

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Unan–León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Carrera de Farmacia**



**“A la libertad por la universidad ”**

**Monografía para optar al Título de Licenciado Químico Farmacéutico.**

**Título:**

**Evaluación de la Calidad del agua potable mediante Métodos Biológicos y Físicoquímicos en Pozos Abastecedores del Municipio de Siuna. Enero- Octubre 2013.**

**Autores:**

**Br. Agueda Sayomara Rojas Acuña.**

**Br. Elvis Román Mendoza Rojas.**

**Tutora:**

**MSc. Gloria María Herrera**

**León, Diciembre 2013**



## Índice

<b>Contenido</b>	<b>páginas</b>
☉ Introducción.....	1
☉ Planteamiento del Problema.....	7
☉ Objetivos.....	8
☉ Marco Teórico.....	9
☉ Material y Método.....	49
☉ Resultados.....	59
☉ Análisis de Resultados .....	63
☉ Conclusiones.....	67
☉ Recomendaciones.....	68
☉ Bibliografía.....	69
☉ Anexos.....	73



## AGRADECIMIENTOS

*A Dios:*

Por habernos dado sabiduría, paciencia, inteligencia, salud, el entendimiento para poder formarnos profesionalmente. *¡Gracias por siempre!*

*A nuestros padres:*

Por el apoyo incondicional que nos brindan y los valores positivos que nos inculcaron, por todos los sacrificios que hicieron a lo largo de nuestra carrera, así como su comprensión y paciencia en los momentos difíciles que tuvimos.

*A nuestros hermanos:*

Por su cariño, apoyo y comprensión.

*A nuestra tutora:*

MSc. Gloria María Herrera por su infinita paciencia y entrega, su comprensión, su tiempo, generosidad al brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la realización de este trabajo. Muchas gracias por todos sus consejos, le estaremos agradecidos por siempre.

A todo el *personal administrativo* de la carrera de farmacia por su colaboración y desempeño, ya que sin su ayuda esto no fuese posible.

*Agueda y Elvis*



## DEDICATORIA

Dedico esta monografía principalmente a *Dios* por haberme dado paciencia en los momentos difíciles, por darme perseverancia, sabiduría, salud y la fortaleza para cumplir mi sueño de formarme profesionalmente.

*A mis padres, Willian G. Rojas y Teresita. Acuña.*

Por su apoyo incondicional, en especial a mi madre, esa mujer excepcional que me ha inculcado espíritu de superación, solidaridad, respeto mutuo; a no rendirme nunca y a luchar contra cualquier adversidad y que con paciencia todo se alcanza. Gracias por ser mi ejemplo a seguir.

*A mis Abuelitas, Mercedes Ramos y Deysi Rodríguez.*

Pilares fundamentales de la familia, que a lo largo de mi vida me han inculcado valores y me han dado los mejores consejos para ser una mejor persona cada día.

*A mi único hermano: Luis David* Por su cariño, apoyo y comprensión.

A todos los docentes que ayudaron a nuestro aprendizaje durante todos estos años. En especial a nuestra tutora *MSc. Gloria María Herrera* que con su sabiduría, paciencia y dedicación, ayudó a culminar nuestra monografía. Gracias, por todo se le quiere y aprecia infinitamente.

*A mi familia y amigos* que de una u otra manera han estado apoyándome a cumplir este sueño de culminar este trabajo

*Agueda Rojas.*



## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado primeramente a *Dios* porque Él es quien hace posible las cosas, me dio la vida, la sabiduría, la salud y la fuerza necesaria para poder culminar con éxito mi carrera.

*A mis padres, Irma Rojas y Pablo Mendoza*

Quienes me dieron su amor, comprensión y apoyo incondicional siempre, que a lo largo de mi vida me han inculcado valores y me han dado los mejores consejos para ser una persona de bien.

*A mis hermanos Douglas, Ara, Reyna, Pablo y Génesis,*

Por su gran apoyo, comprensión y motivación a cada momento.

A los docentes y en especial a nuestra tutora *MSc Gloria Herrera* que con su sabiduría y paciencia terminamos este trabajo. A todas aquellas personas que de una u otra forma prestaron directa e indirectamente su apoyo.

*Elvis Mendoza*



## INTRODUCCIÓN

El agua es un compuesto muy importante en la vida diaria, se necesita para la subsistencia de todos los seres vivos, para la mayoría de procesos industriales es el fluido de trabajo. Por ser el solvente universal es común encontrar en aguas superficiales y subterráneas un gran número de compuestos que en determinadas concentraciones pueden ser nocivas para la salud de los consumidores, además, puede contener microorganismos indeseables. Este recurso se encuentra en la naturaleza en distintas formas: nevados, lagunas, cursos de aguas superficiales (riachuelos y ríos) y agua subterránea, sin embargo en algunos de los casos el agua presenta impurezas por tal razón se realizan procesos que determinan la calidad del agua.<sup>1</sup>

La calidad del agua se refiere a las condiciones en que esta se encuentra respecto a las características físicas, químicas y biológicas, en su estado natural o después de ser alteradas por el accionar humano. El concepto de calidad del agua ha sido asociado al uso del agua para consumo humano, entendiéndose que el agua es de calidad cuando puede ser usada sin causar daño. Sin embargo, dependiendo de otros usos que se requieran para el agua, así se puede determinar la calidad del agua. En este contexto, se considera que el agua es de buena calidad cuando está exenta de sustancias y microorganismos que sean peligrosos para los consumidores y que transmitan sensaciones sensoriales desagradables para el consumo, como el color, el olor, el sabor o turbidez. La importancia de la calidad del agua radica en que el agua es uno de los principales medios para la transmisión de muchas enfermedades que afectan a los humanos.<sup>2</sup>

Un agua clara y potable es una necesidad humana básica; sin embargo, el acceso a ella continúa siendo una gran dificultad para muchas comunidades de países en desarrollo. La contaminación de agua por organismos patógenos constituye todavía una fuente de enfermedades. Además estas poblaciones se enfrentan a contaminación química proveniente del uso de agroquímicos, actividades industriales y fuentes domésticas. A pesar de este panorama, en las décadas



pasadas se ha trabajado intensamente en el desarrollo y validación de diversos métodos de control microbiológico de agua; y varias técnicas han sido adaptadas para uso a nivel de comunidad de manera sustentable. Lamentablemente, los esfuerzos realizados en torno a la introducción de ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua concernientes a la contaminación química no han sido suficientes hasta el momento.<sup>3</sup>

La evaluación de la calidad de las aguas requiere de la aplicación de metodologías tanto químicas como biológicas con las que poder detectar no sólo los contaminantes presentes en ellas sino también los posibles efectos indeseables que pueden ocasionar en el medio ambiente y la salud pública. Por lo tanto, se puede decir que la calidad del agua se mide por la presencia y cantidad de contaminantes y para conocerse con exactitud es necesario realizar esta metodología de análisis del agua en un laboratorio especializado. Entre estos métodos que determinan la calidad del agua están los físicos-químicos, en los cuales tenemos la turbidez, pH, sólidos disueltos; ensayos bacteriológicos, como la determinación de enterobacterias y ensayos toxicológicos a través de la aplicación de bioensayos de toxicidad aguda como el Bioensayo de *Lactuca Sativa L.*<sup>3</sup>

Es ampliamente conocido que una de las principales fuentes de agua dulce, es el agua subterránea, actualmente está siendo receptora de consecuencias provocadas por las diferentes actividades que lleva a cabo el ser humano haciendo de éste un recurso altamente vulnerable al acceso de la misma, ya sea por contaminación y/o por reducción de las fuentes de abastecimiento de agua que reduce los usos potenciales de la misma.

Al revisar los antecedentes sobre este estudio, observamos que si bien es cierto existen investigaciones realizadas sobre este tema a nivel regional, no contamos con estudios realizados en el Municipio de Siuna sobre la evaluación de la calidad del agua de consumo en aguas de pozos.



Un estudio realizado entre marzo 1999 a marzo del 2000, por el Centro de Investigaciones Químicas. **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo México llevo a cabo la Caracterización de las aguas subterráneas de la ciudad de Zimapán Hidalgo, México.** Para ello se seleccionaron 11 puntos de muestreo en los que se determinaron 28 parámetros físico-químicos de las aguas colectadas. De forma general, estas aguas presentaron propiedades fisicoquímicas normales clasificadas como aguas bicarbonatadas-cálcicas y bicarbonatadas-mixtas con bajos niveles de sulfatos, cloruros, sodio y potasio; pero presentaron concentraciones de Arsénico muy elevadas. Por los resultados obtenidos del análisis físico-químico que presentan las aguas de Zimapán se pudo concluir que éstas se comportan como aguas normales y potables del tipo bicarbonatado cálcico y mixto apto para el consumo humano, a no ser por los elevados valores de la concentración de arsénico presente.<sup>5</sup>

En Octubre del 2004, la Universidad de San Carlos, Guatemala; realizó un estudio sobre la **Determinación de la Calidad del Agua para Agua de Consumo.** Se muestrearon un total de 4 pozos, a las muestras recolectadas se realizaron ensayos físico – químicos tales como pH, dureza del agua, alcalinidad, sólido totales, entre otros y ensayos bacteriológicos; obteniéndose como conclusión que: El agua analizada de los cuatro pozos muestreados cumple con los límites de la norma COGUANOR NGO 29001, por tanto, desde el punto de vista fisicoquímico y bacteriológico, el agua es potable y adecuada para consumo humano<sup>3</sup>.

Un estudio realizado en el 2005, por la Carrera de Biología, de la UNAN – León, sobre el **Diagnostico preliminar de la calidad del agua de consumo en las comunidades del sector rural noreste del municipio de León,** situado al pie de la cordillera de los Maribios en tres comarcas territoriales: El Tololar, Palo de Lapa y Monte Redondo. Se muestreo 69 fuentes de agua que abastecen a un 47.9% de la población total del sector. Sobre estas muestras se realizaron análisis microbiológicos completos (calidad bacteriológica del agua), análisis fisicoquímicos (calidad fisicoquímica) y el análisis de plaguicidas. Los resultados principales del estudio han sido que el 97.1% de las muestras analizadas no son aptas para consumo humano. La contaminación predominante es la microbiana (97.1% de las muestras



están contaminadas, según el análisis microbiológico completo), seguida de la contaminación fisicoquímica (18.8%) y por último la contaminación con plaguicidas (31.3%)<sup>6</sup>.

Un estudio realizado por Ecosystem Sciences Foundation, en conjunto con Ciencias del Ecosistema A. C., Medio Ambiente y Ecología del Gobierno Municipal de San Miguel de Allende y SAPASMA, reunieron y analizaron muestras de agua subterránea en las comunidades del municipio a partir de agosto de 2005 a febrero de 2006. 120 fuentes de agua potable rurales, fueron seleccionadas para muestreos y determinar contaminantes tóxicos y bacterias Coliformes; también fueron evaluados otros parámetros para determinar la calidad del agua, tales como PH, alcalinidad y dureza. De las 101 muestras de agua analizadas, 20 muestras excedieron los límites permitidos según estándares del gobierno mexicano para agua potable, para los niveles de sustancias toxicas. 69 muestras dieron positivo para Coliformes; no se detectó ningún Coliformes fecal. Los niveles de arsénico de todos los sitios muestreados estaban debajo de los estándares de agua potable del gobierno mexicanos y no plantean un riesgo para la salud. Más de cien mil personas residen en las áreas rurales, donde la prueba fue conducida y todas dependen del agua subterránea para agua potable. La investigación acerca de las concentraciones de sustancias toxicas en aguas de pozos de comunidades rurales del municipio de San Miguel de Allende, alcanzó resultados que indican que es necesaria más investigación. Los demás parámetros investigados, la concentración de arsénico, pH, dureza y la alcalinidad, se encontraron dentro de los rangos aceptados, por lo tanto, no necesariamente hacen falta una investigación significante.<sup>7</sup>

En (Villa Clara, Camagüey y Granma) de Cuba se realizó un estudio para evaluar las concentraciones de **“Nitratos y nitritos en fuentes de aguas subterráneas y su impacto sobre la salud en estas tres Provincias del País”**, ejecutado por el INHEM en el período comprendido entre noviembre de 2007 a diciembre de 2009”<sup>8</sup>



Para la Evaluación del efecto toxicológico en las muestras de agua se emplearon, semillas de *Lactuca sativa* L. Se realizaron 62 determinaciones, para lo cual se colectaron 100 ml de agua por muestra en cada pozo, almacenándose en refrigeración (4°C) hasta su análisis. La toxicidad de las muestras fue evaluada mediante la medición de los efectos subletales (inhibición de la prolongación de la raíz) como por el porcentaje de semillas germinadas con relación al control. Con relación a la evaluación toxicológica de las aguas, se encontró diferencias significativas entre las medias de la longitud de las raíces de los pozos analizados y el control negativo, en 29 de los 30 pozos. Solo las muestras de 2 pozos mostraron un resultado no tóxico en relación al por ciento de semillas germinadas, el resto de los pozos mostraron valores tóxicos y muy tóxicos.<sup>8</sup>

Un estudio realizado en el 2013, por alumnos de la Carrera de Farmacia, de la UNAN – León, sobre la **Determinación de la Calidad del Agua Mediante Indicadores Biológicos Y Físicoquímicos en la Comunidad El Paragua. Malpaisillo**. Se realizó el ensayo microbiológico por el método Número más probable y se determinó: la presencia de Coliformes Totales con un 100% y Coliformes Fecales en un 70% de las muestras de los pozos y solo un 10 % de las muestras de grifo resultaron positivas, cuyos valores exceden el límite máximo permisible según lo declarado por el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano (DS N° 031-2010-SA), lo que las hace no apta para consumo humano. En relación al bioensayo de toxicidad aguda *Allium cepa* L., las muestras en estudio provocaron la inhibición del crecimiento normal de la raíz de *Allium cepa*; para confirmar la presencia de esta sustancia tóxica se procedió a realizar el ensayo colorimétrico para determinar plomo la cual se presentaron desde 2 ppm a 6 ppm del tóxico, demostrando así que los valores de estas exceden el límite máximo permisible según lo declarado por el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano (DS N° 031-2010-SA) que deben de ser no más de 0.010 ppm, lo que las hace no apta para consumo humano. Por lo tanto el 100 % de las aguas de pozo de la Comunidad El Paragua del Municipio de Malpaisillo no están aptas para consumo humano en cuanto a parámetros Microbiológicos y Físico-Químicos y las aguas de grifo si cumplen con dichos parámetros.<sup>9</sup>



El municipio de Siuna presenta un abastecimiento de agua aproximadamente del 60% de la población urbana de Siuna cuenta con un servicio de agua no potable, es decir es agua entubada, el 40% restante se abastece con agua a través de pozos domiciliarios. El municipio cuenta con una pila con una capacidad de 20,000 litros de agua ubicada en el barrio Pedro Joaquín Chamorro sector # 1. Actualmente el municipio es abastecido del vital líquido a través de 2 acueductos, localizados en la comunidad de Campo 1, con una capacidad de abastecer aproximadamente a 1,000 viviendas cada uno. La población beneficiada con agua segura es de 5,266 habitantes, el otro acueducto está localizado en la comunidad de Ully con una capacidad de 510 metros cúbicos, equivalente a 338,640 galones.<sup>4</sup>

Con relación al agua y saneamiento, está demostrado que el agua preparada para el consumo humano, el saneamiento ambiental y las buenas prácticas de higiene son factores que pueden reducir la morbilidad en niños y niñas por causas de enfermedades diarreicas. Existe en el país una correlación entre la falta de agua potable, el alto nivel de infecciones gastrointestinales y la alta tasa de mortalidad infantil. Sumado a esto, en el Municipio de Siuna se han presentado en lo que va del año 1005 casos de EDA.

