

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS**



**Facultad de
Ciencias**
Universidad Católica de la Santísima Concepción

**Análisis de la calidad del sedimento de Laguna Trupán
Comuna de Tucapel, Región del Bío-Bío.**

Por

MARÍA JOSÉ GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

**Memoria entregada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima
Concepción para optar al título profesional de Químico Ambiental.**

Profesor Guía: Paulina Alejandra Medina Castillo.

**Concepción
2018**

Agradecimientos

Dedico y agradezco esta tesis a mis papas Marioly y Juan que sin su apoyo incondicional y sacrificios no estaría hoy aquí y no sería quien soy ahora, también a mis tatas (Juanita y Hernán) que han sido un pilar e influencia fundamental en mi vida, a mi hermano (Juan Ignacio) que sin su apoyo incondicional tampoco estaría aquí y sería quien soy, a kuki y mis tres ángeles que me cuidan.

Agradezco a mi profesora Paulina Medina por guiarme, apoyarme y dedicarme su tiempo no solo para el desarrollo de mi tesis, sino que también para desarrollarme como una excelente profesional.

Agradezco a mis amigas Leslie, Graciela y Roció, amistades de la vida y amistades que me dio la universidad, gracias por acompañarme en esta travesía, comprenderme y apoyarme.

Por último, gracias al universo que por algo nos envía las cosas.

ÍNDICE GENERAL

	Paginas
INDICE DE TABLAS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
1. RESUMEN.....	VIII
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVO.....	17
4.1 Objetivos específicos.....	17
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	18
5.1 Toma de muestra.....	18
5.2 Determinación de pH.....	19
5.3 Determinación de materia orgánica.....	19
5.4 Preparación de Elutriado.....	20
5.5 Determinación de Fósforo total.....	20
5.6 Determinación de Nitrógeno tota.....	20
5.7 Ensayo de toxicidad con <i>Daphnia magna</i> con elutriado de sedimento.....	21
5.8 Ensayo de toxicidad con <i>P.subcapitata</i> con elutriado de sedimento.....	21
5.9 Determinación del antibiótico Oxitetraciclina en sedimentos de la Laguna Trupán.....	22
5.9.1 Extracción del antibiótico Oxitetraciclina.....	22
5.9.2 Ensayos de toxicidad del antibiótico Oxitetraciclina.....	23
5.9.2. a Ensayo de toxicidad aguda con <i>L.sativa</i>	23

5.9.2. b Ensayo de toxicidad aguda con <i>P.subcapitata</i>	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6.1 Resultados de pH en muestra de sedimento de la Laguna Trupán.....	24
6.2 Porcentaje de Materia Orgánica en las muestras de sedimento.....	26
6.3 Determinación de micronutrientes.....	28
6.4 Ecotoxicidad sobre <i>D.magna</i> en muestras de sedimento.....	32
6.5 Ecotoxicidad sobre <i>P.subcapitata</i> en muestras de sedimento de Laguna Trupán.....	34
6.6 Determinación del antibiótico Oxitetraciclina en sedimentos de la Laguna Trupán.....	35
6.7 Ecotoxicidad sobre <i>L.Sativa</i> Ensayos de toxicidad con muestras de Oxitetraciclina.....	36
6.8 Ecotoxicidad sobre <i>P.subcapitata</i> a concentraciones crecientes de Oxitetraciclina.....	38
7. CONCLUSIONES.....	40
8. ANEXO.....	41
9. REFERENCIAS.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución y puntos de muestreo de las estaciones en la Laguna Trupán.....	18
Tabla 2.Límites de Clases Norma Secundaria de Calidad Ambiental de criterios de calidad de suelos y de aguas o efluentes tratados para uso en riego.....	26
Tabla 3. Relación Redfiel, laguna Trupán.....	31
Tabla 4.Tabla comparación Fósforo y Nitrógeno total laguna Trupán versus Decreto 9 “Norma secundaria calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas.....	32
Tabla 5.Resultados comparativos de extracción y recuperación de las estaciones.....	36
Tabla 6.Resultados prueba estadística ANOVA a ensayos de toxicidad con D.magna.....	41
Tabla 7. Resultados prueba estadística ANOVA a ensayos de toxicidad con P.subcapita.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participación porcentual de antimicrobianos utilizados en la fase de cultivo de agua dulce durante el año 2015, según diagnóstico.....	13
Figura 2. Participación porcentual de antimicrobianos utilizados en la fase de cultivo de agua dulce durante el año 2015 para el tratamiento de Renibacteriosis...	13
Figura 3. Estructura química de la Oxitretraciclina.....	14
Figura 4. Estaciones de muestreo en la Laguna Trupán.....	19
Figura 5. pH en estaciones de la Laguna Trupán.....	24
Figura 6. % Materia orgánica en estaciones de la Laguna Trupán.....	27
Figura 7. Determinación de Fósforo total en estaciones de sedimento de la Laguna Trupán.....	28
Figura 8. Determinación de Fósforo total en estaciones de sedimento de la Laguna Trupán.....	29
Figura 9. Porcentaje de mortalidad en neonatos de <i>D. Magna</i> en las muestras de sedimento de Laguna Trupán.....	33
Figura 10. Crecimiento de la biomasa de <i>P.subcapitata</i> respecto a las estaciones evaluadas a tiempo de 0 y a 96 horas.....	34
Figura 11. Porcentaje de germinación de la <i>L.sativa</i>	37
Figura 12. Densidad celular de la <i>P.subcapitata</i> respecto a las estaciones de sedimento evaluadas a tiempo de 0 y a 72 horas.....	38
Figura 13. Curva de calibrado Oxitettraciclina.....	42
Figura 14. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 1 (réplica A).....	43
Figura 15. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 1 (réplica B).....	43
Figura 16. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 1 (réplica C).....	44
Figura 17. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 1 (réplica D).....	44
Figura 18. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 2 (réplica A).....	45
Figura 19. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 2 (réplica B).....	45
Figura 20. Espectro extracción Oxitettraciclina Estación 2 (réplica C).....	46

Figura 21.Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 2(réplica D).....	46
Figura 22.Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica A).....	47
Figura 23.Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica B).....	47
Figura 24.Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica C).....	48
Figura 25.Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica D).....	48
Figura 26.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1(réplica A).....	49
Figura 27.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1(réplica B).....	49
Figura 28.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1(réplica C).....	50
Figura 29.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1(réplica D).....	50
Figura 30.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2(réplica A).....	51
Figura 31.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2(réplica B).....	51
Figura 32.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2(réplica C).....	52
Figura 33.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2(réplica D).....	52
Figura 34.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3(réplica A).....	53
Figura 35.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3(réplica B).....	53
Figura 36.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3(réplica C).....	54
Figura 37.Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3(réplica D).....	54
Figura 38.Análisis de varianza.....	55
Figura 39.Análisis de varianza absorción <i>P.subcapitata</i>	55

1. RESUMEN

En este trabajo se evaluó la calidad y la toxicidad de los sedimentos de la Laguna de Trupán, comuna de Tucapel, región del Biobío, Chile, en función de los análisis del contenido de materia orgánica, Fósforo total, Nitrógeno total y la determinación del antibiótico, Oxitetraciclina, además de evaluar la toxicidad con organismos bioindicadores como *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*.

El pH en las estaciones de la laguna se determinó en un rango de 5-6, el contenido de materia orgánica promedio va desde $8,1 \pm 0,1$ % a $9,8 \pm 0,1$ % en el sedimento en la zona centro de la Laguna Tucapel, entre los micronutrientes (Fósforo y Nitrógeno total) el Nitrógeno se encuentra en mayor cantidad desde 4,0 a $17,5 \text{ mgL}^{-1}$ y el Fósforo es el micronutriente limitante desde $0,109$ - $0,185 \text{ mgL}^{-1}$. Los ensayos de toxicidad indicaron que los sedimentos de la laguna no presentan ningún efecto tóxico sobre los organismos bioindicadores *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Lactuca sativa*. No se encontró presencia de concentraciones de Oxitetraciclina en los sedimentos de la Laguna Trupán, sin embargo al evaluar el efecto mediante pruebas de toxicidad con los bioindicadores a concentraciones crecientes de Oxitetraciclina, se observó que sí es un agente tóxico para los organismos.

2. INTRODUCCIÓN

Los sedimentos proporcionan una indicación temporal integrada de las condiciones del medio acuático ya que son considerados un sumidero de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, que ingresan y/o se generan en la columna de agua (Caccia et al., 2003) y pueden alcanzar niveles de contaminación (Adams et al., 1992; Burton & Scott, 1992).

Según Izquierdo *et al.*, (1997) los sedimentos son considerados el último reservorio de una gran cantidad de sustancias y elementos producidos en forma natural o por actividad antropogénica. Constituyen una matriz ambiental (Elderfield, 1978) en que en forma natural su composición depende de la constitución mineralógica de las rocas madres, de la producción primaria, de los procesos adjetivos y sedimentarios del lugar (Libes, 1992).

Las dos fuentes primarias de sedimento lacustre son el material transportado al lago desde el área de drenaje del mismo y los sedimentos producidos dentro del propio lago a partir de diversos procesos físico-químicos y biológicos (Arche, 1970).

Cuando los contaminantes ingresan al cuerpo de agua, los compuestos se particionan entre la fase acuosa y material en suspensión, siendo estas formadoras de sedimentos a los largo del tiempo (Walker, et al., 2006).

Los contaminantes asociados a los sedimentos pueden ser re suspendidos de forma natural (procesos físicos y biológicos) o por la actividad humana (Burton, 2002). La alteración de esta matriz se produce por la entrada de componentes de origen antrópico, que pueden llevar a cambios importantes en las conductas de los organismos que viven asociados a estos sustratos, su viabilidad e incluso la desfaunación en casos extremos (Rudolph et al., 2005).

Según lo indicado en la Revista Aqua (2013) la piscicultura ubicada en Polcura es la tercera más antigua de Chile, el comienzo de sus actividades fue en 1953 a cargo del Instituto de Fomento Pesquero, a fines del año 1986 fue comprada por Camanchaca debido a su ubicación estratégica, se encuentra ubicada en la comuna de Tucapel, sector de Antuco, región del Biobío.

El ingreso de la materia orgánica, producto de la alimentación de los salmones específicamente mediante los desechos, indica que la entrega de alimento impacta en dos formas al medio, mediante el alimento no consumido por los peces y en las heces producidas por los peces, esto se ve reafirmado con Rehbein (2011).

La materia orgánica que ingresa de la alimentación, el total del alimento suministrado para la producción de salmones un 25% de los nutrientes es asimilada por éstos, mientras que un 75% a 80% queda en el ambiente de una forma u otra. Una parte importante de estos desechos va al fondo y otro porcentaje queda en la columna de agua (Buschmann, 2001).

