativa para el control de los problemas de corrosión microbiológica; sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con los resultados de las pruebas tipo TKT para esta sustancia. Por lo

tanto, si los resultados son alentadores y se determina que las concentraciones óptimas de aplicación son bajas como las usadas en la actualidad para el glutaraldehído, la utilización del molibdato de sodio se constituye como una sustancia con gran potencial, al reducir el impacto ambiental generado por los procesos de control químico de la biocorrosión en sistemas industriales.

- Finalmente, en cuanto a la metodología empleada para la evaluación ecotoxicológica de productos biocidas, se logra concluir que los bioensayos de toxicidad aguda son pruebas que pueden ser adaptadas fácilmente a condiciones de laboratorio, debido a que los montajes no requieren instalaciones complejas, ni equipos y materiales costosos o de difícil adquisición y además, no demandan tiempos prolongados de ensayo.

BIBLIOGRAFIA

ARROYAVE, C. *et al.* 1992. Corrosion Problems and their Incidence on Colombian Economy. Proc. 10th Asia Pacific Corrosion Control Conference. Indonesia. Paper 12.

ASTM E 729-88a. 1989. Standard guide for conducting acute toxicity test with fishes, macroinvertebrates and amphibians.

BEECH, Iwona *et al.* 2000. Simple methods for the investigation of the role of biofilms in corrosion. Brite Euram III Thematic Network on MIC of Industrial Materials. CT98-5084.

BOIVIN, J. 1995. Oil Industry Biocides. NACE Canadian Region Western Conference Anchorage, Canada.

CAMPAIGNOLLE, J. *et al.* 1992. Influence of molybdate on microbiologically influenced corrosion of mild steel. NACE International Annual Conference and Exposition. Paper No. 186. Houston, Corrosion.

CEPIS/OPS, 1997. Manual de Evaluación y Manejo de Sustancias Tóxicas en Aguas Superficiales. Sección 5: Orientación para muestreo, monitoreo y análisis de datos. Publicaciones.

C.I.C. 2003. Programa para el manejo de la corrosión interna del sistema de transporte de gas en el gasoducto Ballena-Barrancabermeja de Centragas S.C.A.. Informe Final para Centragas S.C.A. 135 p + anexos.

_____. 2004. Estudio del Efecto del Nitrato y el Molibdato sobre la Producción de Ácido Sulfhídrico (H₂S) y sobre la Población de Bacterias Sulfato Reductoras Asociadas a Procesos de Corrosión. Informe de Avance Colciencias.

_____. 2004. Valoración a nivel de laboratorio de la eficacia de cuatro agentes químicos con acción biocida. Informe Final. 22 p.

COWAN, Stacie *et al.* Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. Appl. Environ. Microbiol, 66: 10, 4481-4485.

CHALUT, J., SMALL, G. and Payton J. 1996. Control and Monitoring the Effectiveness of Different Biocides with the use of Free ATP. NACE International Annual Conference and Exposition. Paper No. 276. Houston, Corrosion.

DIAZ-BAEZ, MC. 1996. Fitotoxicidad -Ensayos de toxicidad con algas. Unidad Académica de Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá.

ENVIROMENT CANADA. 1990. Enviromental Protection Series. Biological Test Method: Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. Report EPS 1/RM/11.

EPA. 1996. Ecological Effects Test Guidelines. Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. OPPTS 850.1010.

_____. 1994. 48-Hour Acute Toxicity Test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Enviromental Response Team. SOP#: 2024. 1–4 p.

ESPIGARES, M. 2002. Valoración de la actividad desinfectante de Perasafe sobre cepas de referencia. Revista Higiene y Sanidad Ambiental, 2: 33-35.

FREEDMAN, A. 1986. Cooling Water Treatment. Process Industries Corrosion: the teory and practice. Houston, NACE.

GHERARDI-GOLDSTEIN, Elenita *et al.* 1990. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB. 19 p.

GREENBERG, A., CLESCERI, L. and EATON, A. 1992. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 18 ed. APHA, AWWA, WEF.

GUÍA TÉCNICA COLOMBIANA. 1996. GTC 31: Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en organismos acuáticos. Santafé de Bogotá: ICONTEC.

HALBACH, M., KOSCHINSKY, A. and HALBACH, P. Report on the discovery of *Gallionella ferruginea* from an active hydrothermal field in the deep sea.

HENRY, Linda. 1997. Manual de Evaluación y Manejo de Sustancias Tóxicas en Aguas Superficiales: orientación para muestreo, monitoreo y análisis de datos. CEPIS-OPS-OMS.

HERRO, Harvey and PORT, Robert. 1995. Guía Nalco para el análisis de falla en los sistemas de enfriamiento por agua. 1 ed. México: Mc Graw Hill. 421 p.