El conocimiento de la calidad del agua es de vital importancia para todas las personas que la utilizan en sus hogares, ya que puede ocasionar severos daños a la salud de los consumidores. En este trabajo se evalúan los principales factores que determinan la calidad del agua para consumo humano, en pozos abastecedores de agua potable ubicados en el barrio Pedro Joaquín Chamorro y en las comunidades Ully y Campo 1 del Municipio de Siuna, Región Autónoma del Atlántico Norte, aplicando métodos físicos químicos, bacteriológicos y el Ensayo de Toxicidad Aguda del *Lactuca Sativa L.* para la determinación de sustancias tóxicas. De esta manera aportar datos innovadores como base para estudios más avanzados.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades relacionadas con la contaminación del agua tienen una gran repercusión en la salud de las personas. Las medidas destinadas a mejorar la calidad del agua de consumo proporcionan beneficios, significativos para la salud. En lo que va del año las enfermedades diarreicas agudas han ido en aumento, se han identificado 1005 casos de enfermedades diarreicas en el centro de salud Carlos Centeno del Municipio de Siuna (R.A.A.N), según nos expuso la Dra. Denia Ordoñez Casco Responsable del Departamento de Epidemiología del Centro Salud ella refiere que esto puede estar causado por problemas como: infecciones intestinales y contaminación del agua. Por tal razón nos surgió el siguiente problema:

¿Los pozos abastecedores de agua potable del municipio de Siuna son aptos para consumo humano?, para darle respuesta a nuestro problema utilizaremos métodos Biológicos (Determinación de Coliformes Fecales, y el Bioensayo *Lactuca Sativa L* para la determinación de Sustancias Tóxicas) y fisicoquímicos (pH, turbidez y sólidos disueltos).



## OBJETIVOS:

### General:

- ✓ Evaluar la calidad del agua potable utilizando Métodos Biológicos y Físicoquímicos, en pozos abastecedores del Municipio de Siuna de la RAAN. Enero– Octubre 2013.

### Específicos:

- ✓ Determinar la presencia de Coliformes totales y fecales mediante el método del NMP en las muestras recolectadas.
- ✓ Efectuar el ensayo de toxicidad aguda del *Lactuca Sativa* L. para determinar la presencia de sustancias tóxicas en las muestras de agua potable de los pozos abastecedores.
- ✓ Identificar sólidos disueltos como método físicoquímico en agua potable de los pozos abastecedores del Municipio de Siuna.
- ✓ Determinar el pH como método físicoquímico en agua potable de los pozos abastecedores del Municipio de Siuna.



## MARCO TEÓRICO

### Municipio Siuna

Desde finales del siglo pasado se despertó el interés por la explotación de los metales preciosos en Siuna. El municipio nace con el descubrimiento de los depósitos minerales, cuando fue puesta en marcha la explotación a pequeña escala de la minería en 1908 empieza el auge industrial del oro y la plata mediante el establecimiento de empresas extranjeras que se dedicaron a la explotación de metales preciosos. Es así como surge y empieza a estructurarse y desarrollarse el municipio de Siuna.<sup>10</sup>

El Municipio de Siuna se encuentra ubicado en la parte sur- oeste de la Región Autónoma del Atlántico Norte, geográficamente es el más alejado de la Cabecera Regional ubicado a 220 Km del Municipio de Puerto Cabezas, sede regional y a 320 Km de la ciudad Capital por vía terrestre, se encuentra localizado entre las coordenadas 130° 44 de latitud norte y 84° 46` de longitud Oeste.<sup>4</sup>

Posee una extensión territorial de 5,039 km<sup>2</sup>, lo que corresponde al 18.7 % del territorio atlántico y al 4.7% del territorio nacional. La densidad poblacional es de 14 habitantes por Kilómetros cuadrados. Se encuentra a una altura de 200 metros sobre el nivel del mar. Actualmente atiende a una población de 88,375 habitantes según proyecciones poblacionales de INEC. La población urbana corresponde solamente al 15% de la población y la población rural es del 85%. El municipio está conformado por un total de 204 comunidades y 20 barrios en el área urbana. La población en este municipio es mayoritariamente joven, el 53 % son menores de 15 años, con respecto al sexo el 49% son hombres y el 51% son mujeres. Con relación a los niveles de pobreza, se estima que el 76.5% de la población es pobre y el 41.2% viven en condiciones de extrema pobreza.<sup>4</sup>



### **Suministro de Aguas en Siuna.**

Con relación al abastecimiento de agua aproximadamente el 60% de la población urbana de Siuna cuenta con un servicio de agua no potable, es decir es agua entubada, el 40% restante se abastece con agua a través de pozos domiciliarios que carecen de mantenimiento e higiene. En general, todas las fuentes de abastecimiento de agua están contaminadas por Coliformes fecales, excretas de animales y por sustancias tóxicas. No se hacen controles de calidad, las presas están contaminadas por la escorrentía que cae en las mismas y la falta de hábitos higiénicos de la población. El municipio cuenta con una pila con una capacidad de 20,000 litros de agua ubicada en el barrio Pedro Joaquín Chamorro sector # 1.<sup>4</sup>

Actualmente el municipio es abastecido del vital líquido a través de 2 acueductos, localizados en la comunidad de Campo 1, con una capacidad de abastecer aproximadamente a 1,000 viviendas cada uno. La población beneficiada con agua segura es de 5,266 habitantes, el otro acueducto está localizado en la comunidad de Ully con una capacidad de 510 metros cúbicos, equivalente a 338,640 galones.<sup>4</sup>

Con relación a las conexiones domiciliarias existentes a nivel Urbano se contabilizan un total de 1,290 conexiones, las cuales abastecen a la población con una periodicidad de cada 3- 4 días del vital líquido. Es evidente el problema del agua potable en todo el municipio. A nivel rural no existen conexiones.<sup>4</sup>

Los pobladores que habitan en el área rural se abastecen directamente de fuentes de aguas superficiales y pozos comunales sin darle ningún tipo de tratamiento. Además según la Alcaldía existen 6 fuentes comunales de agua con las que se benefician a un total de 6,269 personas, como sistema de tratamiento se utiliza cloración del agua, aplicando 1 gota de cloro por cada litro de agua, esto lo realiza la misma población con orientaciones del MINSA.<sup>4</sup>



### **La contaminación del agua**

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable ya a principios del siglo XIX, cabe añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta.<sup>11</sup>

Un agua clara y potable es una necesidad humana básica; sin embargo, el acceso a ella continúa siendo una gran dificultad para muchas comunidades de países en desarrollo. La contaminación de agua por organismos patógenos constituye todavía una fuente de enfermedades importante en estos países, un gran número de poblaciones se enfrenta, además, con una contaminación química creciente proveniente del uso de agroquímicos, actividades industriales y fuentes domésticas.<sup>12</sup>

### **El agua puede sufrir diferentes tipos de contaminación entre las cuales tenemos:**

- ✓ Contaminación Química: una gran variedad de productos químicos, como metales, disolventes, pesticidas, herbicidas, productos industriales, detergentes, aceites y combustible se pueden acumular en el agua.
- ✓ Contaminación Microbiológica: gran cantidad de microorganismo patógeno (bacterias, virus y protozoos) pueden contaminar el agua. algunas enfermedades como el cólera y la malaria tienen su origen en el agua.
- ✓ Contaminantes que consumen oxígeno: exceso de materiales biodegradables.
- ✓ Materia en suspensión y sustancia inmiscibles.<sup>12</sup>



**Los efectos que produce la contaminación química del agua son múltiples; entre los más importantes cabe destacar:**

1. Acción tóxica y cancerígena
2. Incidencia sobre la producción de alimentos
3. Limitación del uso del agua con fines recreativos
4. Reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario.

Los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que muchas veces las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas, y el problema aún se complica más por la presencia simultánea de diversos contaminantes.<sup>11</sup>

**Los principales contaminantes del agua son los siguientes:**

- ‡ Aguas residuales y otros residuos que demandan oxígeno (en su mayor parte materia orgánica, cuya descomposición produce la desoxigenación del agua).
- ‡ Agentes infecciosos que inhiben el desarrollo de otras formas de vida, como las bacterias o los pirógenos.<sup>13</sup>
- ‡ Nutrientes vegetales que pueden estimular el crecimiento de las plantas acuáticas. Éstas, a su vez, interfieren con los usos a los que se destina el agua y, al descomponerse, agotan el oxígeno disuelto y producen olores desagradables.<sup>13</sup>
- ‡ Productos químicos, incluyendo los pesticidas, diversos productos industriales, las sustancias tensioactivas contenidas en los detergentes, y los productos de la descomposición de otros compuestos orgánicos.<sup>13</sup>
- ‡ Petróleo, especialmente el procedente de los vertidos accidentales.
- ‡ Minerales inorgánicos y compuestos químicos.
- ‡ Sedimentos formados por partículas del suelo y minerales arrastrados por las tormentas y escorrentías desde las tierras de cultivo, los suelos sin protección, las explotaciones mineras, las carreteras y los derribos urbanos.<sup>13</sup>



- ‡ Sustancias radiactivas procedentes de los residuos producidos por la minería y el refinado del uranio y el torio, las centrales nucleares y el uso industrial, médico y científico de materiales radiactivos.<sup>13</sup>

### **Evaluación de la toxicidad de efluentes.**

Una de las aplicaciones más extendidas del monitoreo de efectos biológicos con ensayos de toxicidad, ha sido la evaluación de descargas líquidas o efluentes (aguas servidas de origen doméstico, municipal o industrial descargadas de manera puntual sobre cuerpos receptores), en el marco de programas de control ambiental. Los métodos utilizados se han extendido y adaptado para cualquier tipo de fluidos (agua de pozo o extractos de sedimentos y suelos u otros materiales sólidos). El monitoreo de efluentes se ha orientado hacia la evaluación del cumplimiento de las reglamentaciones de descarga, para la predicción del impacto de descargas sobre sitios específicos del cuerpo receptor, para evaluar el efecto combinado de mezclas complejas de compuestos tóxicos y mejoras en procesos tecnológicos de control de la contaminación. La US EPA ha desarrollado procedimientos específicos y detallados para limitar las descargas en función de objetivos de calidad aceptables para el cuerpo receptor. Basado en ensayos de toxicidad que evalúan efectos letales y subletales de sustancias específicas. Existen criterios regionales para definir zonas de mezcla del efluente en el cuerpo receptor basadas en información toxicológica provenientes de ensayos de toxicidad.<sup>14</sup>

### **Toxicidad de aguas superficiales**

La evaluación ecotoxicológica de calidad de agua con ensayos de toxicidad de laboratorio o experiencias de campo es un diagnóstico complementario a investigaciones en curso, en las que se presentan evidencias de posible contaminación. Constituyen una herramienta para el diagnóstico de efectos, complementario al estudio de las causas, determinado por el análisis químico. Las evaluaciones de toxicidad de aguas superficiales, por lo general se realizan en sitios en los que se sospecha la existencia de contaminación. No es de esperar encontrar importantes efectos letales sobre los organismos, o sólo de manera transitoria, excepto en el



caso de cuerpos de agua altamente contaminados. Los ensayos de toxicidad suelen ser utilizados en combinación con otras técnicas; algunas de estas combinaciones se resumen a continuación: <sup>14</sup>

- † Relacionar resultados provenientes de ensayos de toxicidad de laboratorio con aguas superficiales, o ensayos in situ, para estimar concentraciones de vertidos de efluentes o compuestos químicos específicos a lo largo de un curso. Resulta ser más directo y convincente que los métodos predictivos.<sup>14</sup>
- † Verificar el comportamiento de un contaminante o mezcla en el cuerpo de agua teniendo en cuenta posibles procesos de detoxificación, como por ejemplo: formación de complejos con materia orgánica disuelta o particulada, influencia de la dureza del agua, contenido de oxígeno disuelto, pH, temperatura, potencial redox. Debe considerarse que existen publicaciones orientadas al estudio de estos factores, a través de relaciones basadas en cálculos teóricos o empíricos (ejemplo: toxicidad de metales con el cambio de dureza).<sup>14</sup>
- † Relacionar la toxicidad del agua del cuerpo receptor y los efectos observados en comunidades características del lugar.<sup>14</sup>

### **Calidad del agua**

El conocimiento de la calidad del agua es de vital importancia para todas las personas que la utilizan tanto en sus hogares como en la industria, ya que puede ocasionar severos daños a la salud de los consumidores o a los equipos industriales. En este trabajo se evalúan los principales factores que determinan la calidad del agua para consumo humano y uso industrial, quedando como base para estudios más avanzados.<sup>13</sup>

La calidad del agua no es un criterio completamente objetivo, pero está socialmente definido y depende del uso que se le piense dar al líquido, por lo que cada uso requiere un determinado estándar de calidad. Por esta razón, para evaluar la calidad del agua se debe ubicar en el contexto del uso probable que tendrá. Así por ejemplo el estándar de calidad



para el agua apta para consumo humano no tendrá los mismos parámetros de calidad que los necesarios para el agua que forma parte de una laguna.<sup>13</sup>

Por eso podríamos definir a la calidad del agua, como un estado de ésta, caracterizado por su composición físico-química y biológica, en que resulta inocua para la vida, dependiendo de su utilidad biológica.<sup>13</sup>

En consecuencia podemos decir que un agua de buena calidad es aquella que está libre de contaminantes, es decir cualquier tipo de elemento o energía que cause efectos indeseables para la vida.<sup>13</sup>

La calidad del agua se puede también determinar por un número de análisis cuantitativos en el laboratorio, tales como pH, sólidos totales (TS), la turbidez y la determinación de coliformes.<sup>13</sup>

### **Métodos para determinar la calidad del agua**

La evaluación de la calidad del agua se realiza mediante una serie de análisis de laboratorios dirigidos a conocer cualitativa y cuantitativa, las características físicas, químicas y biológicas más importante que puedan afectar su uso real y potencial, como el tipo y grado de tratamiento requerido para un adecuado acondicionamiento.<sup>15</sup>

A fin de garantizar la confiabilidad de los resultados, que arrojen tales análisis de laboratorio, las técnicas y procedimientos deben de haber sido cuidadosamente desarrollados, evaluados y con los niveles de sensibilidad requeridos, además deben de establecer un conjunto de normas y procedimientos para la correcta captación traslado y preservación de muestra de agua. Dentro de estas pruebas tenemos: <sup>15</sup>



## I. Pruebas Fisicoquímicas.

### A. PH

Es el logaritmo de la recíproca de la concentración del ion hidrogeno, o más precisamente, de la actividad del ion hidrogeno, en moles por litro. En el agua un número constante de moléculas se ionizan de manera que el producto de las concentraciones de los iones (H+) y (OH-) es  $10^{-14}$  ( $K_w$ ), la cual es la constante de disociación del agua. En agua pura existe el mismo número de iones (H+) y (OH-) o sea  $10^{-7}$ . La adición de ácidos o bases desplaza este equilibrio hacia uno u otro sentido, el pH mide esta característica del agua.<sup>15</sup>

**La escala para análisis de pH es la siguiente:**

PH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	Acido							Neutro							Básico <sup>13</sup>

El nivel de pH tiene un efecto en muchas fases del proceso de tratamiento de las aguas y se puede determinar midiendo el pH de una disolución, empleando métodos en función de la precisión con que queramos hacer la medida.<sup>16</sup>

✚ Para realizar medidas del pH que no necesiten ser muy precisas se utilizan unas sustancias llamadas indicadores, que varían reversiblemente de color en función del pH del medio en que están disueltas. Se pueden añadir directamente a la disolución o utilizarlas en forma de tiras de papel indicador.<sup>16</sup>

✚ Para realizar medidas exactas se utiliza un pH-metro, que mide el pH por un método potenciométrico.<sup>16</sup>

Los indicadores suelen ser ácidos o bases débiles que se caracterizan porque su molécula neutra tiene un color diferente al de la forma iónica. Por lo general, este cambio de color



obedece a que la pérdida o ganancia de un  $H^+$  por parte del indicador provoca una reorganización interna de los enlaces.<sup>16</sup>

En medio ácido, el equilibrio está desplazado hacia la izquierda, ya que el indicador capta los  $H^+$  en exceso, con lo cual predomina la forma incolora. En medio alcalino, los  $OH^-$  libres consumen los  $H^+$  y el equilibrio se desplaza hacia la derecha con lo cual aparecerá la forma coloreada del indicador<sup>16</sup>

El pH-metro realiza la medida del pH por un método potenciométrico. Este método se basa en el hecho de que entre dos disoluciones con distinta  $[H^+]$  se establece una diferencia de potencial. Esta diferencia de potencial determina que cuando las dos disoluciones se ponen en contacto se produzca un flujo de  $H^+$ , o en otras palabras, una corriente eléctrica. En la práctica, la medida del pH es relativa, ya que no se determina directamente la concentración de  $H^+$ , sino que se compara el pH de una muestra con el de una disolución patrón de pH conocido.<sup>16</sup>

Para ello se utiliza un electrodo de pH. Cuando el electrodo entra en contacto con la disolución se establece un potencial a través de la membrana de vidrio que recubre el electrodo. Este potencial varía según el pH. Para determinar el valor del pH se necesita un electrodo de referencia, cuyo potencial no varía. El electrodo de referencia puede ser externo o puede estar integrado en el electrodo de pH.<sup>16</sup>

## **B. Sólidos totales o residuos.**

Los sólidos totales (ST) son la suma de todos los sólidos disueltos y suspendidos en el agua, que quedan después de secar la muestra, el residuo total del agua se determina a 103-105c°. Los sólidos totales (ST) pueden ser tanto las sustancias orgánicas como inorgánicas, los microorganismos y partículas más grandes como la arena y arcilla.<sup>17</sup>



Las partículas en el agua pueden estar:<sup>17</sup>

- ❖ Disueltas, formando átomos y moléculas invisibles. En este caso, no influirán físicamente en la turbidez pero si se podrán definir su color y sabor.
- ❖ Formando sistemas coloidales, que son partículas visibles pero no lo suficientemente pesadas como para sedimentarse en el agua; permanecen en el cuerpo hídrico y por ello son las causantes de la turbiedad neta del agua.
- ❖ En forma de partículas relativamente grandes, las cuales se precipitan rápidamente cuando el agua se somete a reposo.