Los ríos, lagos o embalses sufren eutrofización cuando sus aguas se enriquecen con nutrientes, siendo los fosfatos y nitratos los que más influyen en este proceso. En algunos ecosistemas el factor limitante es el fosfato, como sucede en la mayoría de los lagos de agua dulce (Rivas *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista de la dinámica lacustre, es posible determinar la distribución de materiales en razón a su tamaño y su apertura al viento, siendo un determinante para su rápida dispersión; sin embargo, esto no implica una distribución total del material pues ya se ha comprobado que para los nutrientes Nitrógeno y Fósforo existe una tendencia a su acumulación en el sedimento.

El Fósforo posee un papel importante en el metabolismo biológico y en los cuerpos lacustres, generalmente actúa como limitante de la productividad biológica. El intercambio de fósforo entre los sedimentos lacustres y el agua es un factor determinante en la situación trófica de lagos y embalses. Su importancia se basa en

un aparente movimiento neto del Fósforo hacia el agua, debido a que los sedimentos actúan como un depósito y en condiciones particulares de anoxia y cambios de potencial redox son liberados, contribuyendo así a una importante fuente interna. La concentración de Fósforo que poseen los sedimentos, contribuyen como importante fuente interna para la eutrofización (Ruiz *et al.*, 2005).

Según Carmargo y Alonso (2007) el Nitrógeno presente en el agua puede llegar a generar acidificación de ríos y lagos con baja o reducida alcalinidad; eutrofización de las aguas y proliferación de algas tóxicas; toxicidad directa de los compuestos nitrogenados para los animales acuáticos.

Los ríos, lagos o embalses sufren eutrofización cuando sus aguas se enriquecen con nutrientes, siendo los fosfatos y nitratos los que más influyen en este proceso. En algunos ecosistemas el factor limitante es el fosfato, como sucede en la mayoría de los lagos de agua dulce (Rivas *et al.*, 2009).

El concepto de nutriente limitante está basado en el crecimiento de plantas acuáticas y la relación molar N/P. El valor de esta relación la determina el nutriente limitante en el cuerpo de agua. Así el nutriente que controla la máxima cantidad de biomasa es aquel que se consume primero o que alcanza un mínimo antes que los demás nutrientes en la estequiometría de la reacción. Como regla general se considera que cuando la relación molar N/P es >16 , cabe esperarse que el P sea el factor limitante. Cuando $N/P = 16$ ninguno de los nutrientes es limitante; es decir, ambos elementos constituyen la proporción atómica en el fitoplancton, y cuando $N/P < 16$, el nutriente limitante debería ser el Nitrógeno; es decir, que el Nitrógeno es menos abundante que el Fósforo con respecto a la demanda metabólica del fitoplancton (Redfield, 1958).

Otro tipo de contaminantes que ingresan a los cuerpos de agua debido al cultivo de salmones son los antibióticos. Sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético que destruye o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Estos pueden ser sintetizados, creándose una gran variedad derivados con distintos

métodos de acción, especificidad y toxicidad. En animales, estos son utilizados para el tratamiento o prevención de enfermedades, así como también para promover el crecimiento. Por otra parte Chile es uno de los mayores actores en acuicultura en el mundo y se utilizan varios antibióticos, esto está ligado a la necesidad de prevenir (uso profiláctico) y controlar la incidencia de patógenos que afectan los sistemas de cultivo (Barattini, 2012).

Desde el año 1909 ya existen registros del uso de formalina para el control de infecciones por *Costia nuxatrix* (pequeño parasito cosmopolita de forma piriforme). El Cobre y el verde de malaquita entraron en los años 1920 y 1930 como desinfectantes, así como también lo fueron compuestos de amonio cuaternario. Asimismo a finales de 1930, se inicia la aplicación de Sulfamerazina para el tratamiento de enfermedades bacterianas (Alderman y Michel, 1992).

Según Midtvedt y Lingaas (1992), también existen casos en que los antimicrobianos y antibióticos son usados en salmones sanos, porque favorece a las bacterias, ya que al aumentar su exposición a tales drogas, permiten una mayor posibilidad de selección de mutantes resistentes espontáneos favoreciendo su supervivencia frente a la presión selectiva de los antimicrobianos y antibióticos.

Los antibióticos autorizados según Sernapesca para su uso en el país son el Ácido Oxolínico, Amoxicilina, Eritromicina, Flumequina, Florfenicol y Oxitetraciclina. De éstos, los más utilizados son el Florfenicol y la Oxitetraciclina (Barattini, 2012). Estos son utilizadas en las etapas tempranas del crecimiento de los salmónidos, donde generar un crecimiento más sano de la población en los estanques de cultivos, siendo la Oxitetraciclina la más utilizada en estudios de investigaciones de antibióticos en sedimentos (Cook *et al.*, 2014).

La Subdirección de Acuicultura, del Departamento de Salud Animal, en relación al uso de antimicrobianos en centros de cultivo de agua dulce, la principal enfermedad

que justificó la utilización de antimicrobianos fue la Flavobacteriosis (68%), seguida por la Renibacteriosis (26%) (figura 1)

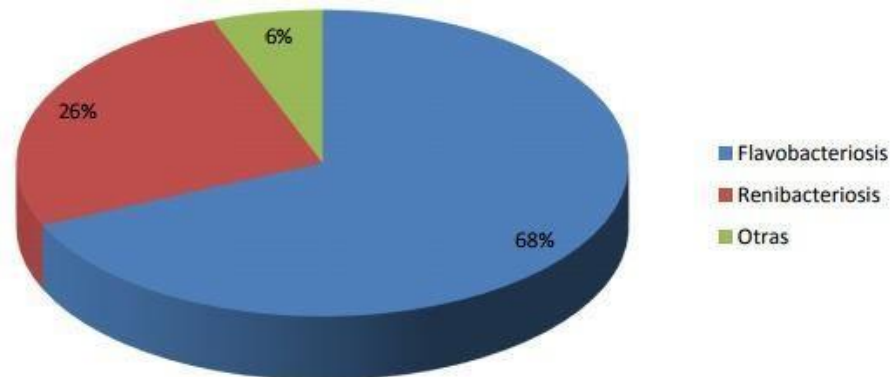


Figura 1. Participación porcentual de antimicrobianos utilizados en la fase de cultivo de agua dulce durante el año 2015, según diagnóstico.

Fuente: Informe sobre uso de antimicrobianos en la salicultura nacional 2015, SERNAPESCA.

Entre los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la Flavobacteriosis, predominó el uso de la Oxitetraciclina (81%) seguido por Florfenicol (19%); mientras que, en el caso de los antimicrobianos aplicados para el control de la Renibacteriosis predomina el uso de la Oxitetraciclina (77%) seguida de la Eritromicina (21%) y Florfenicol (2%) (figura 2).

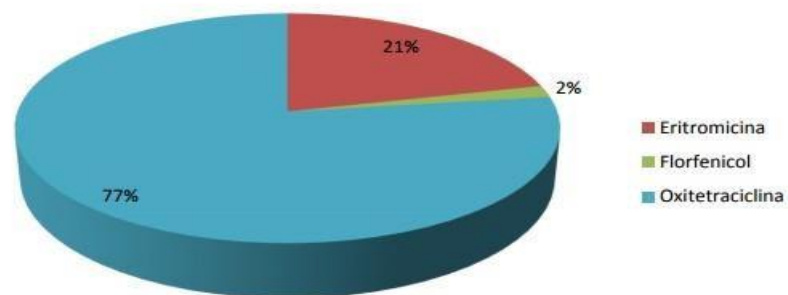


Figura 2. Participación porcentual de antimicrobianos utilizados en la fase de cultivo de agua dulce durante el año 2015 para el tratamiento de Renibacteriosis.

Fuente: Informe sobre uso de antimicrobianos en la salicultura nacional 2015, SERNAPESCA.

La Oxitretetraciclina (OTC) pertenece al grupo de las tetraciclinas es moderadamente lipófila, pero lo suficiente como para atravesar fácilmente las diferentes barreras celulares, distribuyéndose en todo el organismo (figura 3). Es uno de los grupos de antibióticos que se utilizan para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos intracelulares como *Rickettsias*, debido a su amplio espectro de acción. También pueden utilizarse en otro tipo de infecciones bacterianas como flavobacteriosis.

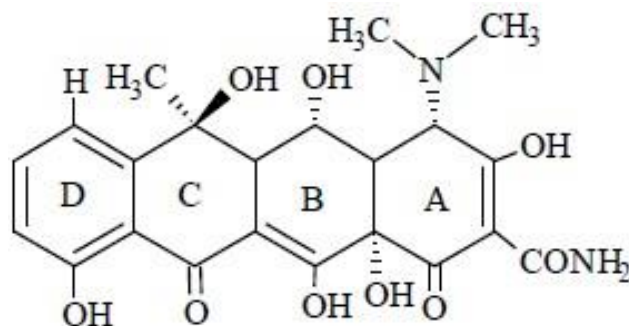


Figura 3. Estructura química de la Oxitretetraciclina
Fuente: Prescott y Baggot (1991)

La principal vía de aplicación de antibióticos es a través del alimento y la absorción del fármaco por parte del pez, varía en gran medida según el tipo de antibiótico administrado. Debido a la disminución del apetito que experimentan los peces con enfermedades bacterianas y a la baja satisfactoriedad del alimento suplementado con drogas (Hustvedt *et al.*, 1991), aproximadamente el 20-30% del antibacteriano administrado es ingerido por los peces, mientras que el 70-80% restante se distribuye en el medio ambiente (Lunestad y Samuelsen, 1992).

Los antibióticos son excretados por el pez y en el alimento medicado no consumido, son incorporados al agua y/o al fondo del estanque de cultivo. En los procesos de limpieza, parte de estos antibióticos podrían quedar en los lodos, con una actividad antimicrobiana que es necesario evaluar.

Según Pier Barattini (2012) en el documento Antibióticos en Acuicultura, los antibióticos como los fenicoles tienen un porcentaje de absorción mayor al 90%, siendo una cantidad muy baja la que es excretada a través de las heces. Otros, sin embargo, tienen porcentajes de absorción muy bajos en el intestino del pez, aumentando su presencia en el medio acuático, como es el caso de la Oxitetraciclina. Estos valores van a depender de la biodisponibilidad de los antibióticos en el pez, la que puede verse influenciada por el medio donde se encuentre.

El análisis químico de antibióticos desde diferentes matrices es complejo debido a la necesidad de realizar una extracción previa. Los antibióticos consisten normalmente de un centro apolar y uno o más grupos funcionales, los que se disocian o protonan dependiendo del pH del medio. Agentes extractantes apolares o muy polares pueden llevar a una extracción incompleta, por lo que en general se ocupan buffers levemente ácidos en combinación a solventes orgánicos.