HOFFMAN, David *et al.* 1995. Handbook of ecotoxicology. Lewis Publishers. USA. 755 p.

ISO 8692. 1989. Water quality fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus cf. subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. British Standard.

JENNEMAN, G *et al.* MIC in a pipeline used for disposal of produced water from a coal seam gas field. NACE International Annual Conference and Exposition. Paper No. 281. Houston, Corrosion.

LAVOIE, D. and LITTLE, Brenda. 1996. Fungal Contamination of H-53 Aircraft. Report for the Naval Research Laboratory. 5-6 p.

LITTLE, Brenda and WAGNER, Patricia. 1997. Myths related to microbiologically influenced corrosion. Materials Performance. 40-46 p.

_____, RAY R. and POPE R. 2000. Relationship between corrosion and the biological sulfur cycle: a review. Corrosion, 56: 4, 433-438.

LOPEZ, Camilo, ESPINOSA Adriana y ALAPE, Joseph. 1996. Variación en las características del ciclo de vida en individuos de *Daphnia magna*, provenientes de diferentes camadas. Acta Biológica Colombiana, 3:2.

MADIGAN, Michael, MARTINKO, John and PARKER, Jack. 2000. Brock: Biología de los microorganismos. 8 ed. Madrid, Prentice Hall Iberia. 986 p.

MCILWAINE, Douglas. Challenging traditional biodegradation tests: the biodegradation of glutaraldehyde. Biocides, Research & Development. http://ipec.utulsa.edu/lpec/Conf2002/mcilwaine_136.pdf

MEJIA, Blanca. 1995. Tesis de grado: Efectos letales sobre *Daphnia pulex* por la exposición a siete sales de metales pesados. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Sección Postgrado.

OSTROFF, 1979. Introduction to oilfield water technology: water treatment microbiology. NACE, Houston. 156-173 p.

PAGGI, Juan y Paggi, Susana de. *Daphnia magna*: el canario de las aguas. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Instituto Nacional de Limnología (INALI)-Santo Tomé (Santa Fe).

PENG, C. and PARK, J. 1994. Principal factors affecting microbiologically influenced corrosion of carbon steel. Corrosion, 50: 9, 669-675.

PEREZ-DAVINSON, G. *et al.* 2002. Efectos Ecotoxicológicos de un Brasinoesteroide en Bioindicadores de Aguas Dulces. Acta Farm. Bonaerense 21 (1): 13-20.

POPE, Daniel and STOECKER, J. 1986. Microbiologically influenced corrosion. Process Industries Corrosion: the theory and practice. Houston, NACE.

_____ and MORRIS, Alan. 1995. Some experiences with microbiologically influenced corrosion of pipelines. *Materials Performance*. 23-28 p.

_____. 1992. State of the art report on monitoring, prevention and mitigation of microbiologically influenced corrosion in the natural gas industry. Gas Research Institute. Report No. GRI-92/0382.

RESTREPO, Ricardo y ARIAS, Alvaro. 1998. Método Continuo para la evaluación de vertimientos industriales. *ECOPETROL ICP*, 6: 11. 5-10 p. Trabajo presentado en el III Seminario Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, Bucaramanga, Colombia. Octubre 8-10 de 1998.

ROMERO, *et al.* Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. *Interciencia*, 27:3. 104-06 p.

SIMPSON, G. *et al.* 2000. A focus on chlorine dioxide: the "ideal" biocide. <http://www.clo2.com/reading/waste/corrosion.html>.

TUTHILL, Arthur *et al.* 1998. Effect of chlorine on common materials in fresh water. NACE International Annual Conference and Exposition. Paper No. 708. Houston, Corrosion.

VIDELA, Héctor *et al.* 1996. A comparison of the action of various biocides on corrosive biofilms. NACE International Annual Conference and Exposition. Paper No. 286. Houston.

_____ y SALVAREZZA, Roberto. 1984. Introducción a la corrosión microbológica. 1 ed. Buenos Aires: Librería agropecuaria. 127 p.

WATKINS, Susan. 1994. *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*. New York: Industrial Press. 304 p.