La determinación de los sólidos es importante para evaluar la calidad del agua y para controlar los procesos de tratamiento en aguas potables y residuales. Los sólidos totales por ser valores absolutos dan muy poca información sobre la composición del líquido a evaluar.<sup>15</sup>

Los sólidos se clasifican en filtrables y no filtrables, a su vez, cada uno de estos se dividen en volátiles y no volátiles. La porción volátil representa el material orgánico y la no volátil el material inorgánico presente.<sup>15</sup>

- **Sólidos volátiles y fijos.** Los sólidos volátiles son aquellos que se evaporan durante la calcinación a 550°C en mufla (materia orgánica) y el residuo que queda son los sólidos fijos (materia Inorgánica).<sup>17</sup>
- **Sólidos disueltos.** Son sólidos filtrables; es decir, los que pasan en el proceso de filtración. Son sales y sólidos en estado coloidal. Estas partículas son menores a un micrómetro. Es el residuo que queda después de secar la muestra a 180°C.<sup>17</sup>



- **Sólidos suspendidos:** son los que están presentes en la muestra, excepto los solubles y los sólidos en fino estado coloidal. Se considera que tienen partículas superiores a un micrómetro y que son retenidas por filtración en un laboratorio de análisis<sup>17</sup>

El análisis para obtener los sólidos totales consiste en tomar una muestra del agua a analizar (25-50ml), que se coloca en un crisol de platino o porcelana de 100ml de capacidad y luego se somete a evaporación a 103<sup>0</sup>C.<sup>15</sup>

Los sólidos filtrables o disueltos miden la concentración de sólidos disueltos en el agua. Para su determinación se utiliza un filtro de fibra de vidrio, filtro de membrana, papel de filtro lavado con ácido, o con un crisol de fondo poroso. Se toma un volumen conocido del filtrado (25-50ml) y se repite el procedimiento utilizado para medir el residuo total.<sup>15</sup>

Los sólidos no filtrables o suspendidos miden los sólidos suspendidos o que son susceptibles de sedimentar al fondo de los cuerpos de agua. La determinación se hace filtrando a través de un filtro de fibra de vidrio un volumen conocido de agua, luego se seca el filtro a 103<sup>0</sup>C-105C y se pesa la materia retenida en el mismo.<sup>15</sup>

El residuo volátil se determina al calcinar la muestra a 550<sup>0</sup>C en un horno de mufla. Su medición es importante puesto que da una medida indirecta de la materia orgánica presente.<sup>15</sup>

Los sólidos fijos son aquellos residuos minerales que no se volatilizan cuando la muestra se calcina a temperatura de 550C y son considerados de naturaleza inorgánica.<sup>15</sup>

Los sólidos sedimentables miden el volumen de la materia que se deposita en el fondo de los cuerpos de agua y son útiles para determinar la eficiencia de ciertos sistemas de tratamiento de aguas residuales. La determinación se realiza en un Cono Imhoff, el cual



consiste en un recipiente de forma cónica graduado en volumen (ml), en donde se coloca un litro del líquido a evaluar, se deja en reposo durante 30 minutos o una hora y luego se lee el volumen sedimentado, expresando en ml/l.<sup>15</sup>

## **II. Ensayos de toxicidad**

### **1–Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*)**

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo. Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.<sup>3</sup>

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo, dependiendo ello



del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas. A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo de diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pre tratamiento y simplificando el procedimiento de prueba.<sup>3</sup>

Si bien *Lactuca sativa L* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.<sup>3</sup>

Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxicos de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos.<sup>3</sup>

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *Lactuca sativa L*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el



monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reusó de biosólidos.<sup>3</sup>

### **Organismos de prueba**

En este ensayo se usan semillas de lechuga de la especie *L. sativa L* variedad mantecosa.<sup>3</sup>

### **Obtención, control y conservación de las semillas**

La obtención de las semillas de lechuga se realiza en semillerías locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo.<sup>3</sup>

### **Verificación de la viabilidad de las semillas**

Previo a la implementación de la prueba, es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocotilo (coeficiente de variación < 30%).<sup>3</sup>

Es necesario además caracterizar las condiciones de germinación del lote de semillas, evaluando la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación.<sup>3</sup>

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los compuestos tóxicos.<sup>3</sup>



Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo igual o mayor al 90%, se debe aumentar el número de semillas por caja para obtener un número mínimo de 18 semillas germinadas. Por otra parte, si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados,

o en caso de contar con semillas que posean una alta variabilidad en la elongación de la radícula de los controles negativos, aun habiéndolas seleccionado de tamaño uniforme, se recomienda aumentar el número de réplicas por tratamiento.<sup>3</sup>

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante dos años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocótilo en el control negativo. En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.<sup>3</sup>

### **Procedimiento para el desarrollo de la prueba:**

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

Para realizar una curva dosis respuesta se recomienda preparar un mínimo de 5 o 6 diluciones de la muestra o compuesto a estudiar de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0.3 o 0.5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0.3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100% y 1% de la muestra realizando 5 diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0.5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1.5%) pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba exploratoria (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitan establecer el intervalo de



concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%, necesarios para calcular la CI50.<sup>3</sup>

### **Control de calidad de pruebas**

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas el valor de CE50. Se realizan cartas control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio  $\pm 2\sigma$  de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al compuesto tóxico de referencia (promedio  $\pm 2\sigma$  de la CE50 para el Zn (II) preparado a partir de sulfato de zinc).<sup>3</sup>

Como se mencionó anteriormente, la reducción en el poder germinativo (<90%) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocótilo en el control negativo a lo largo del tiempo, son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas.<sup>3</sup>

### **Desarrollo de la prueba**

Para llevar a cabo el ensayo se deben realizar los siguientes pasos:

- ✓ Colocar en cada caja Petri un disco de papel de filtro.
- ✓ Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- ✓ Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
- ✓ Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces.
- ✓ Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben



cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas las semillas en su interior y durante el período de ensayo.

- ✓ Incubar por 120 horas (5 días) a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C.
- ✓ Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.<sup>3</sup>

### Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo, sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra. Terminado el período de exposición (120 horas), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.<sup>3</sup>

### Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* L.

---

Tipo de ensayo.....	Estático.
Temperatura.....	20± 2 °C.
Calidad de luz.....	oscuridad.
Volumen de la solución de prueba.....	4ml.
Agua de dilución.....	Agua dura reconstituida
Numero de semillas por replicas.....	20.
Numero de réplicas.....	3
Duración de la prueba.....	120 horas
Efecto medido.....	Inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo .inhibición de la germinación.
Resultado final.....	CE50 o CI50 o % inhibición
Aceptabilidad de los resultados.....	Germinación > 90%
Control positivo y negativo de acuerdo con los valores admitidos en las cartas control.	
Control positivo.....	Zn (II) a partir de ZnSO4

---



### **Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo**

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas, correspondientes a cada concentración del compuesto tóxico o dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones .<sup>3</sup>

### **Estadios por los que atraviesa la semilla *Lactuca sativa L* durante el ensayo de germinación y elongación.**

Antes de retirar las plántulas de las cajas Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocótilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.<sup>3</sup>

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo, es proceder a congelar las cajas Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado). De esta manera las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo. Por otro lado, antes de congelar



el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el período de exposición.<sup>3</sup>

### **Expresión de resultados**

Se realizan los siguientes cálculos:

- ③ Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas de cada repetición.<sup>3</sup>
- ③ Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.<sup>3</sup>
- ③ Porcentaje de inhibición en la germinación.
- ③ Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración.<sup>3</sup>

Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (CI50/CE50) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.<sup>3</sup>

### **Interpretación de los resultados**

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocótilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos



casos se ha observado que al finalizar el período de exposición la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el período de ensayo, sin renovar la exposición a la muestra, las semillas comienzan a germinar. La vitalidad de las semillas que no han germinado es posible verificarla mediante la prueba de tetrazolium para viabilidad, pudiendo de esta manera asignarle con certeza a la inhibición de la germinación, el valor e importancia de un efecto letal. No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad aunque el efecto en la germinación sea reversible.<sup>3</sup>

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocótilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final u hormesis no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (por ejemplo Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales conjuntamente con otros organismos como parte de una batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocótilo o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.<sup>3</sup>

### **Aceptabilidad de los resultados**

El ensayo deberá repetirse en caso de que:

En el control negativo el porcentaje de germinación sea inferior al 90 % y exista una alta variabilidad en la elongación de la radícula (coeficiente de variación > 30%).<sup>3</sup>

- En el control positivo el porcentaje de germinación sea inferior al 90 % y la variación de la sensibilidad de las semillas se encuentre fuera de lo permitido por las cartas control.<sup>3</sup>
- Existan posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles.<sup>3</sup>



- Se presente toxicidad del sustrato. Cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se ha tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.<sup>3</sup>
- Se presente suciedad de las cajas Petri. Si no es posible utilizar material desechable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.<sup>3</sup>
- Se presente un exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel, lo que determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.<sup>3</sup>
- Se presente un déficit hídrico durante el período de exposición. Se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se está experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del compuesto cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.<sup>3</sup>
- Se produzca una exposición a la luz durante el proceso de inhibición. Inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel filtro, se recomienda tapar y envolver las cajas Petri, cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).<sup>3</sup>
- Se presente una elevación de la temperatura de ensayo. Las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termo dormancia o dormancia inducida por la temperatura).<sup>3</sup>



## **2-Ensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa L* mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla.**

### **Principio**

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium cepa L*) se rehidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación. <sup>3</sup>

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al tóxico con las de cebollas no expuestas, luego de un periodo de 72 h de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control.<sup>3</sup>

### **Reactivos y Materiales**

Bulbos de *Allium cepa L* (cebolla amarilla)

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de 1.5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas o raíz. Pueden ser obtenidos del mercado local o adquiridos a través de algún proveedor. <sup>3</sup>

Previo al montaje de la prueba, los bulbos deben limpiarse eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí o instrumento punzante, los restos de tejido y raíces del área radicular. No se deben dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejidos es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por dos horas y secar.<sup>3</sup>



### **Medio de crecimiento**

El medio de crecimiento utilizado para el desarrollo del ensayo se indica en el resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Allium cepa L.* La solución madre preparada de acuerdo con lo indicado se diluye diez veces con agua destilada, y el pH se ajusta a siete antes de utilizar. También se puede utilizar agua dura o agua de la llave como medio de crecimiento. En el caso de usar cualquiera de estas opciones el control negativo y el agua utilizada para preparar las diluciones de los compuestos químicos o las muestras deberá ser la misma.<sup>3</sup>

### **Almacenamiento de los bulbos de cebolla**

Se recomienda adquirir los bulbos en vísperas de la realización de pruebas o en su defecto, almacenarlos en un lugar donde se puedan garantizar condiciones secas, y una temperatura entre 10 y 20 °C. En algunas regiones, los bulbos pueden mantenerse almacenados hasta por un año, sin embargo, en zonas geográficas donde la temperatura y humedad son altas, el almacenamiento está limitado a unos pocos días.<sup>3</sup>

### **Procedimiento de la prueba**

#### **Preparación de diluciones**

Generalmente se sugiere el empleo de una serie de cuatro concentraciones, un control negativo y uno o dos controles positivos. Para su preparación se emplea el método de dilución en forma secuencial aplicando un factor de 0.2 o 0.3.<sup>3</sup>

Cuando se va a llevar a cabo una evaluación presuntiva puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas, por ejemplo: 100; 10; 1; 0.1; 0.01, etc., lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI50).<sup>3</sup>

Se recomienda igualmente utilizar agua dura para el control negativo, así como para la preparación de las diluciones de la muestra y la preparación del control positivo con el tóxico de referencia Cu (II).<sup>3</sup>



## **Ensayo**

Cuando se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en tubos de ensayo de 10 cm de longitud x 1.5 cm de ancho; en el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos. Es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente.<sup>3</sup>

En la prueba se utilizan cinco concentraciones de la muestra, un control negativo, y uno o dos controles positivos, cada una con doce réplicas. El ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las diluciones y controles; este llenado deber hacerse hasta el borde del tubo. A continuación se colocan los bulbos limpios sobre la boca del tubo cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido.<sup>3</sup>

Los tubos se colocan en una gradilla, la cual se localiza sobre una mesa que no presente vibraciones y se mantienen a temperatura ambiente (20 °C) por un periodo de 72 horas.

Debe evitarse la iluminación directa.<sup>3</sup>

Dos veces al día durante el periodo de prueba se debe restablecer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para restablecer este volumen se utiliza la muestra o dilución correspondiente. Se recomienda inclinar el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur.<sup>3</sup>



## Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Allium cepa* L.

---

1. Tipo de ensayo..... Estático
  2. Temperatura.....20 °C; ambiente
  3. Calidad de luz..... Fluorescente, blanco-frio
  4. Iluminación..... Indirecta
  5. Recipientes.....Tubos de ensayo de 10 \* 1.5 cm de diámetro
  6. Número de réplicas.....12
  7. Material biológico.....Bulbos de aproximadamente 1.5 cm de diámetro.
  8. Condición de los bulbos..... Pelar los bulbos y la base, evitar dañar el anillo radicular.
  9. Agua de dilución..... Agua de la llave, canilla o medio de crecimiento
  10. Número de concentraciones.....5
  11. Duración de la prueba.....72 h
  12. Efecto medido..... Inhibición de crecimiento de las raíces
  13. Control negativo.....Agua de la Llave o medio de crecimiento
  14. Control positivo.....Cobre (II) a partir de una solución de CuSO.
- 

## Expresión de resultados

### Medición

Al término del período de exposición se registra la longitud promedio de las raíces, medición que se lleva a cabo con ayuda de una regla común con escala en milímetros. La medición se lleva a cabo colocando la escala en el margen del tubo, se ubica el valor de longitud mínimo y máximo donde incide la mayoría de las raíces y el punto medio se define como el promedio. Se efectúa la estimación en cada tubo y se obtiene el promedio matemático de diez réplicas (los dos valores más extremos se descartan). Para obtener el porcentaje de efecto de inhibición se debe realizar la siguiente operación.<sup>3</sup>



$$\frac{(\text{Longitud del control} - \text{Longitud de la muestra}) \times 100}{\text{Longitud del control}}$$

### 3. Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

#### Principio

Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zoo planctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal.<sup>3</sup>

El género *Daphnia* se ubica dentro de la orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphniapulex* y *Daphniasimilis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros.<sup>3</sup>

En las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna*, neonatos menores de 24 h de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un periodo de 48 h, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida.<sup>3</sup>



## Material biológico

Las hembras partenogénicas de *Daphnia magna* pueden obtenerse directamente de compañías proveedoras de materiales biológicos, quienes certifican la especie.

También pueden ser obtenidas de otras fuentes como laboratorios especializados donde se llevan a cabo pruebas de toxicidad con este cladóceros o por medio de su recolección en campo; en estos casos, la especie deberá ser taxonómicamente identificada.<sup>3</sup>

## Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

Los cultivos de *Daphnia magna* pueden mantenerse en recipientes de uno, dos o tres litros, o cualquier otro sistema que resulte funcional. Con el fin de mantener condiciones óptimas para el crecimiento de los individuos, se recomienda una densidad poblacional no mayor de 12 individuos por litro.<sup>3</sup>

Los organismos se mantienen en agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO<sub>3</sub>/L. El agua se prepara en el laboratorio y puede suplementarse con una solución de vitaminas y selenio cuando se detecten problemas en la reproducción, o se presente una alta mortalidad entre los 14 y 21 días por malformación de las antenas.