La evaluación del estado de alteración de los sedimentos por la acumulación de compuestos químicos, asociados a material particulado proveniente a la actividad antropogénica, es un factor de contaminación constante. Por otra parte, la diversidad de compuestos químicos que se acumulan en los sedimentos, que reaccionan dando origen a otros diferentes y la sinergia producida por los efectos tóxicos de ellos hacia los organismos, son un proceso complejo y difícil de analizar (Ahumada, 2006).

Para evaluar la peligrosidad de sedimentos (categorización), se pueden utilizar índices, mediante los cuales se logran unificar datos de bioensayos de toxicidad junto a información fisicoquímica en un único valor (Peluso *et al.*, 2012).

Para poder evaluar la toxicidad de los sedimentos se utilizaron organismos bioindicadores como *Daphnia magna*, *Selenastrum capricornutum* y *Lactuca sativa*. La toxicidad medida a través de los ensayos de toxicidad con organismos está referida a los efectos causados por compuestos en la fase soluble o solubilizados,

de tal modo que en el caso de matrices sólidas es necesario llevar a esta fase los materiales contaminantes contenidos en los sólidos que se desean analizar (por ejemplo sedimentos, suelos y productos industriales), aplicando un procedimiento controlado que permita en el análisis de su toxicidad.

Los resultados de toxicidad que surjan de esta clase de manejo de muestra ya sea por medio de elutriado, de extractos orgánicos o ambos, pueden ser aplicables para comparaciones de dosis–efectos, cuando se comparan con el contenido de contaminantes, así mismo es de utilidad para zonificar los gradientes de afectación en un sitio o, en su defecto, para el seguimiento del comportamiento en el tiempo de un material que se sospecha tóxico (Ramírez y Mendoza, 2008).

3. HIPÓTESIS

El ingreso en la Laguna Trupán de materia orgánica, Fósforo, Nitrógeno y antibiótico, generan un impacto en la calidad del sedimento y en su toxicidad.

4. OBJETIVOS

Evaluar la calidad de los sedimentos de Laguna Trupán a través del contenido de materia orgánica, Fósforo, Nitrógeno total, y del antibiótico y su toxicidad mediante organismos bioindicadores.

4.1 Objetivos específicos:

- Evaluar la calidad de los sedimentos de la Laguna Trupán a partir del porcentaje de materia orgánica, Nitrógeno y Fósforo total.
- Evaluar toxicidad de los sedimentos a partir de los organismos bioindicadores *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Lactuca sativa*.
- Implementar la metodología para la determinación del antibiótico Oxitetraciclina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Evaluar la toxicidad del antibiótico Oxitetraciclina mediante los organismos bioindicadores *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Lactuca sativa*.

5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 Toma de muestra

La Laguna Trupan tiene una profundidad promedio de 6 metros y unos 600 metros de largo y 300 de ancho, recibe agua del canal Zañartu y luego sigue su curso hasta el río Huepil (actualización plan de desarrollo comunal de Tucapel (2010-2014)).

El 15 de octubre del año 2015 se realizó el muestreo en la Laguna Trupán ubicada en la Comuna de Tucapel, donde se procedió a tomar muestras de sedimento utilizando una draga Van Veen, se recolectó aproximadamente 250 g de los primeros 5 cm de sedimentos. Cada muestra fue obtenida en triplicado y colocadas en bolsas plásticas y congelados a -18°C . Las muestras fueron descongeladas posteriormente en el laboratorio y fraccionadas al azar para realizar los ensayos de toxicidad y la determinación de los micronutrientes.

En la tabla 1 se muestran las coordenadas de ubicación para cada estación de muestreo ubicadas en la Laguna Trupán, comuna de Tucapel.

Tabla 1. Ubicación y puntos de muestreo de las estaciones en la Laguna Trupán.

Estación	Profundidad (metros)	Latitud	Longitud
E1	8,9	37°28'49'75	71°81'48'05
E3	5,3	37°28'37'48	71°81'54'72
E2	2,7	37°28'29'46	71°89'66'84



Figura 4. Laguna Trupán, sus tributarios y estaciones de muestreo
Fuente: Google imagen, digital globe (2015).

5.2 Determinación de pH.

Para la determinación del pH se utilizó el método potenciométrico en suspensión del sedimento con agua destilada en relación de 1:10, la cual se procedió a mezclar mediante un agitador magnético por 15 minutos; luego se dejó en reposo por 15 minutos y finalmente se registró los valores del pH. La calibración del medidor de pH se llevó a cabo mediante soluciones tampón HACH® de pH= 4, 00 (+/- 0,02) y pH= 7,00 (+/- 0,02), a 20 °C (Willard et al., 1974).

5.3 Determinación de materia orgánica

El contenido de materia orgánica total fue determinado gravimétricamente por la técnica de pérdida de peso por ignición. Los sedimentos obtenidos por cada estación se masaron (100 gr aprox.) durante dos días se secaron en la estufa a 60 °C. Los crisoles durante 2 hrs se dejaron en la mufla y se procedió a masar 3 gr de cada una del sedimento triturado y se depositaron en crisoles para luego dejarlos en la mufla a temperatura constante de 450 °C durante cuatro horas y finalmente se

dejaron en el desecador durante 2 horas (Nelson y Sommers,1996;ASTM,2000 (Blume *et al*,1990).

5.4 Preparación de elutriado para la determinación de nutrientes y toxicidad.

La preparación del elutriado se realizó según la metodología de Dinnel & Strober (1985) agitando 100 g de sedimento con 100 mL de agua destilada, filtrada y aireada, en un agitador Heidolph Unimax 1010 (MERCK), a 5 rpm por 10 minutos, para posteriormente dejar en frío (4 °C) por 12 horas para que se separe la fase líquida (elutriado) de los sedimentos.

5.5 Determinación de Fósforo total

Se determinó Fósforo total mediante el método fotométrico Spectroquant con un intervalo de medida entre 0,02 -2,29 mgL⁻¹ P₂O₅. Marca Merck. Se pipeteó 5 mL del elutriado de sedimento en una cubeta de reacción , se añadió una dosis de P-1K, luego esta cubetas de reacción se calentaron durante 30 min a 120 °C en el termoreactor , al pasar el tiempo indicado estas fueron retiradas y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, se agregaron 5 gotas de P-2K cerrar y se mezcló, luego se añadió una dosis de P-3K,se agito intensamente la cubeta para disolver las sustancia sólida y finalmente se procedió a analizar en equipo fotométrico Spectroquant.

5.6 Determinación de Nitrógeno total

Se determinó Nitrógeno total el mediante método fotométrico Spectroquant con un intervalo de medida entre 10-150 mgL⁻¹ de Nitrógeno de Marca Merck. Se pipeteó 1mL del elutriado en una cubeta redonda vacía, a la misma cubeta se debió agregar 9 mL de agua destilada, una mini cucharada azul de N-1k, 6 gotas de N-2K, luego esta cubetas de reacción se calentaron durante 1 hora a 120 °C en el termo reactor, al pasar el tiempo indicado se retiraron se dejaron enfriar hasta temperatura

ambiente, se pipeteó 1 mL de la muestra preparada en un tubo de ensayo seguido de la adición de 1 mL de N-3k y finalmente se colocara las cubetas para medir en el equipo fotométrico Spectroquant.

5.7 Evaluación de la toxicidad con *Daphnia magna* en elutriado de sedimento

Se utilizó *D.magna*, obtenida desde cultivos por el Laboratorio de toxicología de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

Se prepararon las soluciones de agua reconstituida y de cultivo agregando NaHCO_3 ($2,59 \text{ gL}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($4,93 \text{ gL}^{-1}$), KCl ($0,23 \text{ gL}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($11,76 \text{ gL}^{-1}$) a 1 L con agua destilada y con un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80 %. El medio fue renovado tres veces por semana, y los cultivos fueron alimentados de acuerdo a la norma (NCh 2083. Of 1999).

Se evaluó la toxicidad aguda utilizando neonatos de *D. magna*, menores a 24 h de vida (neonatos). Se utilizó el elutriado preparado con el sedimento de la laguna bajo prueba, con 10 individuos por cubeta y en triplicado expuesto por 48 horas.

5.8 Ensayo de toxicidad con *Pseudokirchneriella subcapitata* con elutriado de sedimento

Se utilizó *Pseudokirchneriella subcapitata* obtenida del Laboratorio de Bioensayos del Centro Regional de estudios Ambientales (CREA) de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

Los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de USEPA (1993). y mediante la norma chilena NCh 2706 (2002) En ambos medios cada una de las sales fueron disueltas en 0,5 L de agua mili Q y esterilizada a 121°C por 30 min en el equipo de autoclave modelo TMQ CV 3870. Las microalgas se incubaron en matraces Erlenmeyer de 1L a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo luz de espectro blanco en un fotoperiodo de 18 h luz y 8 h de oscuridad. Las pruebas de inhibición de crecimiento de microalgas fueron realizadas en tubos transparentes y esterilizados de 5 mL de

vidrio de boro silicato. En cada tubo se colocaron muestras de elutriado de sedimento (5 mL), posteriormente se le agrego 1,5 mL de un inóculo de microalgas con la densidad celular óptima incluyendo controles. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. Las pruebas con las microalgas se llevaron cabo en condiciones controladas de iluminación continua con luz blanca fría de 11.000 lux y temperatura de 20- 21°C. La concentración de biomasa se midió diariamente durante el transcurso del experimento desde tiempo 0 hasta las 72 h en términos de densidad óptica (USEPA, 2002) a una longitud de onda de 680 nm, utilizando un colorímetro Nannocolor PT-3 MACHEREY-NAGEL.

5.9 Determinación del antibiótico Oxitetraciclina en sedimentos de la Laguna Trupán.

5.9.1 Extracción del antibiótico Oxitetraciclina

La extracción se realizó de acuerdo a los procedimientos previamente desarrollados y validados por IFOP (2011). Se tomaron aproximadamente 3 gramos de sedimento húmedo. Luego se agregaron 30 mL de solución de ácido oxálico 0.1 M en metanol y se agito vigorosamente en forma manual por 10 segundos y en vórtex por 30 segundos. Posteriormente se zonificó durante 30 minutos y se centrifugo a 4000 rpm por 10 minutos. Con una jeringa de 5 mL, se tomó el sobrenadante y se filtró con filtro 0,22 µm, 13 mm. Diámetro, sobre viales para HPLC, debidamente rotulado con tapa.

Se utilizó un equipo HPLC 1100 series Agilent, con detector de arreglo de diodos. Una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical de 4,6 mm x 150 mm de 5 – micrón, la fase móvil es 20% Acetonitrilo – 80 % Ac. Oxálico, la longitud de onda utilizada fue 355 nm, inyección 20 uL y un tiempo de retención de 4.6 min.