ANEXOS

Anexo A. Resultados Método Probit

TRAC BIOMONITORING SERVICES LABORATORY

Page _____

***** Version 2.5 *****

Results calculated using the Binomial Method.

```

Sponsor           :          DAPHNIA PULEX
Species           :
Study Number      :
Dates of test     :    3-08-04   to    5-08-04
Test Material     :          GLUTARALDEHIDO
Concentration Units :          6
Report run by     :
Date of report    :          08-19-2004
    
```

| Concentration (6) | Number Exposed | Number Dead | Percent Dead | Corrected Number Dead | Corrected Percent Dead |
|------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| 120.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 100.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 80.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 60.0 | 20 | 7 | 35.0 | 6 | 30.0 |
| 40.0 | 20 | 2 | 10.0 | 1 | 5.0 |
| Control | 20 | 1 | 5.0 | 0 | 0.0 |

The following results have been corrected for spontaneous mortality

| Concentration (6) | Binomial Probability (%) |
|------------------------|-----------------------------|
| 120.0 | < 0.001 |
| 100.0 | < 0.001 |
| 80.0 | < 0.001 |
| 60.0 | 5.766 |
| 40.0 | 0.002 |

Note -- The Binomial test shows that 40 and 80 6 can be used as statistically sound conservative 95 % confidence limits because the actual confidence level associated with these limits is greater than 95 %.

Note -- An approximate LC50 of 64.01 6 is obtained by nonlinear interpolation between 60 and 80 6 .

***** End Of Report *****

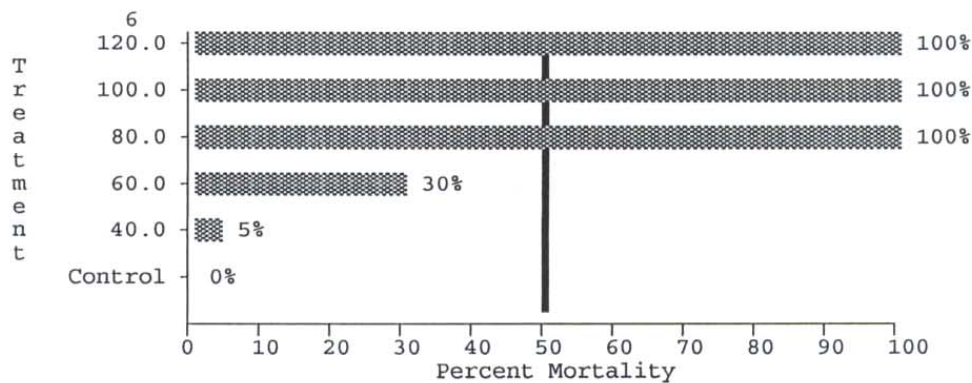
***** Version 2.5 *****

Results calculated using the Bargraph Method.

Sponsor : DAPHNIA PULEX
 Species :
 Study Number :
 Dates of test : 3-08-04 to 5-08-04
 Test Material : GLUTARALDEHIDO
 Concentration Units : 6
 Report run by :
 Date of report : 08-19-2004

| Concentration (6) | Number Exposed | Number Dead | Percent Dead | Corrected Number Dead | Corrected Percent Dead |
|------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| 120.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 100.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 80.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 60.0 | 20 | 7 | 35.0 | 6 | 30.0 |
| 40.0 | 20 | 2 | 10.0 | 1 | 5.0 |
| Control | 20 | 1 | 5.0 | 0 | 0.0 |

The following results have been corrected for spontaneous mortality



***** End Of Report *****

***** Version 2.5 *****

Results calculated using the Binomial Method.

Sponsor : DAPHNIA PULEX
 Species :
 Study Number :
 Dates of test : 3-08-04 to 5-08-04
 Test Material : MOLIBDATO
 Concentration Units : 6
 Report run by :
 Date of report : 08-19-2004

| Concentration (6) | Number Exposed | Number Dead | Percent Dead | Corrected Number Dead | Corrected Percent Dead |
|------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1200.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 1000.0 | 20 | 8 | 40.0 | 7 | 35.0 |
| 800.0 | 20 | 5 | 25.0 | 4 | 20.0 |
| 600.0 | 20 | 2 | 10.0 | 1 | 5.0 |
| 400.0 | 20 | 1 | 5.0 | 0 | 0.0 |
| Control | 20 | 1 | 5.0 | 0 | 0.0 |

The following results have been corrected for spontaneous mortality

| Concentration (6) | Binomial Probability (%) |
|------------------------|-----------------------------|
| %1200.0 | < 0.001 |
| %1000.0 | 13.159 |
| 800.0 | 0.591 |
| 600.0 | 0.002 |
| 400.0 | < 0.001 |

Note -- The Binomial test shows that 800 and 1200 6 can be used as statistically sound conservative 95 % confidence limits because the actual confidence level associated with these limits is greater than 95 %.

Note -- An approximate LC50 of 1032.76 6 is obtained by nonlinear interpolation between 1000 and 1200 6 .