Los cultivos se mantienen a una temperatura de  $21 \pm 2$  °C, un fotoperiodo aproximado de 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 lux.<sup>3</sup>

## Agua dura reconstituida

Para su preparación se recomienda colocar en un garrafón: 19 L de agua destilada y adicionar 2,4 g de MgSO<sub>4</sub>, 3,84 g de NaHCO<sub>3</sub> y 0,16 g de KCl. Agitar hasta disolver completamente las sales. Paralelamente, disolver 2,4 g de CaSO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O en 1L de agua destilada. Es necesario tener en cuenta que la disolución de esta sal puede requerir un periodo de tiempo prolongado. Terminada la solubilización de la sal, incorporar la solución de CaSO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O al garrafón, lo cual permitirá obtener 20 litros de agua dura reconstituida.<sup>3</sup>



Suplementos (adicionar sólo en caso de un crecimiento deficiente del cultivo)

Una vez terminada la preparación del agua reconstituida se mide el pH, el cual deberá oscilar entre 7,6 y 8,0. Posteriormente, se airea el líquido de forma permanente hasta el momento de su uso (mínimo 24 h). El aire utilizado debe estar libre de grasas y aceites.

Se recomienda que antes de utilizar el agua se determine: 1) la concentración de oxígeno (la cual debe estar por encima de 6 mg/L), y 2) la dureza (que debe encontrarse dentro del intervalo preestablecido de 160-180 mg CaCO<sub>3</sub>/L). En caso de que alguno de los parámetros de control se encuentre fuera de los intervalos mencionados, el agua deberá desecharse.<sup>3</sup>

Igualmente, con cada lote de agua dura preparada, antes de su utilización, ya sea como medio de cultivo y/o para la dilución de las muestras, se debe realizar un bioensayo que permita comprobar que no se presenta ningún efecto sobre la supervivencia de las *daphnias*. Para esta prueba, se coloca en tres recipientes un volumen de 30 mL de agua y diez neonatos/ recipiente. Al cabo de las 48 h la supervivencia deberá ser mayor del 90%; en caso contrario se debe descartar el agua reconstituida.<sup>3</sup>

### **Procedimiento de la prueba**

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *Daphnia magna* se emplean neonatos (< 24 h nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un periodo de 48 h. Como resultado de dicha exposición es posible determinar la concentración de la muestra o compuesto problema, que produce la muerte al 50% de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL50), con un nivel de confiabilidad del 95 por ciento. También puede determinarse la concentración mínima donde aún se observa efecto de mortalidad así como aquella donde la muestra no produce la muerte de neonatos.<sup>3</sup>

Cuando no hay un conocimiento de la toxicidad de las muestras es recomendable llevar a cabo una prueba preliminar, en la cual se prepara un amplio número de concentraciones sin



réplicas (por ejemplo: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100%). Para la prueba se colocan 30 mL de cada una de las diluciones en los vasos de prueba, se transfieren diez neonatos y a las 24 horas se registra el número de organismos muertos.

Con esta información podrá establecerse el intervalo de concentración en el cual se puede esperar el 0 y el 100% de mortalidad. Este intervalo se utiliza como guía para la preparación de las diluciones en las pruebas definitivas.<sup>3</sup>

Para la preparación de las diluciones de las muestras se utiliza como medio de dilución agua dura reconstituida (180 y 160 mg/L CaCO<sub>3</sub>), sin ningún suplemento.

Preparación de las soluciones de prueba: muestras ambientales (efluentes y aguas superficiales).<sup>3</sup>

### **Expresión de los resultados**

Cálculo de la CL50

Para el cálculo de la CL50 y sus respectivos límites de confianza al 95% se utiliza el método Probit, ya sea manualmente o con ayuda de paquetes estadísticos que tengan este procedimiento.<sup>3</sup>

El método de análisis Probit permite estimar la CE50 o CL50 ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual la concentración perteneciente al Probit 0,5, corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar el efecto estudiado en la mitad de la población.<sup>3</sup>

Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la CE50 o CL50 deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad.<sup>3</sup>



### **Aceptabilidad de los resultados**

- La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10%.
- La concentración final de oxígeno disuelto debe ser mayor de 2 mg/L.
- La CL50 para el tóxico de referencia deberá estar dentro de los límites de confianza preestablecidos en la carta control. En caso de emplear un control positivo de concentración cercana a la CL50, los valores de mortalidad obtenidos deberán encontrarse cercanos al 50%. Se puede considerar aceptable el encontrar mortalidades entre el 33 y 57 por ciento.<sup>3</sup>

### **III. Determinación de Coliformes Totales y Fecales: Número más Probable**

#### **Generalidades microbiológicas**

Los Coliformes son considerados un grupo de microorganismos que se encuentran comúnmente en el suelo, aguas superficiales y las plantas. También están presentes en los intestinos de animales y humanos. Son usadas como indicadores en pruebas de agua porque su presencia señala que organismos pueden estar presentes en el agua. Las bacterias coliformes que la lluvia arrastra por el suelo, usualmente quedan atrapadas en las rocas llega a los sistemas de agua subterránea. Sin embargo los pozos que no están bien construidos, que están rajados o que no se encuentran bien sellados pueden proveer una puerta para que las bacterias coliformes entren al agua subterránea y contaminen el agua. <sup>18</sup>

#### **Caracteres bioquímicos de Coliformes**

El grupo comprende a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas:

1. Ser aerobias o anaerobias facultativas;
2. Ser bacilos Gram negativos;
3. No ser esporógenas;
4. Fermentar la lactosa a 37 °C en 48 horas, produciendo ácido láctico y gas.<sup>19</sup>



### **Bacterias Coliformes (Totales Y Fecales). Escherichia Coli**

El grupo de los Coliformes incluye bacterias en forma de bacilo, Gram negativos, con las siguientes propiedades bioquímicas: oxidasa negativo y capacidad de fermentar lactosa, con producción de gas en 48 horas a una temperatura de 37 °C.

Se considera que todas las bacterias Coliformes, tienen importancia en el H<sub>2</sub>O desde el punto de vista sanitario aunque muchos autores han tratado de diferenciar el tipo fecal y el no fecal.<sup>19</sup>

#### **Escherichia coli:**

Se entiende por Escherichia coli aquella bacteria Coliformes, generalmente indol positiva, citrato negativa, rojo de metilo positiva, que no produce acetilmetilcarbinol y capaz de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas entre 37°C y 44°C en un tiempo máximo de veinticuatro horas.<sup>20</sup>

#### **Coliformes totales.**

Son aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativas, no esporógenas, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas a 37°C en un tiempo máximo de cuarenta y ocho horas. Este grupo comprende los géneros Escherichia, Citrobacter, Klebsiella y Enterobacter, pertenecientes a la familia Enterobacteriáceas.<sup>20</sup>

#### **Coliformes fecales**

Las bacterias coliformes fecales forman parte del total del grupo coliforme. Son definidas como bacilos Gram-negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 44.5 °C +/- 0.2 °C dentro de las 24 +/- 2 horas. La mayor especie en el grupo de coliforme fecal es el *Escherichia Coli*.<sup>19</sup>

La presencia de coliformes en el suministro de agua es un indicio de que el suministro de agua puede estar contaminado con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición.



Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo.<sup>19</sup>

Conviene destacar la importancia que tienen las cifras de *E. Coli* y coliformes, pertenecientes a las enterobacterias que fermentan lactosa con producción de gas y ácido. Para determinar el número de estas bacterias se suele emplear medio selectivo D Endo Agar.<sup>19</sup>

Desde hace mucho tiempo se han utilizado como indicador de contaminación fecal. Su presencia se interpreta como una indicación de que los organismos patógenos pueden estar presentes y su ausencia indica que el agua se halla exenta de organismos productores de enfermedades.<sup>19</sup>

#### **A) –Toma de muestras de aguas para análisis microbiológicos.**

##### **1. Objeto.**

Es obtener una muestra representativa del agua para poder determinar a partir de ella su calidad microbiológica de interés sanitario.

La toma de muestras debe respetar, por consiguiente la composición microbiológica del agua captada.<sup>20</sup>

##### **2. Ámbito de aplicación.**

Estas normas se aplicarán a todos los tipos de aguas, cualquiera que sea su procedencia, ya sean de grifos, pozos, depósitos, lagos, ríos, manantiales, bocas de riego, etc.<sup>20</sup>

##### **3. Tipos de muestras.**

En el caso de análisis bacteriológicos de aguas, la muestra para analizar debe ser siempre simple, sin que se puedan obtener muestras compuestas ni integradas, de modo que la muestra para el laboratorio sea la obtenida en el punto de muestreo.<sup>20</sup>



#### **4. Material.**

Exceptuando el material o aparatos específicos que puedan utilizarse para determinadas tomas especiales, los frascos más adecuados son los de vidrio neutro con tapón esmerilado o roscado, muy limpio y esterilizado en autoclave a 120°C durante treinta minutos o en horno de Pasteur a 180°C durante dos horas.<sup>20</sup>

También pueden utilizarse frascos de material macromolecular con tapón roscado, esterilizados mediante etileno óxido, radiaciones gamma u otros sistemas adecuados.

El tapón y el cuello del frasco se protegerán con una cubierta de papel, papel de aluminio u otro similar.<sup>20</sup>

Los recipientes empleados han de tener una capacidad mínima de 250 ml, si bien es útil disponer de otros de mayor capacidad cuando la técnica analítica así lo exija.<sup>20</sup>

#### **5. Técnica de muestreo.**

Las operaciones que comporta la toma de muestras varían según la naturaleza del agua a analizar y el punto de muestreo elegido.<sup>20</sup>

##### **5.1. Grifos.**

Una vez retirados filtros u otros accesorios se procederá a una cuidadosa limpieza con agua o alcohol.

Con el grifo cerrado se flameará el extremo del mismo, mediante la llama obtenida con un poco de algodón empapado de alcohol y sostenido con unas pinzas o bien una lámpara de soldar.

Se abrirá el grifo para que el agua fluya abundantemente y se renueve la contenida en la tubería que la alimenta. Se destapará el frasco esterilizado sin tocar la boca del mismo ni el interior del tapón.

Todos los movimientos deberán realizarse sin interrupciones, al abrigo de corrientes de aire y con las máximas precauciones de asepsia.<sup>20</sup>



## **5.2. Pozos y depósitos.**

Si se dispone de bomba de captación se opera como se ha indicado en el caso del grifo.

Si no existe sistema de bombeo, no es posible obtener una muestra representativa.

Con esta salvedad se introducirá en la masa de agua el frasco de muestreo o un cubo lo más limpio posible, sostenidos con una cuerda y tomando la muestra tras haber agitado la superficie del agua con el mismo recipiente.

También podrán utilizarse aparatos especiales lastrados que permiten introducir el frasco esterilizado y destaparlo a la profundidad deseada. En estos casos deberán utilizarse frascos con tapón a presión.<sup>20</sup>

## **6. Volumen de la muestra.**

El volumen a tomar debe ser el adecuado para que en una sola muestra se puedan efectuar simultáneamente la totalidad de los análisis bacteriológicos y estará en función de la técnica analítica a utilizar.

Para los análisis que utilicen la técnica del NMP se tomarán, como mínimo, 250 ml y para los que empleen la de membranas filtrantes, como mínimo, 500 ml.<sup>20</sup>

## **7. Cerrado y precintado.**

Las muestras se cerrarán convenientemente y se precintarán, en su caso, de formas que quede garantizada su inviolabilidad.<sup>20</sup>

## **8. Rotulación.**

Antes de la toma de la muestra se marcará el frasco mediante rotulador resistente al agua, con una referencia que permita su identificación. En todo caso la muestra se acompañará de una ficha o etiqueta en la que se consignen los datos necesarios que, como mínimo, serán los siguientes:

### **8.1. Datos del solicitante:**

Nombre de la persona o Entidad y dirección completa.



## 8.2. Datos del agua:

Origen de la muestra (pozo, manantial, grifo, cisterna, río, etcétera). Denominación y/o referencia. Dirección o emplazamientos exactos, término municipal y provincia. Fecha y hora de la captación.

## 8.3. Otros datos<sup>20</sup>

Consignar si el agua es natural o está sometida a algún tratamiento de depuración (cloro, filtración, carbón activo, etc.). Identificación de la persona que ha tomado la muestra.

## 9. Acondicionamiento y conservación<sup>20</sup>.

Una vez tomada la muestra se acondicionará de modo que quede en la oscuridad, debiendo remitirse cuanto antes al laboratorio. Es conveniente iniciar el análisis antes de que transcurran seis horas desde la toma de la muestra.

Sin embargo, podrá demorarse su análisis hasta veinticuatro horas cuando haya sido conservada en refrigeración a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

## 10. Precauciones especiales<sup>20</sup>.

Cuando se estime probable que el agua a analizar contenga trazas de cloro, cloraminas u ozono, será necesario neutralizar su efecto bactericida en el momento del muestreo.

Para ello, antes de la esterilización del frasco, se le añadirá una cantidad suficiente de sodio tiosulfato. Para un volumen de 250 ml son suficientes 0,2 ml de una solución acuosa al 3% de sodio tiosulfato 5-hidrato.

Esta solución puede añadirse sistemáticamente a todos los frascos, ya que en caso de que el agua no contenga cloro, la presencia de tiosulfato a estas concentraciones no posee efectos nocivos sobre el contenido bacteriano del agua.

## 11. Personal.<sup>20</sup>

Las tomas de muestras para análisis bacteriológicos de aguas deberán ser realizadas por personas debidamente adiestradas.



## b) – Preparación de la muestra para el análisis.

### 1. Procedimiento<sup>20</sup>.

- ✘ Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, deberán mantenerse en sitio fresco y oscuro, procediendo a su análisis lo antes posible.
- ✘ Agitar, con objeto de homogeneizar la muestra, un mínimo de 25 veces.
- ✘ Antes de proceder a la obertura de los envases, desinfectar el cuello y tapón. Si el material es de vidrio se efectuará a la llama, en caso de ser el recipiente de otro material, la desinfección se realizará con algodón impregnado en alcohol de 70° o una solución de sal de amonio cuaternaria.
- ✘ Una vez abierto el recipiente, esterilizar la boca o abertura a la llama. En caso de que el envase no tenga boca (tetrabrik, bolsa de material polimérico), flamear previamente las tijeras u otro instrumento que se utilice para abrir el envase.
- ✘ En el caso de que para efectuar los análisis se necesite más de un envase se mezclará el contenido de los envases necesarios en un recipiente de vidrio con tapón de rosca o esmerilado de capacidad suficiente, previamente esterilizado.
- ✘ Agitar nuevamente el recipiente para su homogeneización.