Paralelamente, se realizó una curva de calibrado del antibiótico Oxitetraciclina. La curva se realizó con cinco concentraciones, luego se procedió a filtrar con filtros

0,22 µm, 13 mm de diámetro, de PVDF sobre viales para HPLC, debidamente rotulado con tapa.

5.9.2 Ensayos de toxicidad del antibiótico Oxitetraciclina

5.9.2 a Ensayo de toxicidad aguda con *Lactuca sativa*

Para evaluar la toxicidad del antibiótico Oxitetraciclina se utilizaron las siguientes concentraciones 1, 2, 4,5, 6 y 10 ppm de Oxitetraciclina.

En cada placa Petri para cada solución en triplicado, se procedió a colocar papel filtro en cada uno de ellas las cuales fueron empapado con las soluciones se depositaron 10 semillas de lechuga Romana (*Bionda Degli Ortolani Vilmarin standard seed-Fislec* rules) de forma ordena se taparon, se envolvieron con papel, luego fueron incubadoras a 18 °C y evaluadas al paso de 76 horas (Ramírez & Mendoza, 2008).

5.9.2 b Ensayo de toxicidad aguda con *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Para evaluar la toxicidad del antibiótico Oxitetraciclina se utilizaron las siguientes concentraciones 1,2,4,5,6 y 10 ppm de Oxitetraciclina.

Se utilizó *Pseudokirchneriella subcapitata*, los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de USEPA (1993) y mediante la norma chilena NCh 2706 (2002). Las pruebas de inhibición de crecimiento de microalgas fueron realizadas en tubos de ensayos depositando 5 mL de soluciones de Oxitetraciclina, luego se agregó 1,5 mL de un inóculo de microalgas. Las pruebas se llevaron cabo en condiciones controladas de iluminación y temperatura con luz blanca fría de 11.000 lux y temperatura de 20- 21°C. La concentración de biomasa se midió desde la hora 0 hasta las 72 h en términos de densidad óptica (USEPA, 2002) a 680 nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados del pH en muestra de sedimento de Laguna Trupán

Los ensayos realizados para la determinación del pH de la Laguna Trupán indican valores ácidos de pH.

En la figura 5 se observa el promedio de pH por estación, obtenidos mediante la utilización de potenciómetro.

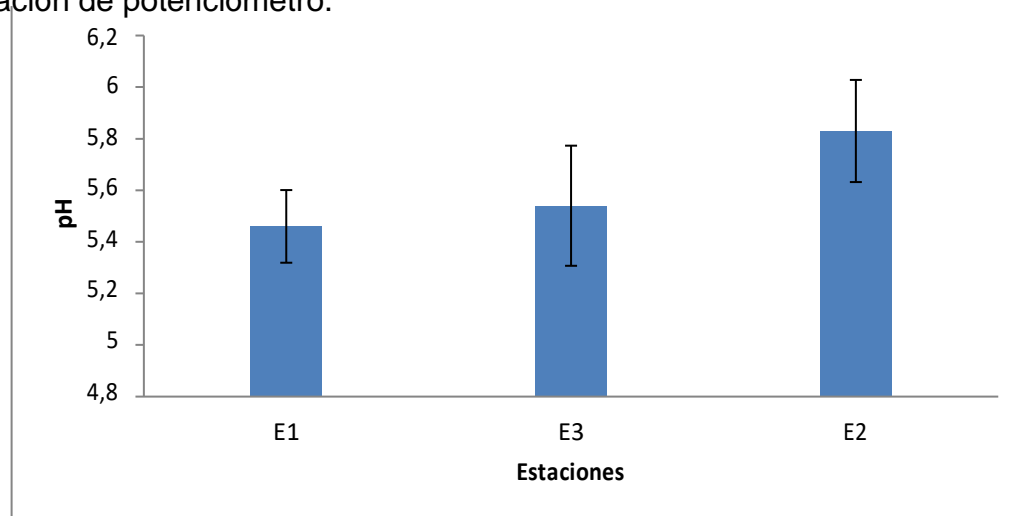


Figura 5. Concentración hidrogenionica (pH) en estaciones de la Laguna Trupán.

Se observa que el pH en cada estación de sedimento de la laguna Trupán entre si son distintos pero, todas ellas presentan un carácter ácido, al igual las barras de error están relacionadas con las diferencias que existe en cada estación. Presentando un pH más ácido la estación 1 en comparación con las otras estaciones.

Las aguas dulces tienen el pH entre 6.5 y 8.7, pero la Laguna Trupán presenta un pH entre 5,54 y 5,83; lo que indica que tiene una tendencia a ser una Laguna ácida, según Roldan *et al.*, (2008) Lagos y Lagunas ácidos se encuentran en regiones volcánicas.

La Laguna Trupán tendría su origen ácido debido a la afluencia de sus aguas de regiones volcánicas, en este caso sería debido al volcán Antuco, según los criterios de aguas o efluentes tratados para uso de riego (2005), el pH del cuerpo de agua

es considerando normal cuando está en un rango 6.5 – 8.4, cuando está fuera de este rango es considerado anormal, el cual puede producir un desbalance nutricional o contener un componente tóxico.

Según los resultados presentes en la bases limnológicas para la gestión de los lagos urbanos de Concepción (2016), muestra los siguientes promedios de pH: 8,29 (Laguna Lo Galindo), 8,18 (Laguna Tres Pascualas), 7,73 (Laguna Lo Méndez), 8,07 (Laguna Redonda), teniendo un carácter ácido todos los cuerpos de agua , otro estudio de Caracterización física y química de las aguas de los lagos Chungará y Cotacotani (1987), indica un pH respectivos a los cuerpos de aguas de 9,12 y 8,96, estando en el rango de básico ,para ambos casos estos coinciden con que los cuerpos de agua dulce están en un rango 6.5 y 8.7 , a excepción de lagos Changará, el cual es uno de los lagos más altos del mundo y la Laguna Trupán el cual se encuentra en un región volcánica.

Algunas veces las aguas con baja salinidad ($CE < 0.2$ dS/m) tienen pH anormal por su baja capacidad amortiguadora. Un agua de estas características, normalmente, causará pocos problemas en suelos o cosecha pero es muy corrosiva, por lo que puede impactar significativamente los equipos de riego. En los casos que el pH del agua de riego no está en el rango de 6.5 – 8.4, el pH del suelo se verá afectado muy lentamente, ya que el suelo resiste bastante los cambios de pH, al observar el pH de la Laguna Trupán (5,46;5,54;5,83), se puede considerar que es un agua débilmente ácida.

Los resultados de pH obtenidos en las estación de la Laguna Trupán según el informe final del 2005” criterios de calidad de aguas o efluentes tratados para uso en riego” , específicamente en la tabla 2 (expresado en término de valores mínimo y máximo), indica la clase de la laguna según un rango establecido, siendo *excepcional* agua de mejor calidad que la clase 1, que por su extraordinaria pureza y escasez, forma parte del patrimonio ambiental de la República, *clase 1* indica que es una laguna de muy buena calidad también que es agua apta para la protección y conservación de las comunidades acuáticas, para el riego irrestricto, *Clase 2* es

de buena calidad e indica un agua apta para el desarrollo de la acuicultura, de la pesca deportiva y recreativa y *Clase 3* que es agua de calidad regular que indica un agua adecuada para bebida de animales y para riego restringido. Según el pH obtenido de las aguas de la laguna Trupán los cuales fueron 5,46; 5,54; 5,83; al ser comparados con los valores presentes en la tabla 2, no se puede clasificar ya que está por debajo de los límites establecidos de la Norma Secundaria de Calidad Ambiental, la cual para toda clase el valor es el mismo por lo que no existe clasificación dependiendo de un valor de pH.

Tabla 2.Límites de Clases Norma Secundaria de Calidad Ambiental.

Grupo de elementos o compuesto	Unidad	Clase de excepción	Clase1	Clase 2	Clase3
pH	unidad	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5

Fuente: Criterios de calidad de suelos y de aguas o efluentes tratados para uso en riego, 2005.

6.2 Contenido de Materia Orgánica en las muestras de sedimento de Laguna Trupán.

Los ensayos realizados para la determinación del porcentaje de materia orgánica en el sedimento de la Laguna Trupán, está relacionado con la profundidad de la estación.

En la figura 6 se observa el porcentaje de materia orgánica por estación, obtenidos mediante el método de ignición.

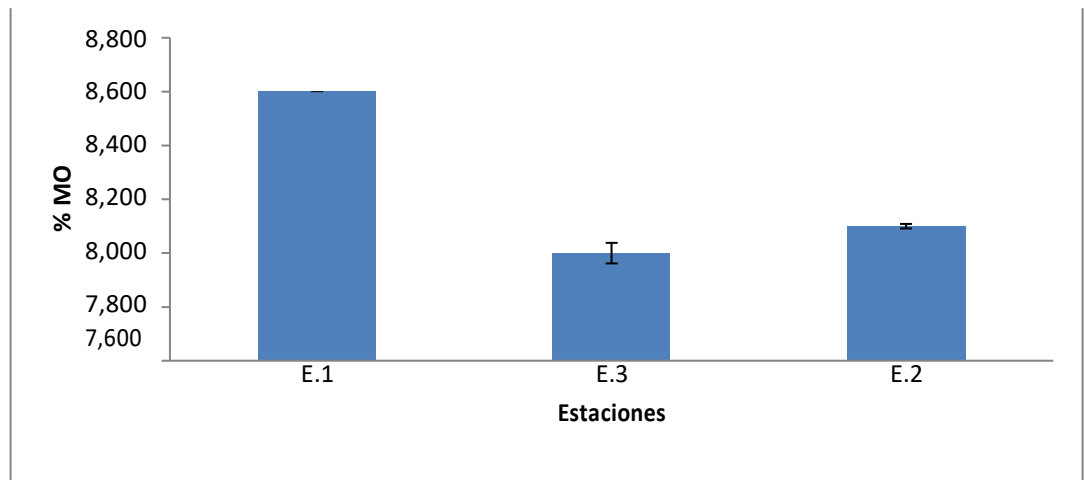


Figura 6. Porcentaje de materia orgánica en estaciones de la Laguna Trupan

En la gráfica de la figura 6. se observó que la materia orgánica en las estaciones muestreadas se encuentran dentro de un rango del 8%. Sin embargo la Estación 1 estación 1 con 8,6 % y el que posee el menor % de materia orgánica 8,00 % es E.3.

La materia orgánica total en sedimentos de la laguna presentó valores promedio entre 8,00,1% a 8,60,1%, siendo la estación 1 la con mayor valor, lo cual está relacionado con la profundidad de esta. Se debe considerar que la mayoría de esta materia orgánica puede ser proporcionada por el canal Zañartu sumado a la profundidad de esta estación.