***** End Of Report *****

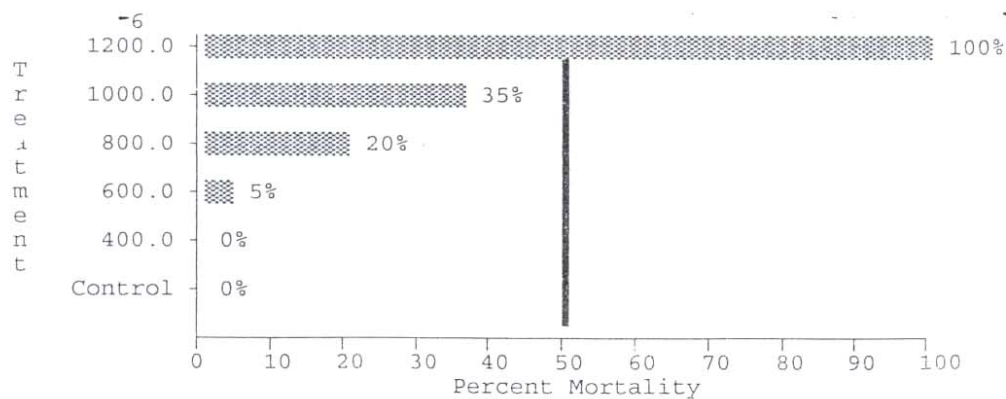
***** Version 2.5 *****

Results calculated using the Bargraph Method.

Sponsor : DAPHNIA PULEX
 Species :
 Study Number :
 Dates of test : 3-08-04 to 5-08-04
 Test Material : MOLIBDATO
 Concentration Units : 6
 Report run by :
 Date of report : 08-19-2004

| Concentration (6) | Number Exposed | Number Dead | Percent Dead | Corrected Number Dead | Corrected Percent Dead |
|------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1200.0 | 20 | 20 | 100.0 | 20 | 100.0 |
| 1000.0 | 20 | 8 | 40.0 | 7 | 35.0 |
| 800.0 | 20 | 5 | 25.0 | 4 | 20.0 |
| 600.0 | 20 | 2 | 10.0 | 1 | 5.0 |
| 400.0 | 20 | 1 | 5.0 | 0 | 0.0 |
| Control | 20 | 1 | 5.0 | 0 | 0.0 |

The following results have been corrected for spontaneous mortality



***** End Of Report *****

Anexo B. Evaluaciones tipo TIME KILL TEST

A pesar de que las industrias de antibióticos, desinfectantes y productoras de biocidas, no han señalado lineamientos estrictos para la evaluación de la eficacia de los agentes químicos contra el desarrollo y crecimiento microbiano, si existen metodologías básicas y flexibles sobre las cuales se pueden adelantar tales estudios. El objetivo de estas pruebas es determinar la conveniencia de utilizar o no, un determinado agente en un medio con características particulares de operación, perfil y actividad microbiana.

La CIC ha adaptado las pruebas tipo TKT que permiten valorar sobre la base del efecto dosis-respuesta, la capacidad de un agente microbiocida para inhibir el crecimiento y eliminar microorganismos. Teniendo en cuenta la metodología empleada para el ensayo, es de suma importancia que en el momento de analizar los resultados se consideren los siguientes aspectos:

1. Por ser un análisis a nivel de laboratorio las condiciones en las cuales se evalúa el biocida emulan las características sobresalientes (temperatura y pH), pero no todas aquellas existentes en el medio real de aplicación. Recrear estas condiciones resulta sumamente complicado, debido a la gran cantidad de variables que pueden influenciar el desarrollo de los microorganismos y cambiar la efectividad del químico.
2. Los inóculos enfrentados al biocida y las reacciones de contacto se trabajan bajo condiciones controladas ideales de crecimiento, ausentes en el sistema real.
3. Existe gran cantidad de evidencia que ha mostrado que los microorganismos dentro de las biopelículas son mucho más difíciles de eliminar que aquellos en la fase planctónica del sistema (microorganismos libres). Es importante tener esto en mente durante la interpretación de los resultados de las pruebas de evaluación del biocida dentro del sistema real.
4. Las directrices dadas por la evaluación en laboratorio deben modificarse o ajustarse a partir de los resultados del seguimiento del desempeño en el sistema real.

En conclusión, la concentración recomendada con base en un estudio TKT, el cual determina si el biocida logra alterar y bloquear el metabolismo bacteriano al grado de matar el microorganismo, puede variar enormemente de la que al final debe ser empleada en campo. Por ejemplo, se esperaría que al enfrentar un sistema totalmente dinámico un biocida pierda efectividad, lo que no resulta totalmente cierto, al considerar la atenuación de los microorganismos por el estrés causado debido a la variación de las características micro-ambientales, particulares de la zona donde se hallan.

RESULTADO DE LA EVALUACION DEL GLUTARALDEHIDO

En la evaluación del producto conteniendo glutaraldehído, se concluyó que aplicando una concentración de 200 ppm y exponiendo las bacterias durante 2 horas al agente químico, se logró disminuir la población de BSR a niveles no detectables.