### Técnicas de los tubos múltiples de fermentación (NMP).

El análisis bacteriológico por esta técnica consiste en determinar la densidad del grupo coliforme expresada en términos del NMP por 100ml de muestra. Este NMP debe entenderse como un índice del número de bacterias coliformes que tiene mayor probabilidad sobre cualquier otro número y no es la enumeración real de coliformes presentes.<sup>15</sup>

En la aplicación de esta técnica, se utilizan volúmenes determinados de la muestra y números definidos de proporciones de cada volumen analizado. Se recomienda utilizar por lo menos 5 porciones de 10ml de cada muestra, cuando son aguas tratadas, pero en



definitiva el número de diluciones se selecciona de acuerdo al rango previamente estimado de coliformes.<sup>15</sup>

Dentro de la técnica de los tubos múltiples de fermentación se incluyen 3 pruebas: presuntiva, confirmativa y completa o complementaria.<sup>15</sup>

### **Procedimiento:**

Vamos a seguir el mismo método para la determinación de los dos tipos de Coliformes, lo único que variará será la temperatura de incubación de cada determinación, que para los Coliformes Totales será de 37 °C y para los fecales ha de ser de 44 °C.<sup>19</sup>

### **Prueba presuntiva**

Para el caso de aguas para consumo humano se inocula una serie de 5 tubos de fermentación que contiene 20 ml de caldo lactosado estéril con 10 ml de muestra. Luego se incuban a la temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas y 48 horas, al cabo de estos tiempos se examinan los tubos. La presencia de cualquier cantidad de gas en los tubos de la serie, constituyen una prueba presuntiva positiva; lo contrario es una prueba negativa.<sup>15</sup>

En aguas ligeramente y muy contaminadas, se inoculan series de 5 tubos de fermentación que contengan 10ml de caldo lactosado estéril. Se incuban durante 24 a la temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y se examinan los tubos, y si no se ha producido gas se examina al cabo de 48 horas. La presencia de gas en los tubos de la serie constituye una prueba presuntiva positiva.<sup>15</sup>

### **Prueba confirmativa**

Se emplean tubos de fermentación con BVB (caldo con billis y verde brillante), este medio es selectivo para los miembros del grupo coliforme e inhibidor para la flora restante. Los tubos positivos de la prueba anterior se inoculan e una serie de 5 tubos con el medio de



cultivo antes mencionado, se incuban a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. La presencia de gas en los tubos de fermentación, constituyen una prueba confirmativa positiva.<sup>15</sup>

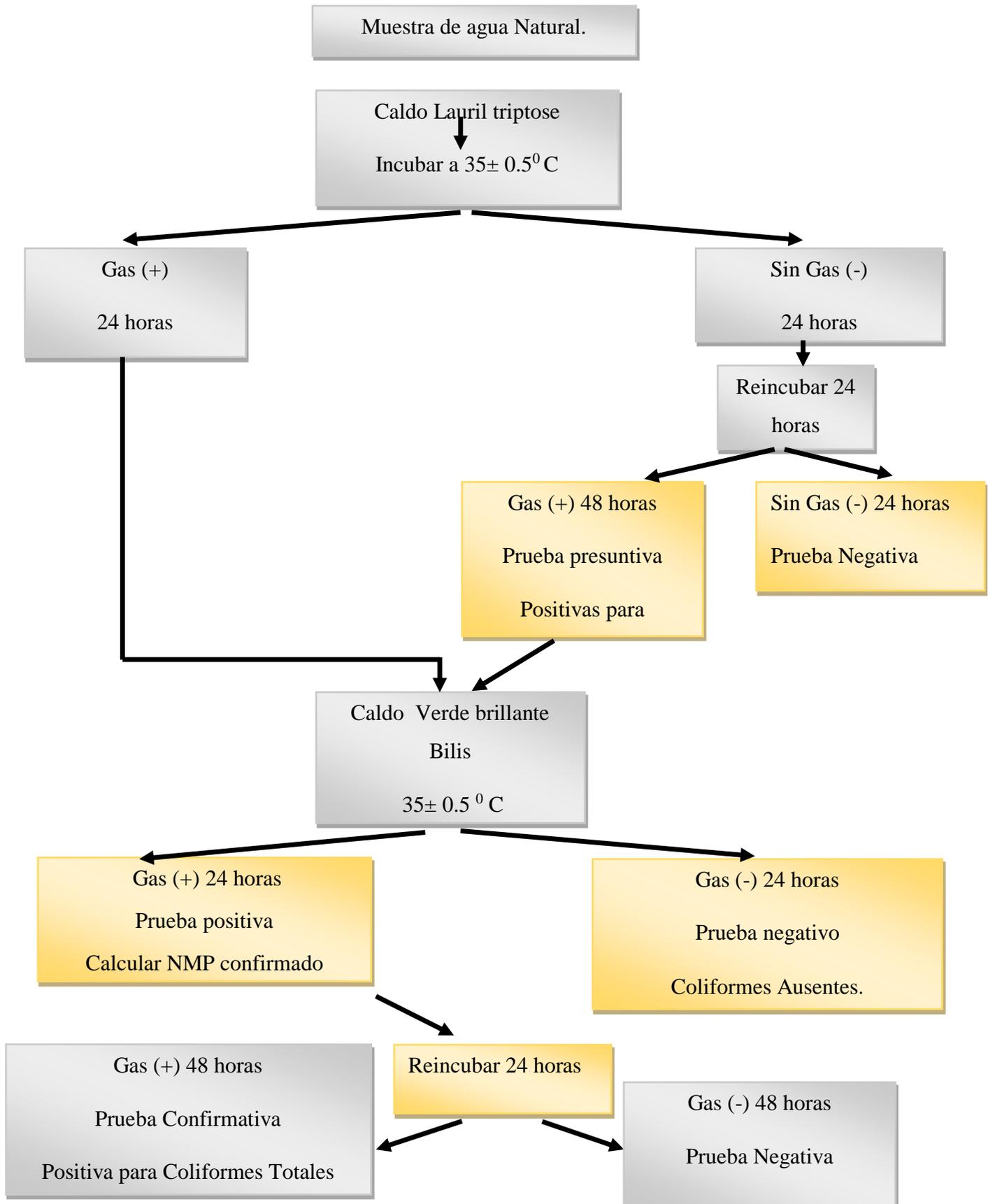
Para separar los coliformes de origen fecal de los no fecales, se procede a la inoculación de los tubos positivos de la prueba confirmativa, en tubos con caldo lactosado y se incuban a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas; de los tubos positivos se inoculan en una serie de 5 tubos con medio EC y se incuban en baño de maría a  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  de 6 a 24 horas. La presencia de gas se considera una reacción positiva que indica presencia de organismos coliformes de origen fecal.<sup>15</sup>

#### METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)<sup>20</sup>

1 ml. 1:10	1 ml. 1:100	1 ml. 1:1000	gérmenes/100
0	0	0	3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	480
3	3	2	1100
3	3	3	2400

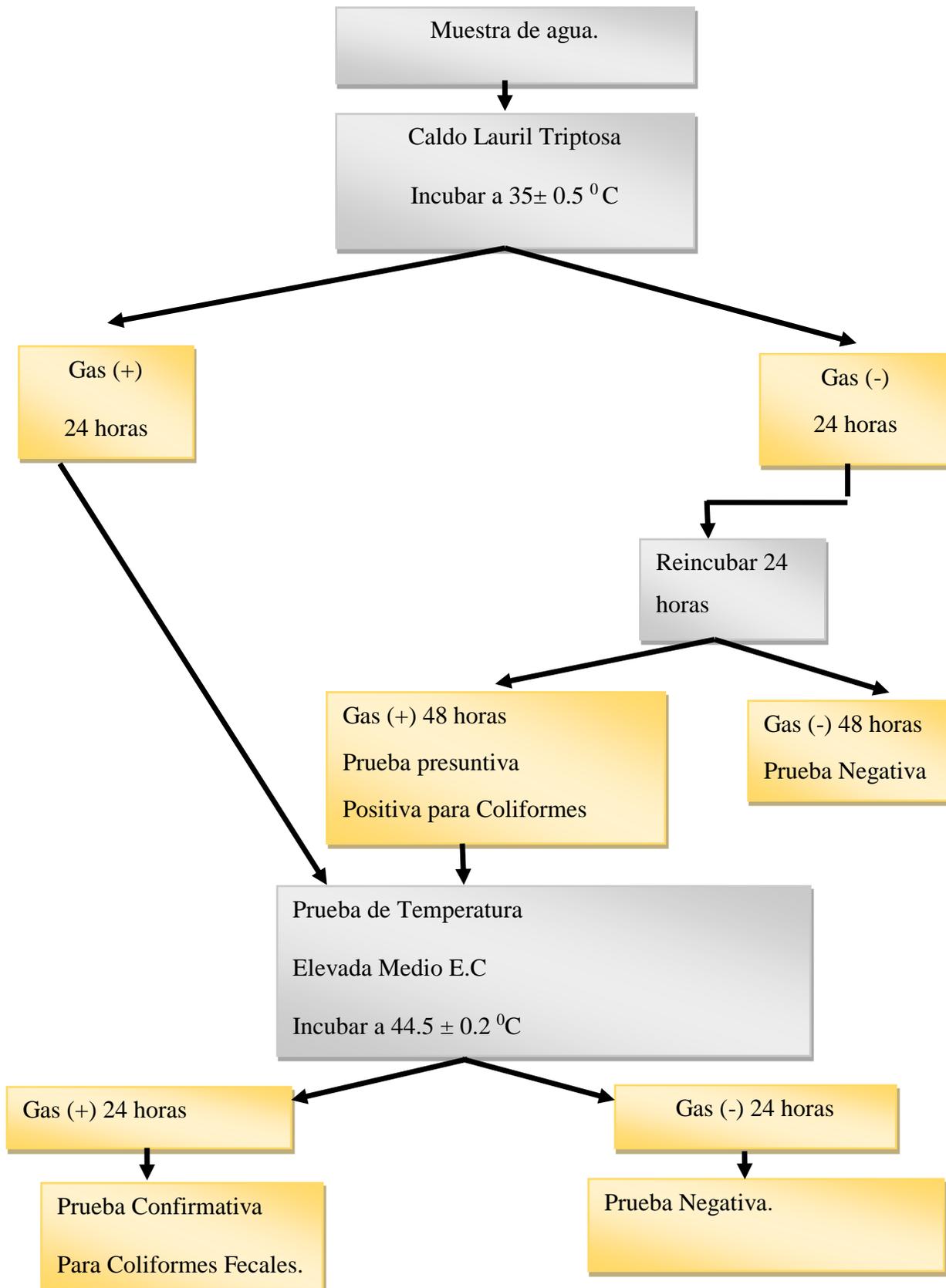


### Diagrama para detectar Coliformes Totales- NMP





### Diagrama para detectar Coliformes Fecales- NMP





## MATERIAL Y MÉTODO

**Tipo de estudio:** El estudio es de tipo experimental.

**Área de Estudio:** Pozos de abastecimiento de agua potables ubicados en el barrio Pedro Joaquín Chamorro y en las Comunidades Ully y Campo 1 del Municipio de Siuna.

**Universo de estudio:** 3 Pozos que abastecen de agua potable al Municipio de Siuna.

**Selección y tamaño de muestra:** 3 pozos de abastecimiento que distribuyen agua potable a todo el Municipio de Siuna y están ubicados en el barrio Pedro Joaquín Chamorro y en las Comunidades Ully y Campo 1 del Municipio de Siuna.

### Criterios de inclusión:

- ✘ Que el agua de los pozos abastecedores sea potable.
- ✘ Que los pozos en estudio pertenezcan al sistema de distribución de agua potable del Municipio de Siuna.
- ✘ Que los pozos abastecedores se encuentren en buenas condiciones.

### Criterios de exclusión:

- ✘ Que el agua de los pozos no sea potable.
- ✘ Que los pozos en estudio no pertenezcan al sistema de distribución de agua potable del Municipio de Siuna.
- ✘ Que los pozos abastecedores no se encuentren en buenas condiciones.

### Variables:

- Δ pH.
- Δ Sólidos Disueltos.
- Δ Bioensayo de toxicidad de *Lactuca sativa L.*
- Δ Determinación de Coliformes Totales y Fecales en agua.



**Operacionalización de las variables:**

Variable	Concepto	Indicador	Escala
<b>pH</b>	Es el valor que determina si una sustancia es ácida, neutra o básica, calculado el número de iones de hidrógeno presentes.	Acido-Base	0-14
<b>Sólidos Totales</b>	Es la suma de todos los sólidos disueltos y suspendidos en el agua.	Presencia o Ausencia de sedimentos.	Ausencia o presencia
<b>Bioensayo de toxicidad de <i>Lactuca sativa</i> L.</b>	Es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento	Inhibición del crecimiento de las semillas.	Cm % de Inhibición
<b>Determinación de Coliformes Totales y Fecales en agua</b>	Método para la detección y enumeración en agua de organismos Coliformes Totales, organismos Coliformes Fecales (termo tolerantes) y <i>Escherichia coli</i> presuntiva, mediante el cultivo de un medio líquido en tubos múltiples y el cálculo de sus números más probables en la muestra.	Presencia o Ausencia de gas.	Germen/100 ml



### Material, Reactivos y Equipos

<i>Material</i>	<i>Equipos</i>	<i>Reactivos</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cajas Petri de 100mm de diámetro.</li> <li>✓ Matraces aforados de 50ml.</li> <li>✓ Pipetas volumétricas de 1,2,5 y 10ml</li> <li>✓ Regla u otro instrumento de medición.</li> <li>✓ Pinzas</li> <li>✓ Toallas de papel.</li> <li>✓ Bolsas Plásticas.</li> <li>✓ Papel de filtro Whatman N° 3</li> <li>✓ Filtro de membrana de 0,2 µm</li> <li>✓ Matraz aforado de 100ml.</li> <li>✓ Beakers de 100 y 500ml</li> <li>✓ Balones de 100, 250 y 1000ml</li> <li>✓ Probeta de 100ml</li> <li>✓ Erlenmeyer 250 ml con sus respectivos tapones de hule</li> <li>✓ Gradilla</li> <li>✓ Tubos de ensayo</li> <li>✓ Embudo de vidrio</li> <li>✓ Espátula</li> <li>✓ Asa</li> <li>✓ Mechero</li> <li>✓ Fósforo</li> <li>✓ Papel Aluminio</li> <li>✓ Campana Durham</li> <li>✓ Botella de vidrio de tapón roscado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cámara oscura de temperatura controlada.</li> <li>✓ Nefelómetro.</li> <li>✓ pH-metro.</li> <li>✓ Campana de extracción de gases.</li> <li>✓ Balanza analítica: Modelo: Sartorius Serie TE214S.</li> <li>✓ Incubadora doble a 36°C Precisión Scientific. Modelo: 6M.</li> <li>✓ Autoclave para Esterilizar los medios de cultivo Pelton Crane cód.: 61139.</li> <li>✓ Autoclave para Descontaminar cód.: 61143.</li> <li>✓ Cocina Corning Hot Plate PC- 100.</li> <li>✓ Baño María CMS 392-159.</li> <li>✓ Agitador Vortex Scientific Industries Modelo K550 G UL Listed.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agua dura reconstituida.</li> <li>✓ Agua destilada en vidrio.</li> <li>✓ Hexametilentetramina</li> <li>✓ Hidracinio Sulfato</li> <li>✓ Potasio di-Hidrógeno Fosfato</li> <li>✓ Potasio Hidrógeno Ftalato</li> <li>✓ di-Sodio tetra-Borato 10-hidrato.</li> <li>✓ di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro.</li> <li>✓ Triclorometano estabilizado con etanol.</li> <li>✓ Agua de pozo</li> <li>✓ Caldo Lactosado</li> <li>✓ Billis Verde Brillante</li> <li>✓ Caldo E. Coli</li> <li>✓ Alcohol.</li> <li>✓ Semillas sin tratar de <i>Lactuca Sativa L</i></li> </ul>



### **1. Recolección de la muestra:**

Se visitó el barrio y las comunidades donde se encuentran los respectivos pozos de abastecimiento de agua potable, se solicitó la autorización para poder tomar las muestras de agua.

Posteriormente procedimos con guantes, nazobuco, gorro y gabacha, para recolectar las muestras y evitar contaminarlas. Las muestras las tomamos a través de las llaves de Salida (grifos) de los pozos en estudios, se tuvo mucho cuidado antes, durante y después de la toma de la muestra, ya que cualquier descuido puede resultar en contaminación de la misma y reflejar resultados falsos. Se desinfectó el borde del grifo con alcohol y se le practicó la técnica de flameo, la cual consistió en flamear el grifo durante un minuto con un mechero de alcohol para evitar cualquier contaminación ajena al agua. Luego se dejó correr el agua por un minuto para tomar de igual manera un litro de agua en un recipiente de vidrio, previamente esterilizado teniendo el mechero cerca para mantener el área aséptica, se tapó y se enumeró respectivamente.

Las muestras se trasladaron en un termo con hielo de esta forma las conservamos frescas y así procedimos a realizar el mismo día el ensayo microbiológico.

### **2. Preparación de la muestra:**

Una vez realizado el ensayo microbiológico las aguas restantes se almacenaron dentro de un refrigerador a una temperatura de 5° C, para su posterior uso.

### **3. Ensayo microbiológico para detectar presencia de coliformes totales y fecales**

#### **Test presuntivo para Coliformes:**

Se Preparó la muestra y diluciones siguientes:

Una vez elaborada la dilución 1:10 en el laboratorio se procedió a realizar las diluciones 1:100 y 1:1000.



Se inoculo 9 tubos de caldo Lactosado (3 diluciones y 3 tubos por dilución).

Se agito suavemente cada tubo para una adecuada disolución con el medio de cultivo.

- ⌚ 3 tubos con 10 ml de caldo lactosado y 10ml de la muestra.
- ⌚ 3 tubos con 5 ml de caldo lactosado y 1ml de la muestra.
- ⌚ 3 tubos con 5 ml de caldo lactosado y 0.1ml de la muestra.

El tiempo entre la preparación de la muestra y su inoculación en un medio no debe ser superior a 15 min.