En la base limnológica para la gestión de los lagos urbanos de Concepción, Chile (2016), presenta los siguientes resultados de porcentaje de materia orgánica de cuatro lagunas urbanas de Concepción los cuales son, 22,30% (Lo Galindo), 28,67% (Laguna Tres Pascualas), 16,83% (Lo Méndez), 7,41% (Laguna Redonda), se debe tener en cuenta de que estas son lagunas urbanas por lo que el ingreso de nutrientes debe ser mayor lo que generaría un porcentaje mayor de materia orgánica en comparación con la Laguna que se encuentra a las afuera de la ciudad.

Según la revista agrícola Terralia la disponibilidad de materia orgánica en el suelo va proporcionan una mayor capacidad tampón, la materia orgánica tiende a

acidificar el medio favoreciendo indirectamente la absorción de nutrientes por las plantas. Al observar los resultados se puede corroborar que la laguna posee un pH relativamente ácido y que los valores de las tres estaciones no fluctúan mucho entre ellas.

La clasificación propuesta por Ungemach (1960) considerando los sedimentos de 39 lagos europeos y un lago africano (el Victoria) divide los sedimentos lacustres en dos categorías: aquellos con porcentaje de materia orgánica mayor del 10%, clasificados como sedimentos orgánicos del tipo gyttja; y los que presentan porcentajes menores del 10%; designados como sedimentos minerales.

6.3 Determinación de nutrientes

Los ensayos realizados para la determinación de Fósforo y Nitrógeno en el sedimento de la laguna Trupán, siendo el Fósforo el nutriente de menor cantidad. En la figura 7 se representa gráficamente la cantidad en mgL^{-1} de Fósforo por estación. Los gráficos para Fósforo y Nitrógeno se realizaron por separado para poder tener una mejor apreciación de forma individual para cada micronutriente.

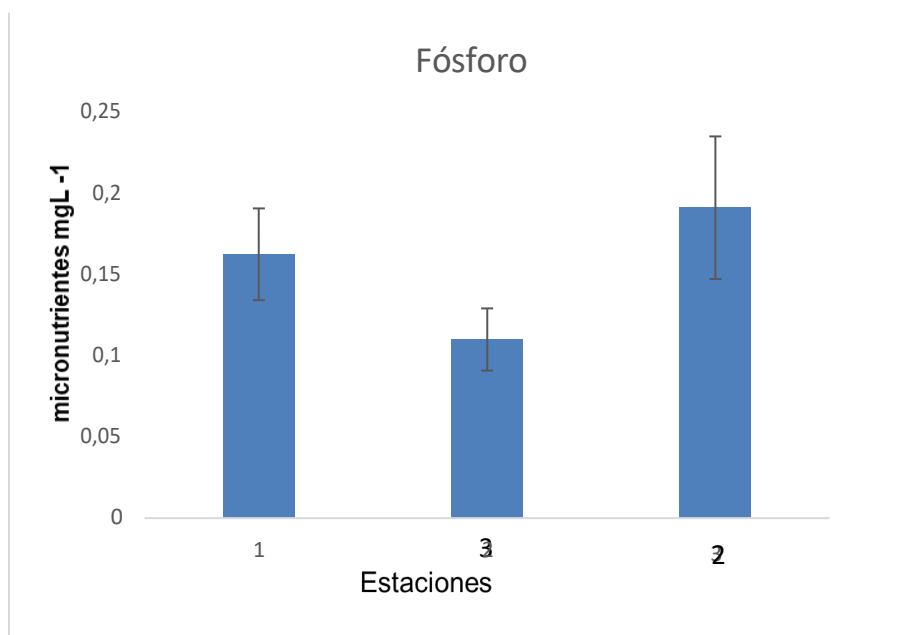


Figura 7. Fósforo total en al estaciones de sedimento de la Laguna Trupán

En la figura 7. se aprecia que la cantidad de Fósforo total es distinta entre estaciones. Se determinó una mayor cantidad de Fósforo total en la estación 3, en la estación 2 es donde se encuentra menor cantidad de Fósforo total.

La cantidad de Fósforo varía dependiendo de la procedencia del material orgánico pero en términos generales se encuentra en un rango de 0.1 a 2 % (base seca) de P_2O_5 (Burés, 1997).

La característica que coincide con los resultados obtenidos en la Laguna Trupán es que el Fósforo es el nutriente más bajo en las Lagunas. El Fósforo suele ser bastante escaso en las aguas dulces por lo que limita el crecimiento de las poblaciones de organismos, por esta razón cuando hay un suministro por fuentes antrópicas, como efluentes domésticos y agrícolas. Una parte de este Fósforo es capaz de impactar rápidamente al ecosistema, aumentando la productividad primaria generando un efecto de eutrofización, mientras que, otra parte es acumulada en los sedimentos bajo distintas formas químicas, una más fácilmente utilizable por los organismos que otras (Suárez. *et al*; 2013).

En la figura 8 se representa gráficamente la cantidad en mgL^{-1} de Nitrógeno por estación en los sedimentos de Laguna Trupán.

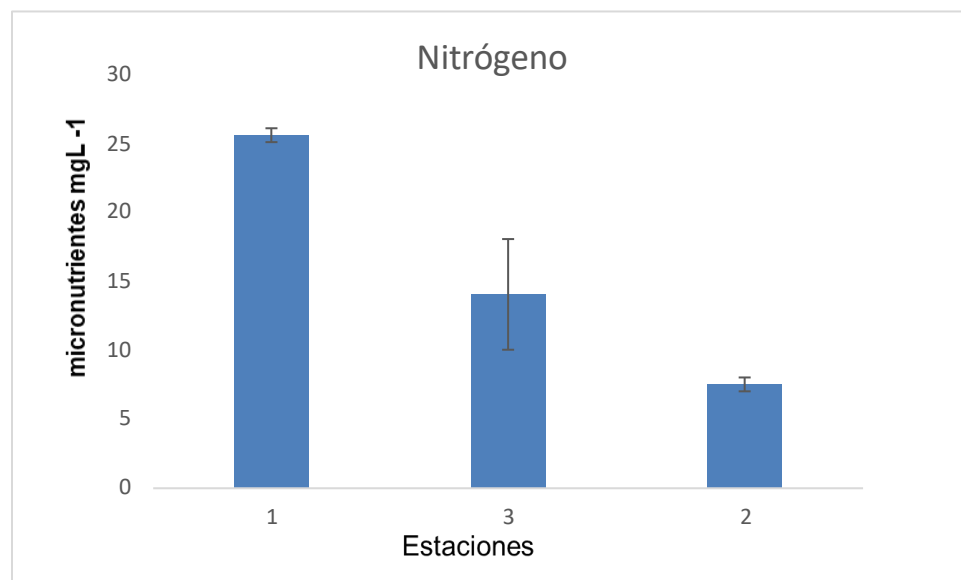


Figura 8. Nitrógeno total en las estaciones de sedimento de la Laguna Trupán

En la gráfica de la figura 8. se observó diferencia del contenido de Nitrógeno total entre las estaciones muestreadas, el contenido de Nitrógeno total en los sedimentos de la laguna fluctúa entre los 4,0 y 17,5 (mg L⁻¹). El mayor contenido de Nitrógeno total se determinó en la estación E.1 la cual es la salida de la laguna mientras que el menor contenido se encontró en la estación 2.

En la mayoría de los casos de eutrofización en agua dulce, el único nutriente de las plantas que puedes ser probablemente limitante es el Fósforo y generalmente se señala como culpable de la eutrofización excesiva (Stanley, 2007).

Al comparar los resultados presentes en la bases limnológica para la gestión de los lagos urbanos de Concepción (2016), son los siguientes; Fósforo 3132,4mg/Kg, Nitrógeno 5781,7mg/Kg (Laguna Lo Galindo), Fósforo 2943,2 mg/Kg, Nitrógeno 3054,4 mg/Kg (Laguna Tres Pascualas), Fósforo 3796,4 mg/Kg, Nitrógeno 4879,5 mg/Kg (Laguna Lo Méndez), Fosforo 666,4 mg/Kg, Nitrógeno 1855,7 mg/Kg (Laguna Redonda). Los valores son mayores a los obtenidos en Laguna Trupán, eso puede deberse al aporte antrópico ya que estas son Lagunas urbanas.

Lanza y Cáceres (1994) indican que los asentamientos urbanos incrementan el contenido de Nitrógeno por el aporte de aguas de desechos. Este aumento puede amortiguarse por dilución cuando las características de circulación y corrientes locales lo permiten, asociado a la geomorfología y condiciones pluviales y fluviales. Sin embargo, el aumento puede ser mayor si las condiciones ambientales se encuentran aisladas o confinadas, en el caso de la Laguna Trupán es un área que es cercana a la comuna y que es ocurrentemente visitada.

El estudio de la composición química de los organismos que constituyen al plancton, llevada a cabo por Redfield, condujo al establecimiento de la relación de Redfield, que establece la relación constante entre los distintos elementos constitutivos de la materia orgánica (C:N:P) lo que se traduce en una relación también constante entre las concentraciones de los nutriente en el agua de mar.

La materia orgánica de una comunidad Fitoplanctónica oceánica típica según Redfield (1963), tiene la composición elemental en términos de número de átomos o moles en relación al fósforo, P:N:C=1:15,5:108.

En la tabla 3. se muestran para cada estación de la laguna Trupan las relacion de Redfield entre el Nitrogeno y Fosforo (mg/L^{-1}) , indicando que el nutriente limitante en las tres estaciones es el Fósforo.

Tabla 3. Relación Redfiel, en Laguna Trupán, Comuna de Tucapel.

Estaciones	Razón Nitrógeno/Fósforo (mg/L^{-1})	Limitante
Estación 1	17,5 / 0,161=108,7	Fósforo limitante
Estación 2	14 / 0,109 =128,4	Fósforo limitante
Estación 3	4 / 0,185=21,6	Fósforo limitante

Nitrógeno y Fósforo total son elementos esenciales para formas de vida acuática, un incremento brusco de estos elementos, debidos principalmente a las actividades antropogénicas, es la causa principal de eutrofización de los lagos. El Fósforo es generalmente el nutriente limitante para el crecimiento de algas y por consiguiente, controla la productividad primaria de los cuerpos de agua. Las fuentes naturales de Fósforo y Nitrógeno son principalmente el desgaste de rocas y la descomposición de materia orgánica en tanto el mayor aporte antropogénicos es debido a las aguas servidas, particularmente las que contienen detergentes, efluentes industriales y drenajes agrícolas rico en fertilizantes.

Los resultados obtenidos de las estaciones los cuales al ser comparados con la “Guía para el establecimiento de las Normas Secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficiales y Marinas” de diciembre del 2015 (tabla 4), específicamente es comparado con el estado oligotrófico debido su contenido de Fósforo. Se puede apreciar que ambos nutrientes están por debajo de lo

establecido. Al ser una laguna oligotrófica es un cuerpo de agua con baja productividad primaria, como resultado de contenidos bajos de nutriente por lo tanto es baja la producción de algas.

Tabla 4. Tabla comparación Fósforo y Nitrógeno total Laguna Trupán

Elemento o compuesto	Unidad	Estado Ultraoligotrófico	Estado oligotrófico	Estado Meso trófico	Estado Eutrófico	Laguna Trupán
Nitrógeno total	μgL^{-1}	< 60 (300)	250 (450)	400 (750)	> 400 (750)	4-17,5
Fósforo Total	μgL^{-1}	< 5 (7.5)	10 (10)	20 (30)	> 20 (30)	0,109-0,185

Fuente: Decreto 9 “Norma secundaria calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas.

6.4 Resultados toxicidad en muestras de sedimento de Laguna Trupán con *D. magna*.

Los ensayos realizados para la determinación del porcentaje de mortalidad indican que los sedimentos no tienen un efecto letal agudo en los neonatos de la *D. magna*. En la figura 9 se observa el porcentaje de mortalidad de la *D. magna* luego de 72 hrs de exposición al elutriado del sedimento.

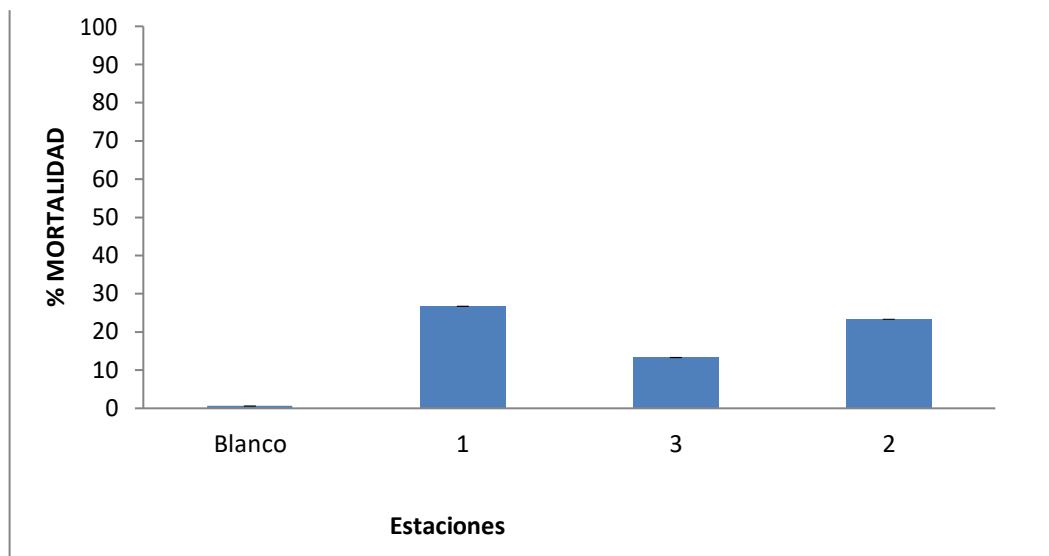


Figura 9. Porcentaje de mortalidad de *D. magna* en las muestras de elutriado sedimento de Laguna Trupán.

En la gráfica de la figura 9. Se observó diferencia en el porcentaje de mortalidad de *D. magna*, entre los elutriado de las respectivas estaciones. Se observa que la mortalidad de *Daphnia* es mayor en las estación 1 (26,7%) y estación 3 (23,3%), encontrándose un menor porcentaje de mortalidad en las estaciones 2 (13,3%) y en el blanco.

Se puede inferir que el sedimento no tiene un efecto letal agudo en los neonatos de la *D. magna* debido a que en ninguna estación el sedimento genero la muerte al 50 % de la población después de un periodo de exposición de 48 horas.

Los *daphnidos*, han sido registrados como uno de los organismos acuáticos más sensibles que se han utilizado en ensayos de toxicidad, estos organismos son representantes importantes de la comunidad zooplanctónica, (EPA, 1993). Según Chamorro (2005). Es uno de los organismos más utilizados en la realización de este tipo de estudios, básicamente por ser altamente sensibles a la presencia de bajas concentraciones de contaminantes y responder a un gran número de agentes tóxicos de naturaleza diversos, son los *daphnidos*.

El análisis estadístico Anova (tabla 6) determino que no existe diferencias entre las varianzas, debido a que mi $F_{\text{calculado}}$ (1,88) es menor a $F_{(3,8)\text{ crítico}}$ (4,066)y para comprobarlo se utiliza el segundo criterio con P (0,2116) es mayor al α (0,05) por ende no se rechaza la hipótesis nula , lo que indica que no existe diferencia entre las variables diferente.

6.5. Toxicidad en muestras en muestras de sedimento de Laguna Trupán. con *Pseudokirchneriella subcapitata*

Los ensayos realizados para la determinación de la biomasa de *P.subcapitata*, indicando que no existe un potencial efecto tóxico sobre *P.subcapitata* en $t=0$ y $t=96$ hrs.

En la figura 10 se observa la biomasa de *P.subcapitata* luego de 96 horas de exposición al elutriado del sedimento.

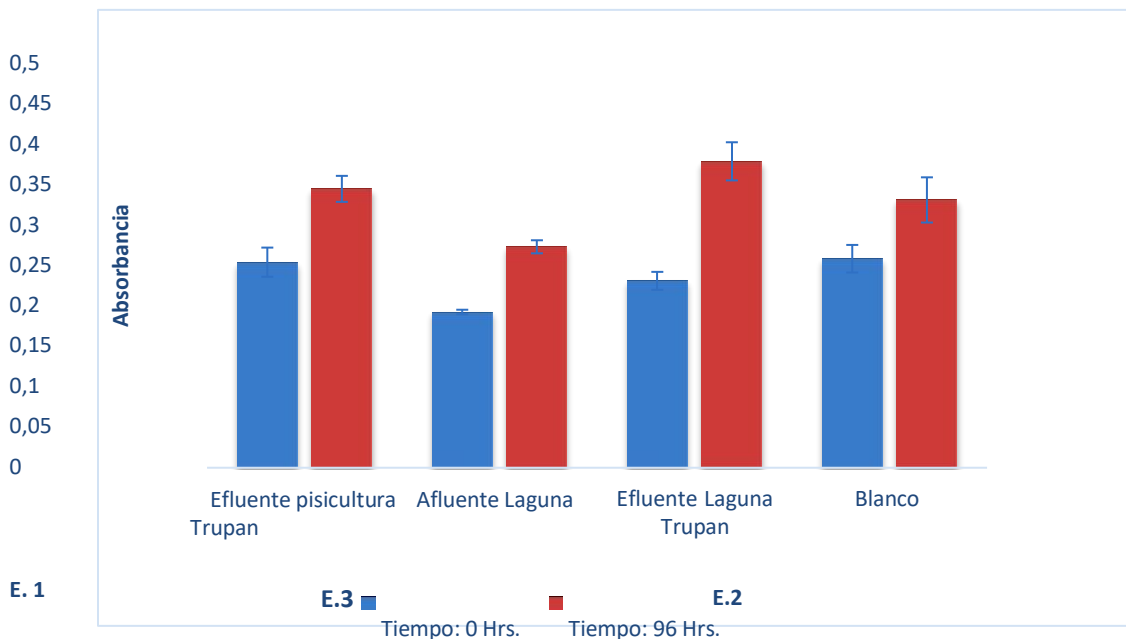


Figura 10. Densidad celular de *P. subcapitata*, en las estaciones evaluadas a tiempo 0 y a 96 horas.

En la gráfica de la figura 10. Se muestra que entre los tiempos 0 y 72 hrs existe una diferencia apreciable entre las estaciones de la laguna, a tiempo cero a pesar de que también existe diferencia entre ellas, esta no es tan amplia entre ellas, a las 72 hrs se observa una diferencia significativa entre ellas. Se observa que el mayor crecimiento de *P.subcapitata* se dio en la estación 2 mientras que el menor crecimiento se observó en la estación 3.

En los sedimentos no se observa un potencial efecto tóxico sobre *P.subcapitata* en $t=0$ y $t=96$ hrs. Se puede observar que su crecimiento no se vio afectada ya que las absorbancias aumentaron. Según Grandos *et al.* (2008) cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos su crecimiento se ve inhibido.

El análisis estadístico Anova (tabla 7), señala que no se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que no existe diferencias en entre las varianzas significativas, debido a que el F calculado (3,66) es menor a el F (3,8) crítico (4,07) y para comprobarlo se utiliza el segundo criterio P (0,0630) el cual es mayor al α (0,05) por ende no se rechaza la hipótesis nula; lo que indica que no existe diferencia entre las varianzas.

6.6 Determinación del antibiótico Oxitetraciclina en sedimentos de la Laguna Trupán

En ninguna de las estaciones analizadas se encontró la presencia del antibiótico Oxitretraciclina, al observar (anexo viii.e) los respectivos espectros por estación y réplica se puede apreciar más de una señal pero ninguno correspondiente al antibiótico estudiado, debido a esto se realizó una extracción con recuperación (anexo VIII. g) agregando 600 uL de una solución de 2 ppm de Oxitetraciclina, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 5. Resultados de extracción y recuperación del antibiótico Oxitetraciclina de los sedimentos en las estaciones de Laguna Trupán

Estaciones	ppm Extracción muestras sedimento Laguna Trupán				% recuperación (ppm)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
E1	0,000	0,000	0,000	0,000	102,6	101,3	100,25	98,25
E2	0,000	0,000	0,000	0,000	116,75	96,95	102,35	96,25
E3	0,000	0,000	0,000	0,000	103,8	89,00	100,23	88,1

El porcentaje de recuperación del antibiótico Oxitetraciclina de los sedimentos en las estaciones de Laguna Trupán, se puede decir de que el método de extracción fue eficaz ya que se obtuvo la concentración del estándar agregado (anexo viii.f), lo que confirma que no se encontró la presencia del antibiótico en la muestra de sedimento estudiado.

6.7 Toxicidad a concentraciones crecientes de Oxitetraciclina con *Lactuca Sativa*

Los ensayos realizados para la determinación del porcentaje de germinación, indica que la Oxitetraciclina es tóxica sobre *L.sativa* a las 72 hrs.

En la figura 11 se observa el porcentaje de germinación de *L.sativa* a 72 hrs de exposición.