Se Incubo a 35°C +/- 1°C por 24 horas y se observó la formación de gas; en los tubos donde no se evidencio la formación de gas, se incubaron nuevamente hasta completar 48 h y se observó la formación de gas en los tubos de fermentación.

La presencia de gas o efervescencia significa un test presuntivo positivo para Coliformes y se registra como positivo, cualquiera sea la cantidad de gas producido. Ausencia de gas a las 48h, significa un test presuntivo negativo para Coliformes. Anotamos los resultados.

### **Interpretación:**

- a. Si el total de tubos son negativos: el examen se da por terminado, reportando la ausencia de coliformes totales y fecales en la muestra analizada.
- b. Todos aquellos tubos que den positivos para prueba presuntiva se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la prueba confirmatoria para coliformes totales y fecales.

### **Test confirmativo para Coliformes:**

- ⊖ Los tubos que resultaron positivos a las 24 ó 48h en el test presuntivo se transfirieron al caldo BVB para confirmar Coliformes.



- ⊖ Se mezcló por agitación el tubo del test presuntivo y se transfirió un inóculo con asa de 3mm de diámetro, a tubos de fermentación conteniendo caldo BVB.
- ⊖ Se tuvo la precaución de enfriar el asa para asegurar que se transfiera un inóculo de cultivo viable.
- ⊖ Incubamos los tubos BVB a 37°C x 48h +/- 2h.
- ⊖ Al término del periodo de incubación se observó la formación de gas o efervescencia en los tubos de fermentación de caldo BVB. La presencia de gas en los tubos de fermentación del caldo BVB significa test confirmativo para Coliformes, ausencia de gas constituye un test negativo para Coliformes.
- ⊖ Anotamos los resultados del test confirmativo y leímos en la tabla del NMP.

### **Interpretación:**

- A.** Si se observa turbidez y producción de gas: La prueba se considera POSITIVA, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.
- B.** Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez: Se consideran NEGATIVOS, estableciéndose el Código 0,0, 0 para efecto del cálculo del NMP.

### **Método Caldo EC para Coliformes Fecales y Confirmación para Escherichia coli.**

- ⊖ Todos los tubos que resultaron positivos a las 48h en el test presuntivo se transfirieron al caldo EC para confirmar Coliformes Fecales y consecutivamente E. coli.
- ⊖ Se mezcló por agitación el tubo del test presuntivo y se transfirió un inóculo con un asa de 3mm de diámetro, a tubos de fermentación conteniendo Caldo EC.
- ⊖ Se tuvo la precaución de enfriar el asa para asegurar que se transfirió un inóculo de cultivo viable.
- ⊖ Los tubos con caldo EC se incubaron a 45.5 °C +/- 0.2 °C por 24h +/- 2h, se examinó si hay producción de gas, si la producción de gas fue negativa incubar nuevamente hasta completar las 48h +/- 2h.



- φ El nivel de agua del baño debe sobrepasar el nivel del caldo dentro de los tubos.
- φ Al término del periodo de incubación se observó la formación de gas o efervescencia en los tubos de fermentación de caldo EC.
- φ La presencia de gas o efervescencia en los tubos de fermentación de caldo EC significará un test confirmativo positivo para Coliformes fecales; la no formación de gas significará test negativo para Coliformes fecales. Anotar los resultados del test confirmativo.
- φ Anotar los resultados del test confirmativo.

#### **Confirmativo para E. Coli:**

- ⊗ De cada tubo de caldo E.C. que presentó formación de gas, se transfirió un inoculó a una placa de agar LEAM para obtener colonias aisladas.
- ⊗ Se incubaron las placas invertidas 18h a 24h a 35°C.
- ⊗ Al término del período de incubación observamos las colonias sospechosas con centro oscuro con o sin brillo metálico en el caso de usar agar LEAM.
- ⊗ Anotamos los resultados.

#### **Interpretación**

- a. Si se observa turbidez y producción de gas: La prueba se considera POSITIVA, debiendo anotar el número de tubos positivos y establecer el código para posteriormente hacer el cálculo del NMP.
- b. Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez: Se consideran negativos, estableciéndose el Código 0, 0,0 para efecto de la prueba.

#### **4. Procedimiento Bioensayo de Toxicidad Aguda para la determinación de Sustancias toxicas con *Lactuca Sativa L.***



## Procedimiento para el desarrollo de la prueba:

### Preparación de las diluciones

- Para realizar la curva dosis respuesta preparamos un mínimo de 4 diluciones de la muestra a estudiar para obtener valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%.
- Para nuestras muestras usamos un factor de dilución de 0.4 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones (100, 80, 60 y 40%) para obtener mayor precisión en los resultados.
- Para la preparación de cada dilución utilizamos agua de grifo, realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.
- Se preparó el control positivo, utilizando una solución al 20% de  $ZnSO_4$  (Compuesto tóxico de referencia)

### Desarrollo de la prueba

#### Para llevar a cabo el ensayo se deben realizar los siguientes pasos:

- ♣ Material biológico: se trabajó con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Mantecosa) de tamaño homogéneo, obtenidas en la Cooperativa Agrícola San Miguel de la Ciudad de Jinotega. Las semillas seleccionadas se almacenaron en ambiente seco y a temperatura ambiente. Estas semillas son sin curar y con un poder germinativo mayor del 90%.
- ♣ El bioensayo se realizó en cajas de Petri, en las que se colocó un disco de papel de filtro en la base, humedecido con 3 ml de agua de la muestra correspondiente. Se sembraron 20 semillas de lechuga en cada caja, se cubrieron con una lámina de plástico y luego con la tapa de la caja de Petri. Las cajas fueron ubicadas en un ambiente oscuro a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ C$ . por un periodo de 120 horas. Los tratamientos incluyeron testigos (control negativo con agua destilada) y tuvieron 3 repeticiones.
- ♣ Se marcaron correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- ♣ A las 120 horas, utilizando una regla, se registró el número de semillas germinadas, se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación y el porcentaje de germinación de cada repetición.



- ♣ En cuanto a la germinación se consideraron no tóxicas a las muestras en las cuales germinaron más del 90% respecto del control con agua destilada, tóxicas a las que presentaban valores menores al 75% de germinación respecto del control.

## **5. Determinación de sólidos totales.**

Se filtra una muestra previamente homogeneizada, mediante un filtro estándar de fibra de vidrio (Whatman 934-AH; tamaño de retención de partículas de 1.5  $\mu\text{m}$ ), previamente tarado en seco. El residuo retenido en el mismo se seca a peso constante a 103 - 105° C. El aumento de peso de filtro representara los sólidos totales en suspensión.

### **Procedimiento**

- Se taró individualmente en placas de vidrio los filtros estándar necesarios y se anotó el peso inicial seco, determinado a 103-105°C.
- Se filtró un volumen de 100 ml de cada una de las muestras homogeneizadas a través de un filtro tarado, con una bomba de vacío.
- Se secó en estufa a 103- 105° C.
- Posteriormente se pesaron los papeles filtros correspondientes de cada muestra.

Cálculos:

$$\text{Sólidos Totales (mg/L)} = \frac{[(A-B)*1000]}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

A: peso de residuo seco + filtro (mg)

B: tara del filtro (mg)



## **6. Determinación de pH (Electrometría).**

### **Procedimiento.**

#### **Calibrado del pH-metro.**

En vaso de precipitados, colocar un volumen adecuado de la solución patrón de fosfatos. Introducir en ella los electrodos y agitar durante un minuto, procediendo a la lectura pasados otros dos minutos. El valor del pH obtenido deberá ser el indicado entre 15 y 30°C, corrigiéndose en caso necesario, de acuerdo con las instrucciones particulares del aparato utilizado.

A continuación, y después de convenientemente enjuagados con Agua, sumergir los electrodos en la solución patrón. Si el valor del pH obtenido no corresponde al teórico de la solución, corregirlo como en el caso anterior.

#### **Determinación.**

Calibrado el aparato, medir el pH de las muestras operando igual que para las soluciones patrón. Las muestras deberán estar a una temperatura lo más próxima posible a aquella en que se calibró el pH-metro.

Si en alguna muestra el pH alcanza un valor superior a 8,30 deberá repetirse la determinación, previo calibrado del pH-metro con solución de di- Sodio tetra-Borato 10-hidrato.

#### **Expresión de los resultados**

En unidades de pH con precisión de 0,1 a la temperatura en que se efectuó la medida



## RESULTADOS

### Ensayo microbiológico para determinar coliformes totales y fecales por el método de NMP

Se calculó la densidad microbiana con base en el número más probable conforme al procedimiento señalado, para estimar la población de bacterias Coliformes totales, bacterias Coliformes fecales y Escherichia coli de acuerdo con las diluciones empleadas. Se expresó en NMP/100 ml para agua.

**TABLA N° 1**

#### Prueba presuntiva para Coliformes Totales y Fecales.

Agua de Pozos Abastecedores			
N° de Mx	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
1	Pos.	Pos.	Pos.
2	Pos.	Pos.	Pos.
3	Pos.	Neg.	Neg.

Leyenda: Muestra 1: pozo abastecedor de la comunidad de Ullý. Muestra 2: pozo abastecedor del barrio Pedro Joaquín Chamorro. Muestra 3: pozo abastecedor de la comunidad Campo 1.

**TABLA N° 2**

#### Prueba Confirmativa de Coliformes Totales

Agua de pozos Abastecedores				
N° de Mx	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	NMP/ 100ml
1	3	3	1	480
2	3	3	3	2400
3	2	0	0	9

Leyenda: Muestra 1: pozo abastecedor de la comunidad de Ullý. Muestra 2: pozo abastecedor del barrio Pedro Joaquín Chamorro. Muestra 3: pozo abastecedor de la comunidad Campo 1.



**TABLA N° 3**

**Prueba Confirmativa de Coliformes Fecales**

Agua de Pozos Abastecedores					
N° de Mx	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	NMP/100ml	Confirmación de <i>E. coli</i>
1	1	0	0	4	Pos.
2	0	0	0	3	Neg.
3	0	0	0	3	Neg.

Leyenda: Muestra 1: pozo abastecedor de la comunidad de Ully. Muestra 2: pozo abastecedor del barrio Pedro Joaquín Chamorro. Muestra 3: pozo abastecedor de la comunidad Campo 1.

**TABLA N° 4**

**Bioensayo de Toxicidad Aguda para la Determinación de Sustancias Tóxicas con**

*Lactuca Sativa L.*

**Resultado del porcentaje de Inhibición en la Germinación.**

**Muestra N°1: Pozo abastecedor de la Comunidad de Ully.**

Concentración	Cantidad de Semillas			T	Tg	Ig	G	C
	P1	P2	P3					
40	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
60	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
80	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
100	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
Control	19	20	20	60	59	-	98	-

Leyenda: **T**: Total de semillas expuesta, **Tg**: Total de semillas germinada, **Ig**: % de Inhibición en la germinación, **G**: % de germinación, **C**: clasificación, **P1**: placa 1, **P2**: Placa 2, **P3**: Placa 3



**TABLA N°5**

**Muestra N° 2: Pozo abastecedor del Barrio Pedro Joaquín Chamorro.**

Concentración	Cantidad de Semillas			T	Tg	Ig	G	C
	P1	P2	P3					
40	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
60	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
80	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
100	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
Control	18	19	20	60	57	-	95	-

Leyenda: **T**: Total de semillas expuesta, **Tg**: Total de semillas germinada, **Ig**: % de Inhibición en la germinación, **G**: % de germinación, **C**: clasificación, **P1**: placa 1, **P2**: Placa 2, **P3**: Placa 3.

**TABLA N° 6**

**Muestra N° 3: Pozo abastecedor de la Comunidad Campo 1.**

Concentración	Cantidad de semillas			T	Tg	Ig	G	C
	P1	P2	P3					
40	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
60	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
80	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
100	0	0	0	60	0	100	0	Tóxico
Control	19	17	19	60	55	-	92	-

Leyenda: **T**: Total de semillas expuesta, **Tg**: Total de semillas germinada, **Ig**: % de Inhibición en la germinación, **G**: % de germinación, **C**: clasificación, **P1**: placa 1, **P2**: Placa 2, **P3**: Placa 3



**TABLA N° 7**

**Determinación de pH y Solidos Totales**

N° de Mx	pH	S.T
Mx 1	7.29	2000 mg/L
Mx 2	7.29	6000 mg/L
Mx 3	7.35	1000 mg/L

Leyenda: ST: solidos totales. Muestra 1: pozo abastecedor de la comunidad de Ully. Muestra 2: pozo abastecedor del barrio Pedro Joaquín Chamorro. Muestra 3: pozo abastecedor de la comunidad Campo 1.



## **ANALISIS DE RESULTADOS**

El agua es un recurso natural, escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano, económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Es por eso que es necesario realizar un seguimiento adecuado de su calidad. Con este estudio se determinó la calidad del agua de consumo en 3 pozos abastecedores de agua del Municipio de Siuna.

### **Ensayo Microbiológico para detectar la presencia de Coliformes**

La determinación de microorganismos Coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En base a esto obtuvimos los siguientes resultados:

Al realizar el ensayo microbiológico del NMP para las muestras recolectadas se encontró en el análisis presuntivo la presencia de Coliformes totales y fecales dando así las pautas para realizar las pruebas confirmativas de este ensayo. (Ver tabla N° 1)

En la Tabla N° 2, se reflejan los resultados de la Prueba Confirmativa de Coliformes Totales, encontrando la presencia de este tipo de microorganismo en todas las muestras de agua de pozo analizadas, con valores que van desde 9– 2400 NMP/100 ml, Por lo tanto las muestras que presentan este tipo de microorganismo en valores mayores a  $\leq 1,8$  NMP/100 ml, no son adecuadas para consumo según el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano (DS N° 031-2010-SA).



De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba presuntiva, se realizó la Prueba Confirmativa para Coliformes fecales, dando como resultados la presencia de estos en la muestra de agua de pozo # 1 (Ver Tabla N°3). Estos resultados se corroboran con el crecimiento de E. coli en placas con agar EMB de las muestras en la que el crecimiento de Coliformes fecales fue positivo, por lo tanto la muestra de agua de pozo # 1 no cumple con los requisitos de calidad microbiológica, según el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano (DS N° 031-2010-SA), en los que se establece, que en aguas de pozo debe haber ausencia total de Coliformes fecales. Por lo tanto esta muestra no es adecuada desde el punto de vista microbiológico para consumo humano.

#### **Bioensayo de Toxicidad Aguda de *Lactuca Sativa L.***

Se realizó ensayo estático de toxicidad aguda (120 h de exposición) en el que se evaluaron los efectos fitotóxicos del agua de los pozos abastecedores del Municipio de Siuna, en el proceso de la germinación de la semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento.

Se probó un control positivo (sulfato de Zinc) y control negativo (agua corriente a un pH 6,9) y 4 concentraciones: 40, 60, 80, y 100%, usando como solvente agua corriente. Como puntos finales para la evaluación del ensayo se observó inhibición de la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo con respecto al grupo control.

Los resultados de esta prueba demuestran que en las concentraciones que se usaron de las 3 muestras en estudio, presentaron inhibición de la germinación de las semillas en un 100%, (Ver tabla 4, 5 y 6). El periodo de ensayo se extendió, de 120 horas a 156 horas sin renovar la exposición de la muestra; para corroborar, que finalizada la exposición de las semillas no hubo germinación y este resultado se considera que las aguas de pozo tienen un efecto fitotóxicos.



Este bioensayo es el más utilizado en la actualidad y ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales, cultivos puros, evaluación del efecto fitotóxicos de pesticidas, control de efluentes, evaluación de lodos, lixiviado, calidad de aguas, toxicidad de sustancias químicas en suelos contaminados y otros. Se trata de un método de bajo costo y de corta duración, que no requiere equipos sofisticados para realizar mediciones.

### **Determinación de PH y Solidos Totales.**

La calidad del agua está dada por las condiciones físicas y químicas de la misma, es decir: su calidad física, determinada por presencia de arcilla y materia orgánica; y la calidad química del agua, regulada por el pH.

En la determinación del pH de las 3 muestras obtenidas de este estudio, realizadas con el pH-metro dieron como resultado que las muestras N° 1 y 2, su valor de pH fue de 7.29 cada una y la muestra N° 3, su pH fue de 7.35, dichos valores se encuentra dentro de los parámetros que dicta la OMS para Aguas Potables de Consumo que va de 6.5-8.5.

Al consumir agua con valores de pH por arriba o por debajo de sus límites normales puede afectar la estructura y actividad catalítica de macromoléculas biológicas como las enzimas. El pH de la orina y de la sangre sirve como criterio para diagnosticar enfermedades. El pH del plasma sanguíneo en individuos enfermos de diabetes aguda es menor que el valor normal de 7.4; esta condición se llama acidosis. Cuando los mecanismos reguladores de pH fallan, o están sobrecargados, este valor puede caer a 6.8 o menos, lo que daña irreversiblemente a las células y produce la muerte. En otras enfermedades el pH de la sangre es mayor que el normal. Si la elevación es grande (mayor de 7.8) el resultado es también la muerte.



En la determinación de S.T de las 3 muestras en estudio, la tabla N° 7, refleja los datos obtenidos para cada muestra dándonos que las muestras 1 y 2 están fuera de los límites permitidos para sólidos totales el cual es 1000 mg/L y la muestra N°3 se encuentra en el límite que dicta la OMS para aguas de pozo de consumo humano.

Los sólidos totales (ST) pueden ser tanto las sustancias orgánicas como inorgánicas, microorganismos y partículas más grandes como la arena y arcilla. Estas partículas pueden estar disueltas, formando sistemas coloidales o en partículas relativamente grande. La determinación de los sólidos es importante para evaluar la calidad del agua y para controlar los procesos de tratamiento en aguas potables y residuales.



## CONCLUSIONES

Después de los resultados obtenidos y analizados del presente estudio concluimos que:

Se realizó el ensayo microbiológico por el método del número más probable y se determinó la presencia de Coliformes totales y Coliformes fecales de las muestras de los pozos abastecedores cuyos valores exceden el límite máximo permisible según lo declarado por el reglamento de la calidad del agua para consumo humano (DS N° 031-2010-SA) lo que las hace no adecuadas para consumo humano.

En relación al bioensayo de toxicidad aguda de *Lactuca sativa* L las muestras en estudio provocaron un 100 % en la inhibición del crecimiento normal de las semillas de *Lactuca sativa* L lo cual significa que no hubo germinación, por lo tanto existe presencia de sustancias tóxicas en las muestras de aguas potable de los pozos abastecedores del municipio de Siuna. Lo que las hace no adecuada para consumo humano.

En el caso del pH las 3 muestras en estudio se encuentran en el rango adecuado que es de 6.5 a 8.5 según la OMS para aguas potables las cuales las hace adecuada para consumo humano.

En relación a los sólidos totales existe presencia en las tres muestra de estudio dándonos en las dos primeras muestras valores superiores a 1000 mg/L y una tercera muestra que se encuentra en este valor concluyendo que las dos primeras muestra no son adecuadas para consumo y que la tercera está en el límite que dicta la OMS para aguas potables.

Por lo tanto concluimos que de acuerdo a los resultados de los ensayos realizados, el agua de los pozos abastecedores del Municipio de Siuna no es apta para consumo humano



## **RECOMENDACIONES**

Después de obtener los resultados y las conclusiones a que se llegó luego del presente estudio sugerimos las siguientes recomendaciones:

1. Seguir realizando estudios innovadores y ensayos de este tipo para identificar metales y otros tipos de sustancias tóxicas en agua de consumo humano.
2. Se recomienda implementar otros métodos analíticos en los cuales se lleve a cabo la identificación cuantitativa de metales.
3. Se propone a las autoridades encargadas de desarrollar el plan académico incorporar en el área de microbiología y toxicología ensayos donde se pretenda determinar parámetros para la calidad de agua de consumo humano.
4. Se recomienda a EMAPSA ( Empresa Municipal de Agua Potable del Municipio de Siuna) darle un tratamiento adecuado de estas aguas ya que estas no presentan condiciones óptimas para su consumo, de lo contrario pueden seguir produciendo severos daños en la salud de los habitantes del Municipio de Siuna.
5. Recomendamos que se diseñe un plan municipal por parte de la Alcaldía y MINSA de Siuna que brinde mantenimiento preventivo y correctivo del sistema de captación y distribución de agua potable que incluya procesos de tratamiento.
6. Como profesionales de la salud proponemos brindar charlas a los habitantes del Municipio de Siuna sobre cómo tratar el agua para su debido consumo como clorarla, hervirla o filtrarla.



## Bibliografía

1. Gramajo Cifuentes BM. (2004) (Tesis). Determinación de la calidad del agua para consumo humano y uso industrial, obtenida de pozos mecánicos en la zona 11, Mixco, Guatemala. Disponible en Internet: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0907\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0907_Q.pdf) Revisado el 05/08/2013.
2. Lenntech. (2006). Agua residual & purificación del aire. Holding B.V. Rotterdamseweg 402 M 2629 HH Delft, Holanda) Potablewater 2006. España. <http://potablewater.iespana.es>. Calidad del agua. Disponible en internet: [http://www.infoiarna.org.gt/guateagua/subtemas/3/3\\_Calidad\\_del\\_agua.pdf](http://www.infoiarna.org.gt/guateagua/subtemas/3/3_Calidad_del_agua.pdf) Revisado el 29/07/2013
3. Castillo Morales, G. (2004) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones México: IMTA, 2004. Canadá: IDRC, 2004. 189 pp. 22.5 x 15.5 cm ISBN 968-5536-33-3 Toxicología 2. Calidad del agua 3. Bioensayos. Disponible en Internet: <http://idlbnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/26391/106/120928.pdf>. Revisado el 10/09/2013
4. Morales O .K. (2007) Estado Actual del Saneamiento en la RAAN.La Red de Agua y Saneamiento de Nicaragua (RASNIC) en coordinación con UNICEF, COSUDE, PAS del Banco Mundial, SNV, OPS/OMS y Fundación SODIS han conformado el Grupo Impulsor en Saneamiento.MINSA. Disponible en internet: <http://siteresources.worldbank.org/NICARAGUAINSPANISHEXTN/Resources/455347-1203435712756/EstudioaguasaneamientoRAAN.pdf> Revisado 23/08/2013
5. Pérez Moreno, F. Prieto García, F, Rojas Hernández, A. et. Al. (2003). Caracterización química de aguas subterráneas en pozos y un distribuidor de agua de Zimapán, Estado de Hidalgo, México. Hidrobiológica 2003, 13 (2): 95-102. Disponible en internet:



[http://investigacion.izt.uam.mx/rehb/publicaciones/13-2PDF/095-102\\_perez.pdf](http://investigacion.izt.uam.mx/rehb/publicaciones/13-2PDF/095-102_perez.pdf).

Revisado el 23/08/2013.

6. UNAN – León. (2006) Informe del diagnóstico preliminar de la calidad del agua de consumo en las comunidades del sector rural noreste del Municipio de León. Laboratorio de microbiología del agua, departamento de biología, Facultad de Ciencia y Tecnología, UNAN – León. Disponible en Internet: <http://www.cisas.org.ni/files/Informe%20Final%20ECODES-UNAN%20Agua%20Sector%20Rural%20NE%20Leon.pdf>. Revisado el 08/09/2013.
7. Hill M. (2006). Calidad del agua de los pozos en san miguel de allende Fase I: Resultados y Conclusiones. Ecosystem Sciences Foundation, SAPASMA, Dirección de medio ambiente y Ecología. Disponible en internet. [www.ecosystemsciences.com/.../Drinking%20Water%20Quality%20in%20...](http://www.ecosystemsciences.com/.../Drinking%20Water%20Quality%20in%20...) Revisado el 23/08/2013
8. Maldonado C.G, Romero P.M. (2009). Nitratos y nitritos en fuentes subterráneas de abasto de aguade Villa Clara (Cuba) 2008-2009. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta 1158 e/Llinás y Clavel. Ciudad de La Habana, Cuba. Disponible en internet: [http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc511253b64637e\\_Hig.Sanid.Ambient.11.674-700\(2011\).pdf](http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc511253b64637e_Hig.Sanid.Ambient.11.674-700(2011).pdf). Revisado el 29/08/2013
9. Carrasco López J., Chávez I (2013) Determinación de la Calidad del Agua Mediante Indicadores Biológicos Y Físicoquímicos en la Comunidad El Paragua. Malpaisillo, Marzo-Julio 2013. Monografía para optar al título de Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Facultad de Ciencias Químicas. Revisado el 09/09/2013
10. Camacho R. (2001) Ficha municipal de Siuna. Fuente: INEC, OIM y COSUDE. Características socio-demográficas de la población rural de Nicaragua. 82 páginas. 1999:66-68) Disponible en internet: [www.inifom.gob.ni/municipios/documentos/.../siuna.pdf](http://www.inifom.gob.ni/municipios/documentos/.../siuna.pdf) Revisado el 30/07/2013.



11. Damià Barceló L y López de Alda. M.J (2003) Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona) Disponible en internet: [www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf](http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf) Revisado el 30/08/2013
12. Flores Calvo (2007) contaminación del agua. Disponible en internet: [www.ugr.es/.../pdf.../tema4%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.p](http://www.ugr.es/.../pdf.../tema4%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.p) Revisado el 30/08/2013.
13. Limas Amorin C. (2009). Tratamiento del Agua. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CENTRO DEL PERÚ Facultad de Ingeniería en Industrias agua. Disponible en internet: <http://es.slideshare.net/Nardis2112/trabajo-final-14302606> Revisado el 23/08/2013
14. Salas Salmerón F. K. (2007) Selección in vitro de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación. Universidad Autónoma Metropolitana, México DF. Disponible en internet: [148.206.53.231/UAMI14183.PDF](http://148.206.53.231/UAMI14183.PDF) Revisado el 12/09/2013.
15. Guevara V.A. (1996).Control de calidad del agua Métodos de análisis para evaluación de la calidad del agua. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencia del Ambiente División de salud y Ambiente Organización Panamericana de la salud. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina regional de la Organización Mundial de la Salud. Lima. Disponible en internet [www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf) Revisado el 23/08/2013
16. González M. M. (2008). Medidas del pH. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco. CURSO DE BIOMOLÉCULAS. Disponible en internet <http://www.ehu.es/biomoleculas/ph/medida.htm>. Revisado el 26/08/2013
17. Romero P. M y Mendoza C.A (2008) Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Secretaria de medio



- ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de Ecología. Disponible en internet:  
<http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/download/573.pdf> Revisado el 04/09/2013.
18. Hoja informativa sobre las bacterias coliformes en los pozos de agua privada. (2009).  
Protéjase de las Bacterias Coliformes en el agua de su pozo. División de salud pública  
de carolina del norte. Disponible en internet:  
[www.epi.publichealth.nc.gov/oe/.../Las\\_Bacterias\\_Coliformes\\_WellWaterFactSt](http://www.epi.publichealth.nc.gov/oe/.../Las_Bacterias_Coliformes_WellWaterFactSt)  
Revisado el 05/09/2013
19. CEPIS. (1983). Guía para la evaluación de laboratorios bacteriológicos de análisis de  
agua. Coliformes. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Coliforme>. Revisado el  
02/07 2013
20. Castro J.M. (2010). Análisis Microbiológico del agua. Disponible en  
<http://www.slideshare.net/caballeroalderon/analisis-microbiologico-aguas> . Revisado  
el 28/07/ 2013.
21. Orlando E. (2007). Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo  
humano en Lima Metropolitana Marchand Pajares. Disponible en internet:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/basic/marchand\\_p\\_e/mate\\_met.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/basic/marchand_p_e/mate_met.htm)  
Revisado el 07/09/2013



# ANEXOS



**PROCEDIMIENTOS:**

**Figura # 1: ENSAYO MICROBIOLÓGICO PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES**

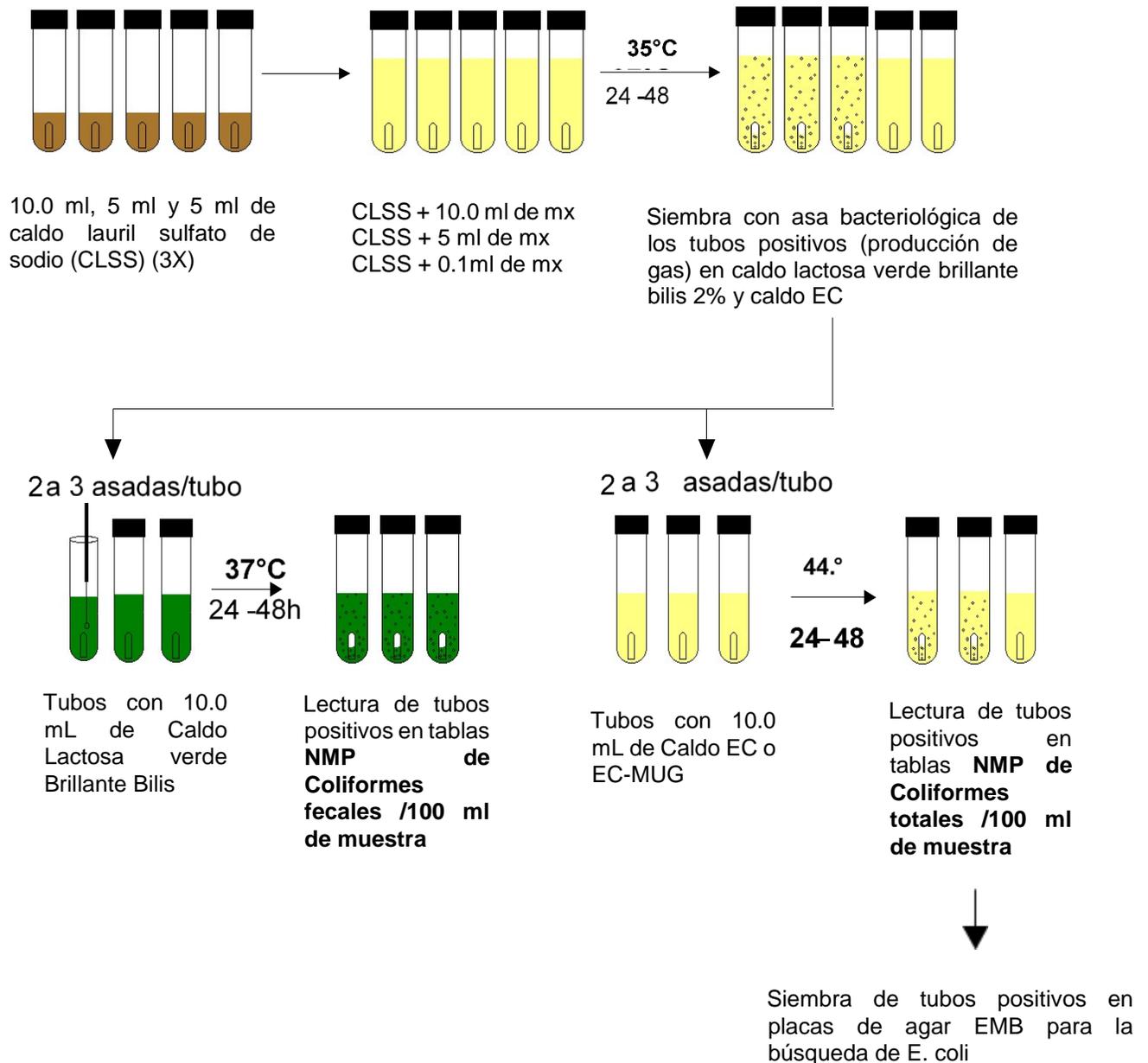




Figura # 2: Esquema gráfico de los pasos a seguir en la prueba con *Lactuca sativa* L.