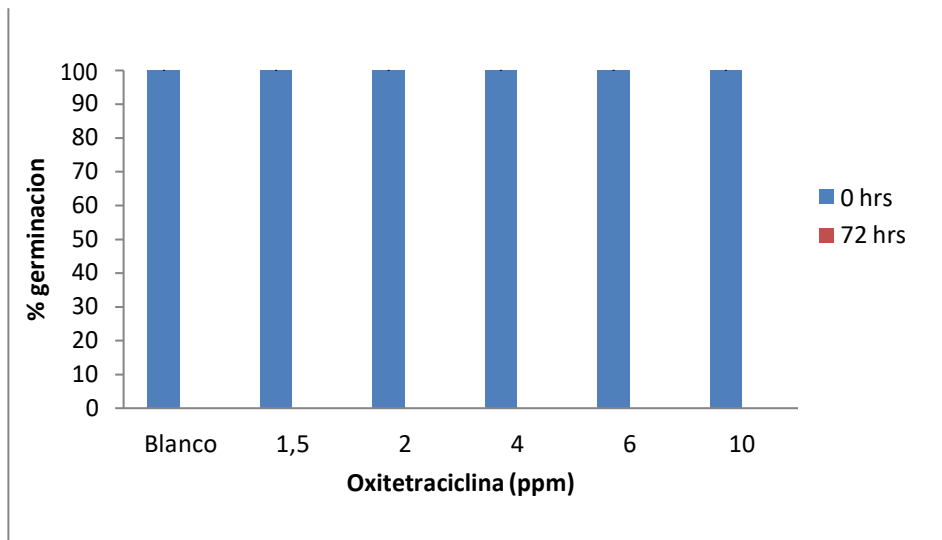


Figura 11. Porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* a distintas concentraciones crecientes de Oxitetraciclina a las 72 hrs.

Según Pentreath *et al.* (2015) el ensayo de germinación y elongación de la radícula se realiza con los constituyentes solubles en agua teniendo en cuenta, para el resultado, la cantidad de semillas germinadas y la media del crecimiento de la raíz.

De la cantidad total de semillas por estación (30) no se observó germinaciones ni algún tipo de crecimiento en ella, esto sucedió en las tres estaciones, por lo que se puede decir que el antibiótico resulta tóxico en el medio, es decir, que puede producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función, o producir la muerte. Con *Phaseolus vulgaris* (guisante) se observó que los antibióticos Clortetraciclina y Oxitetraciclina disminuyen el crecimiento y el desarrollo de la planta a dosis de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Batchelder, 1981; 1982), valores comparables con los obtenidos en este estudio con la *L. sativa* en la cual a ninguna concentración se observa un crecimiento (germinación de la semilla).

Mediante el análisis estadístico Anova de dos vías (figura 37), no se acepta la hipótesis nula (las horas de exposición y concentraciones no tienen un efecto en la germinación semillas de *L. sativa* debido a que los F calculados (1 y 4360,63247) son mayores de F críticos (3,32583453 y 4,10282102), respectivamente.

6.8 Toxicidad a concentraciones crecientes de Oxitetraciclina con *Pseudokirchneriella subcapitata*

Los ensayos realizados para la determinación de la densidad de *P.subcapitata* indicando que existe un efecto tóxico.

En la figura 12 se observa la densidad de *P.subcapitata*, a distintas concentraciones de Oxitetraciclina.

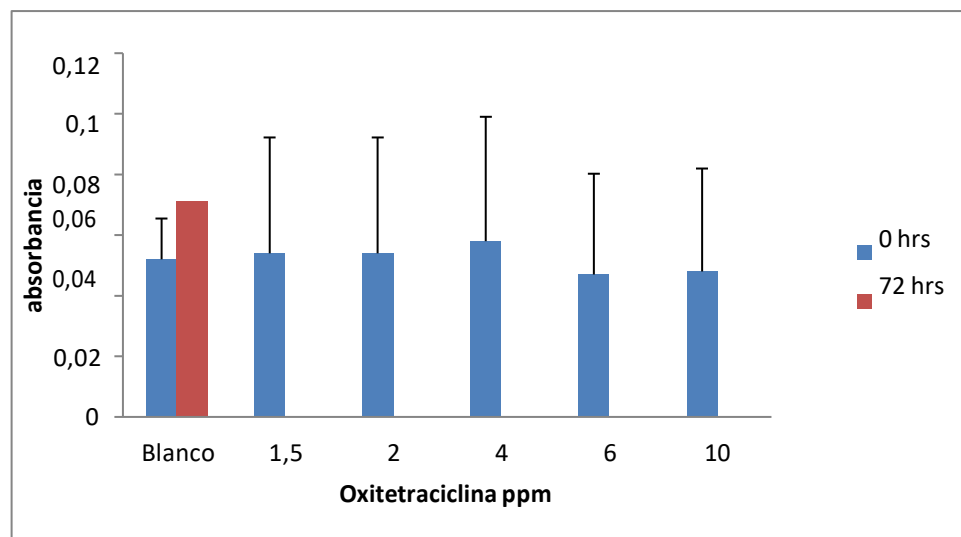


Figura 12. Densidad celular de la *P.subcapitata* a concentraciones crecientes de Oxitetraciclina

El antibiótico Oxitetraciclina produce una inhibición sobre la *P.subcapitata* a las 72 horas, llegando a medir absorbancia 0 produciendo una inhibición del crecimiento. Según Grandos *et al.* (2008), cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos su crecimiento es inhibido.

Según Bielen *et al.* (2017), en el estudio 'Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluent from pharmaceutical industries', donde se desarrolló un bioensayo con *P. subcapitata*; cual fue expuesto a dos efluentes de compañías distintos con presencia de antibióticos, teniendo como resultado tóxico para la especie, resultado que coincide con el obtenido en el presente estudio.

Considerando que *P.subcapitata* forma parte de las algas fotosintéticas que constituyen la base de la cadena alimenticia en los ecosistemas acuáticos, cualquier alteración de estos organismos autótrofos pueden causar efectos graves de manera ascendentes en otros organismos, como lo es el estudio herbívoro en los niveles tróficos superiores (Kobraei y White, 1996).

El análisis estadístico Anova de dos vías (figura 38), para el caso de las concentraciones se acepta la hipótesis nula (las concentraciones no tienen un efecto en la *P.subcapitata*, debido a que la F calculados (0,98901) es menor al F crítico (5,0503), pero en el caso de las horas no se acepta la hipótesis nula (las horas no tienen un efecto en la absorbancia de la *P.subcapitata*) ya que F calculado (11,3250) es mayor a F crítico (6,6078).

7. Conclusiones

- 1) La Laguna Trupán posee un pH ácido, debido al aporte que realiza el río Laja en donde se encuentra el volcán Antuco.
- 2) El mayor porcentaje de materia orgánica en Laguna Trupan se encontró en la estación 1, lo cual está relacionado con la profundidad de la estación y el aporte que realiza el canal Zañartu.
- 3) El contenido de Fósforo total fue mayor en la estación 2. En algunos ecosistemas el factor limitante es el fosfato, como sucede en la mayoría de los cuerpos de agua dulce.
- 4) A partir de la relación molar planteada por Redfield (1958) se considera que cuando la relación molar N/P es >16 , el P será el factor limitante, lo cual se demostró en todas las estaciones de la Laguna Trupan.
- 5) Al evaluar la calidad del sedimento a través de un punto de vista ecotoxicológico, el sedimento de laguna Trupán no se observó un efecto letal en los bioindicadores *D.magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *L.sativa*.
- 6) En el sedimento estudiado de Laguna Trupán no se encontró concentraciones del antibiótico Oxitetraciclina.
- 7) Al evaluar la toxicidad del antibiótico Oxitetraciclina mediante los organismos bioindicadores con *D.magna*, *L.sativa* y *Pseudokirchneriella subcapitata* es un potencial agente tóxico, lo cual se aprecia con una alta mortalidad, inhibición en la germinación y crecimiento celular.
- 8) El ingreso de materia orgánica, fósforo y Nitrógeno total no produce un impacto en la calidad y toxicidad del sedimento.
- 9) Al implementar la metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en la determinación de Oxitetraciclina se obtuvieron altas recuperaciones por lo tanto la metodología fue exitosa.

8. ANEXO

Ensayos de *Daphnia sp* en sedimentos.

Tabla 6. Resultados de la prueba estadística ANOVA (una vía) a ensayos de toxicidad con *Daphnia Magna* en los sedimentos de la laguna Túcapel. Octubre 2015

One-Way AOV for Factor by Vr

Source	DF	SS	MS	F	P
Vr	3	6,2000	2,06667	1,88	0,2116
Error	8	8,8000	1,10000		
Total	11	15,0000			

Ensayos de en sedimentos con *Pseudokirchneriella subcapitata*

Tabla 7. Resultados de la prueba estadística ANOVA (una vía) a ensayos de toxicidad *Pseudokirchneriella subcapitata* con en los sedimentos de la laguna Tucapel. Octubre 2015

One-Way AOV for resp by factor Vr

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
-----	----	-----	-----	-----	-----
BETWEEN	3	2097.72	699.239	3.66	0.0630
WITHIN	8	1527.05	190.882		
TOTAL	11	3624.77			

Curva de calibrado Oxitetraciclina

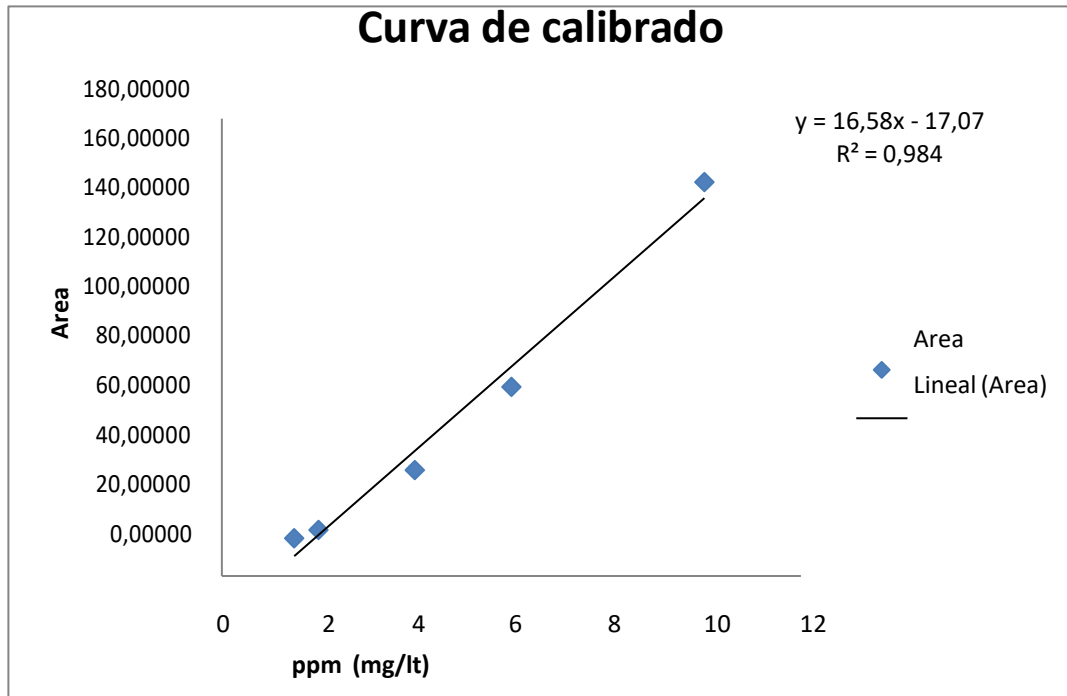


Figura 13. Curva de calibrado Oxitetraciclina

	16,5803068	-17,0697881	
pen	1,22227808	6,87633271	in
ee	0,98395821	8,45053049	ee
des pen			des in

$$Y = 16,58x - 17,07$$

$$R^2 = 0,984$$

$$\text{Int} = b / \text{LDD} = \text{int} + 3 \text{ des int} / Y = \text{LDD}$$

$$\therefore mx + b = b + 3 \text{ des int}$$

$$X = 3 \text{ des int} / m$$

$$X = 3 * 8,45053049 / 16,5803068$$

$$X = 1,5290182369 \approx 1,53$$

El límite de detección nos indica que 1,53 ppm es la concentración mínima de Oxitetraciclina que el equipo puede detectar.