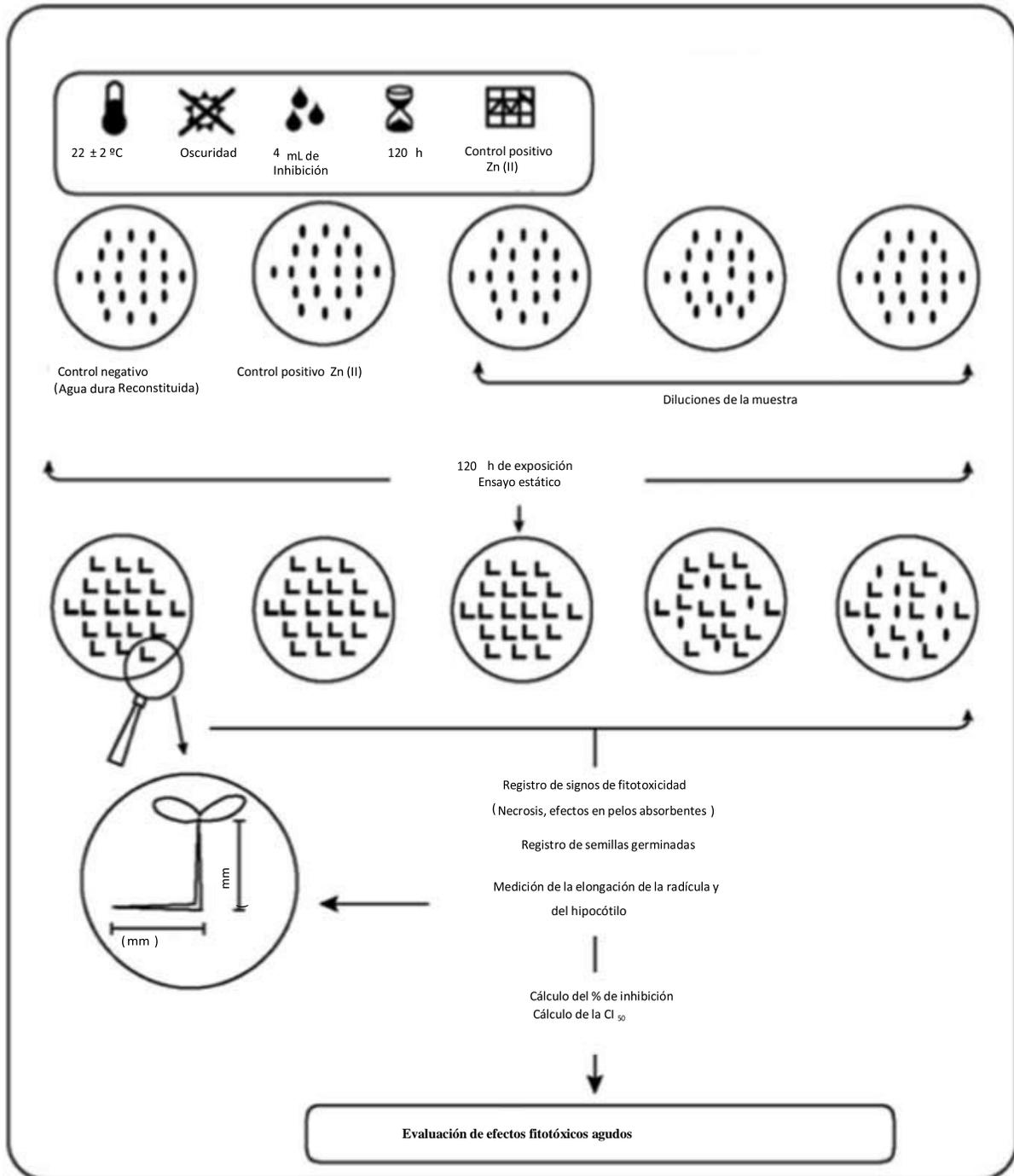




Figura # 3: Esquema de plántula de *Lactuca sativa* al finalizar el período de exposición

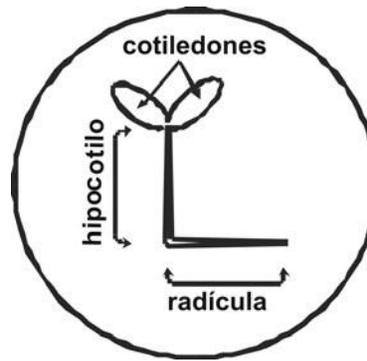
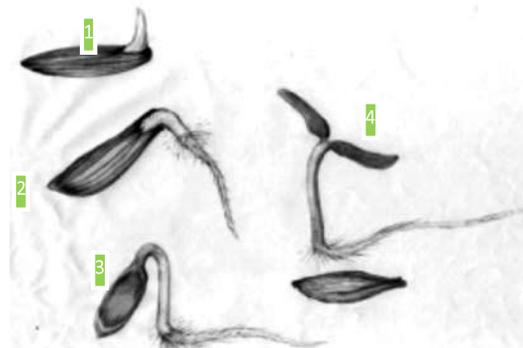


Figura # 4: Estadios por los que atraviesa la semilla *Lactuca sativa* durante el ensayo de germinación y elongación





### LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

origen	Parámetros	Unidades de medida	Valor recomendable	Valor admisible
Agua no tratada (pozo)	Coliformes totales	NMP/100 ml	Neg.	$\leq 1$ .
	Coliformes fecales	NMP/100ml	Neg.	Neg.

### LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE PARÁMETROS FISICO-QUIMICOS

Sustancia o características	Concentración Máxima Permisible
<b>Solidos Totales</b>	1,000 mg/L
<b>PH</b>	6.5-8.5



## **ABREVIATURAS**

- **CV:** Coeficiente de Variación.
- **BVB:** Caldo bilis verde brillante.
- **Caldo EC:** Caldo E. Coli.
- **CAPRE:** Comité Coordinador Regional de Instituciones de Agua Potable y Saneamiento de Centroamérica, Panamá y República Dominicana. Norma Regional de Calidad del Agua.
- **EPA:** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por su nombre oficial, en inglés, United States Environmental Protection Agency).
- **ESF:** Ecosystem Sciences Foundation. (siglas en inglés).
- **EDA:** Enfermedades Diarreicas agudas.
- **INEC:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.
- **INHEM:** Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.
- **KM:** Kilometro
- **SAPASMA:** Sistema de Agua Potable y Alcantarillado de San Miguel Allende.
- **TS:** Solidos Totales
- **MINSA:** Ministerio de Salud.
- **Mg/L:** Miligramos por Litro.
- **NMP:** Numero más probable.
- **NTU:** Unidades Nefelométricas de Turbidez.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **PPM:** Partes por Millón
- **R.A.A.N:** Región Autónoma Atlántico Norte.



## GLOSARIO

- ↪ **Acueducto:** Es un sistema o conjunto de sistemas de irrigación que permite transportar agua en forma de flujo continuo desde un lugar en el que está accesible en la naturaleza hasta un punto de consumo distante.
  
- ↪ **Cladóceros:** Se dice de los crustáceos de pequeño tamaño, casi todos vivientes en las aguas dulces, partenogenéticos, provistos de un caparazón bivalvo que deja libre la cabeza y el extremo del abdomen, con las antenas del segundo par ramificadas y grandes
  
- ↪ **Cólera:** Es una enfermedad infecto contagiosa intestinal aguda, provocada por los serotipos O1 y O139 de la bacteria *Vibrio cholerae*, que produce una diarrea secretoria caracterizada por deposiciones semejantes al agua de arroz, con un marcado olor a pescado, una elevada cantidad de sodio, bicarbonato y potasio, y una escasa cantidad de proteínas.
  
- ↪ **D Endo Agar:** Es un medio ligeramente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de la familia Enterobacteriaceae y diversos otros bacilos Gram negativos.
  
- ↪ **Desertización:** Es el proceso evolutivo natural de una región hacia unas condiciones morfológicas, climáticas y ambientales conocidas como desierto.
  
- ↪ **Efluentes:** son aguas servidas de origen doméstico, municipal o industrial descargadas de manera puntual sobre cuerpos receptores.
  
- ↪ **Elongación:** Es el incremento de la longitud en la distancia calibrada (medida después de la ruptura) dividido por la longitud original de la distancia calibrada. Una elongación mayor indica una mayor ductilidad.



- ↪ **Esporógenas:** son células especializadas, no reproductivas, producidas por unas pocas bacterias de la división Firmicute. Su función primaria es asegurar la supervivencia en tiempos de tensión ambiental.
  
- ↪ **Fitoplancton:** conjunto de los organismos acuáticos autótrofos del plancton, que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua.
  
- ↪ **Fitotóxicos:** sustancia que causa un efecto adverso sobre las plantas ya sea mata o inhibe el crecimiento de las misma.
  
- ↪ **Hipocotilo:** Parte del eje caular que, en la semilla, se encuentra debajo de la inserción de los cotiledones Se opone a epicótilo.
  
- ↪ **Hormesis:** Fenómeno de relación entre la dosis y la respuesta, caracterizada por estimulación a bajas dosis e inhibición con altas dosis, ha sido frecuentemente observada en estudios adecuadamente diseñados, y es ampliamente generalizable como independiente de los agentes fisicoquímicos, el modelo biológico y el objetivo de evaluación.
  
- ↪ **Hortícola:** Dicho de una planta o de su origen, que se cultiva o que proviene del cultivo en un huerto o en un jardín.
  
- ↪ **Lactuca Sativa L:** Planta herbácea perteneciente a la familia asteraceae conocida comúnmente como Lechuga. Planta con raíz pivotante y ramificada de unos 25 cm. Está siendo utilizada como organismo de prueba en ensayos de toxicidad aguda.
  
- ↪ **Método Probit:** Es una probabilidad obtenida añadiéndole 5 a la desviación normal de una distribución normal estandarizada de resultados de un estudio dosis-respuesta; al sumarle un valor de 5 se elimina la complicación de manejar valores negativos.



- ↪ **Organismos Patógenos:** Organismos, incluidos virus, bacterias o quistes, capaces de causar una enfermedad (tifus, cólera, disentería) en un receptor (por ejemplo una persona).
  
- ↪ **Protozoos:** Son organismos microscópicos, unicelulares eucariotas; heterótrofos, fagótrofos, depredadores o detritívoros, a veces mixótrofos (parcialmente autótrofos); que viven en ambientes húmedos o directamente en medios acuáticos, ya sean aguas saladas o aguas dulces.
  
- ↪ **Radícula:** Es la primera de las partes de la semilla que crece durante la germinación.
  
- ↪ **Semillas Fotoblásticas Negativas:** Es la Respuesta de las semillas a la luz. Las semillas son fotoblásticas negativas cuando su germinación se inhibe con la luz. Existen muchas semillas que son insensibles a la luz y se denominan indiferentes.
  
- ↪ **Sistemas Coloidales:** Son sistemas formados por partículas de tamaños entre 1 nanómetro y 1 micrómetro. Normalmente se encuentran formando una disolución en un medio con partículas de tamaño más pequeño.

## IMÁGENES DE LA ENSAYOS REALIZADOS

**Ensayo microbiológico para detectar coliformes totales y fecales por el método NMP.**



Figura # 5: Preparación de los caldos para coliformes fecales (Solución amarilla-caldo E.coli) y para coliformes totales (solución verde-caldo BVB)

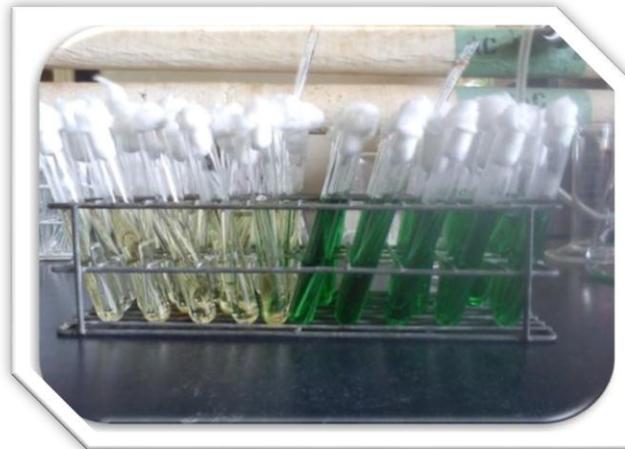


Figura # 6: Llenado de tubos para la prueba confirmativa para coliformes fecales (solución amarilla-caldo E.coli) y para coliformes totales (solución verde-caldo BVB)

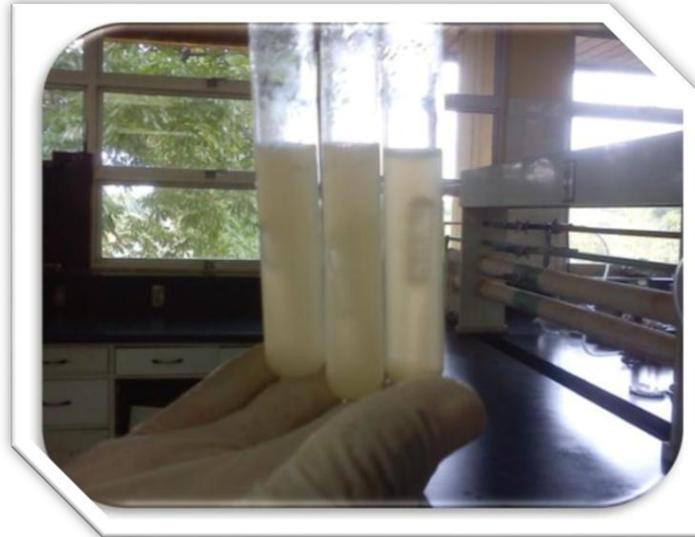


Figura # 7: Prueba confirmativa para coliformes fecales con presencia de gas y turbidez dentro de la campana Durham



Figura # 8: Prueba confirmativa para coliformes totales con presencia de gas y turbidez dentro de la campana Durham



Figura # 9: Siembra de E. Coli de muestra de en medio selectivo Agar EMB.



Figura # 10: Terminación del ensayo microbiológico de coliformes por el método NMP



**Bioensayo de toxicidad aguda de la *Lactuca Sativa L.* para determinar sustancias tóxicas.**



Figura # 11: Diluciones preparadas de cada muestra de estudio con sus respectivos controles.



Figura # 12: Montaje del Bioensayo de *Lactuca Sativa L.*



Figura # 13: Proceso de empaque y almacenamiento de las placas Petri durante 120 horas



Figura # 14: Proceso de evaluación del crecimiento de las semillas en las placas Petri

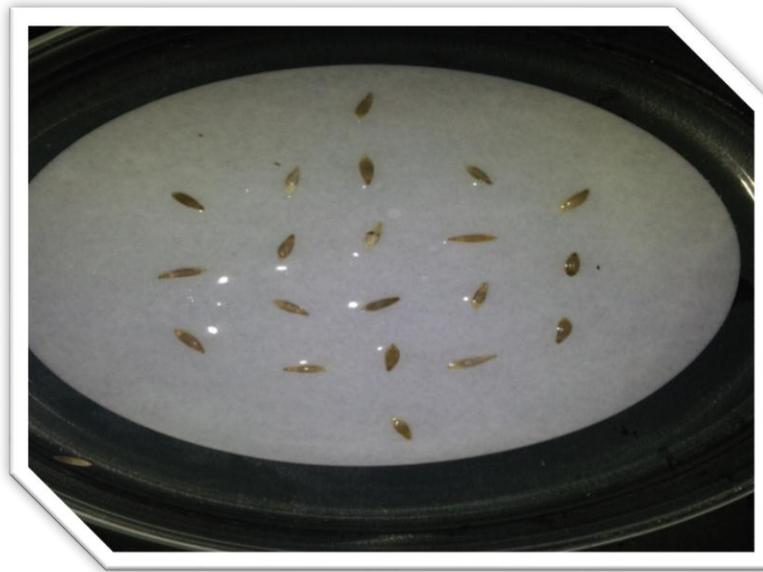


Figura # 15: Resultado final de la inhibición en la germinación de las semillas



Figura # 16: Resultado final del control positivo de las semillas.



**Método para Determinar Sólidos Totales.**

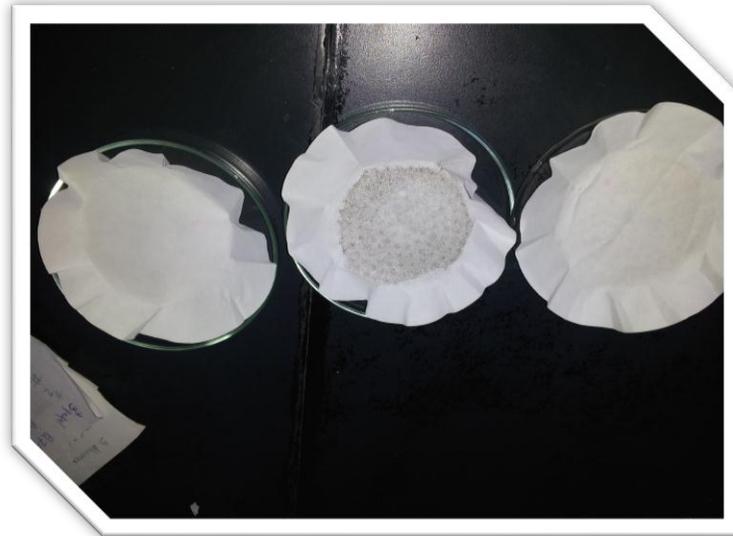


Figura # 17: Resultados obtenidos de los sólidos suspendidos en las muestras después de la filtración



Figura # 18: Resultados obtenidos de los sólidos suspendidos de la muestra después del secado