Espectros extracción

Extracción Estación 1

En esta estación no se encuentra presente el antibiótico Oxitetraciclina.

E.1 a

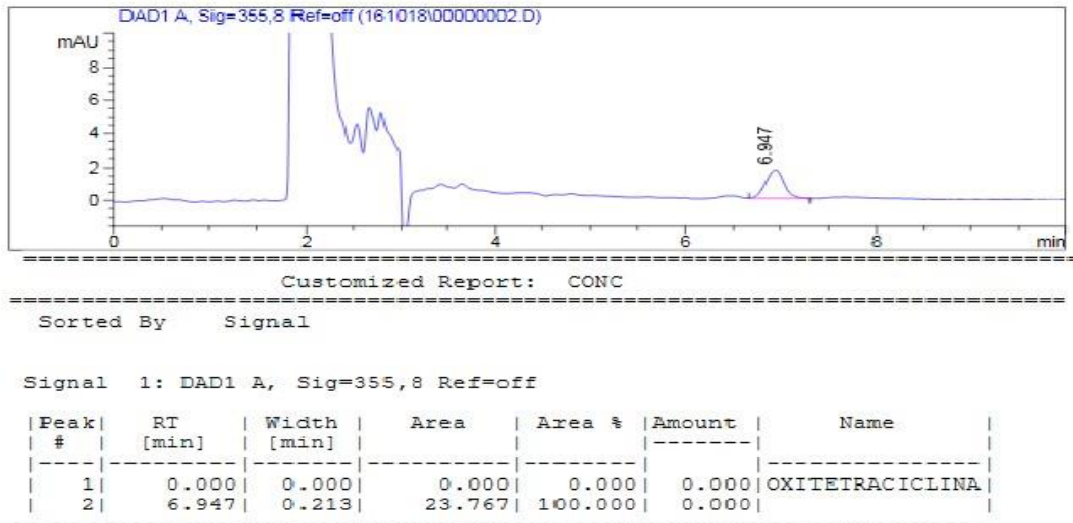


Figura 14. Espectro extracción Oxitetraciclina Estacion1 (réplica A)

E.1 b

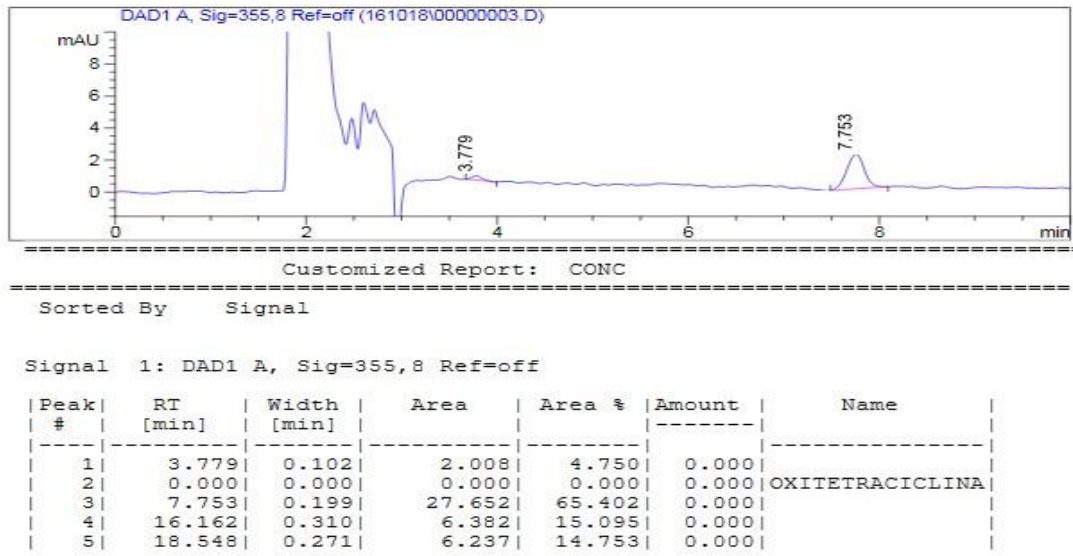
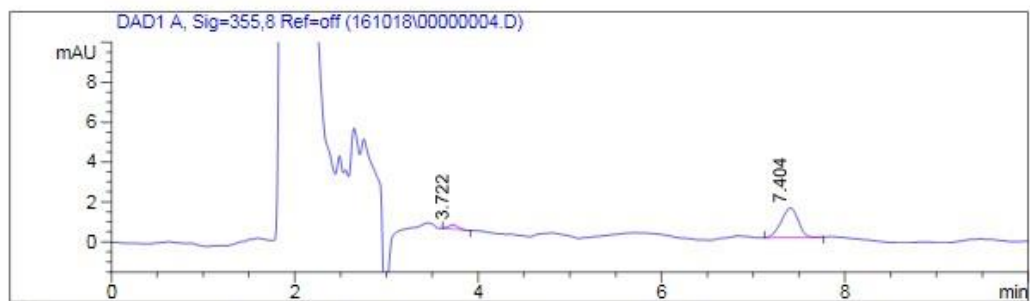


Figura 15. Espectro extracción Oxitetraciclina Estacion1 (réplica B)

E.1 c



Customized Report: CONC

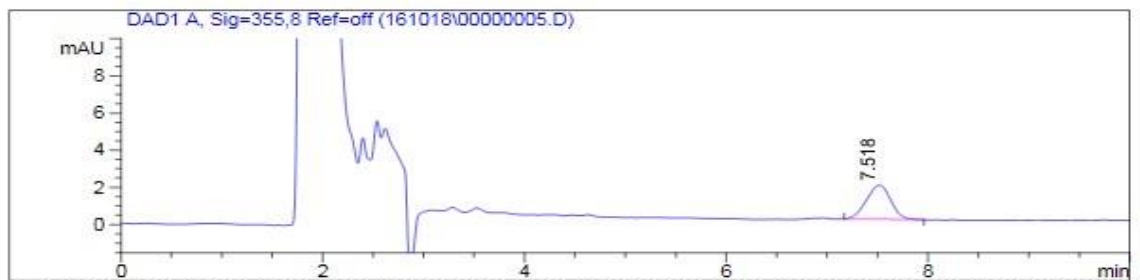
Sorted By Signal

Signal 1: DAD1 A, Sig=355,8 Ref=off

Peak #	RT [min]	Width [min]	Area	Area %	Amount	Name
1	3.722	0.106	1.562	7.664	0.000	
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	OXITETRACICLINA
3	7.404	0.197	18.815	92.336	0.000	

Figura 16. Espectro extracción Oxitetraciclina Estacion1(réplica C)

E.1 D



Customized Report: CONC

Sorted By Signal

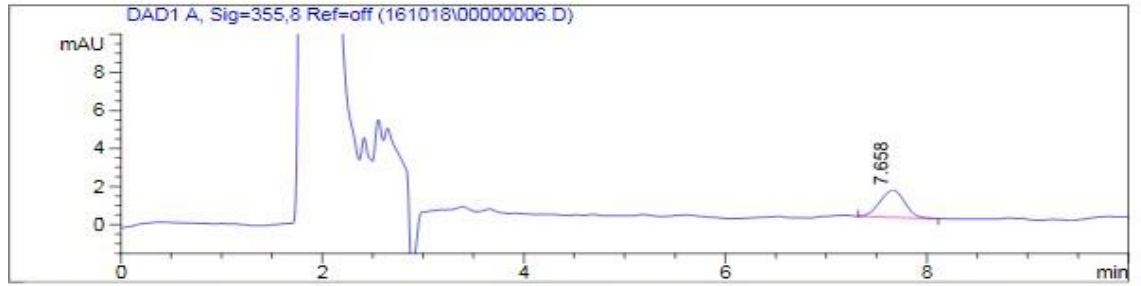
Signal 1: DAD1 A, Sig=355,8 Ref=off

Peak #	RT [min]	Width [min]	Area	Area %	Amount	Name
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	OXITETRACICLINA
2	7.518	0.247	30.943	100.000	0.000	

Figura 17. Espectro extracción Oxitetraciclina Estacion1 (réplica D)

Extracción Estación 2

E.2 A



Customized Report: CONC

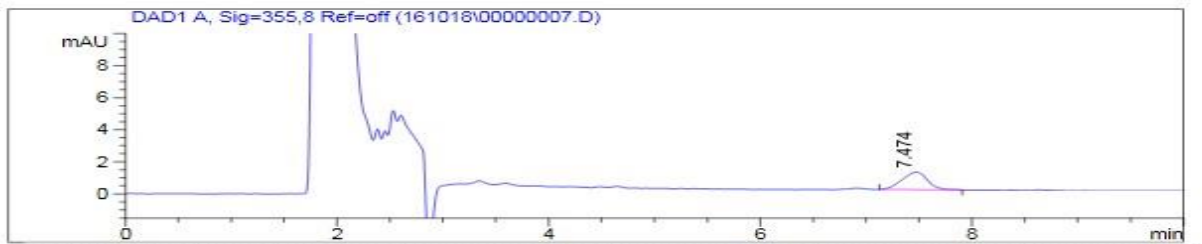
Sorted By Signal

Signal 1: DAD1 A, Sig=355,8 Ref=off

Peak #	RT [min]	Width [min]	Area	Area %	Amount	Name
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	OXITETRACICLINA
2	7.658	0.267	24.601	100.000	0.000	

Figura 18. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 2(réplica A)

E.2 B



Customized Report: CONC

Sorted By Signal

Signal 1: DAD1 A, Sig=355,8 Ref=off

Peak #	RT [min]	Width [min]	Area	Area %	Amount	Name
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	OXITETRACICLINA
2	7.474	0.245	18.505	100.000	0.000	

Figura 19. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 2(réplica B)

E.2 C

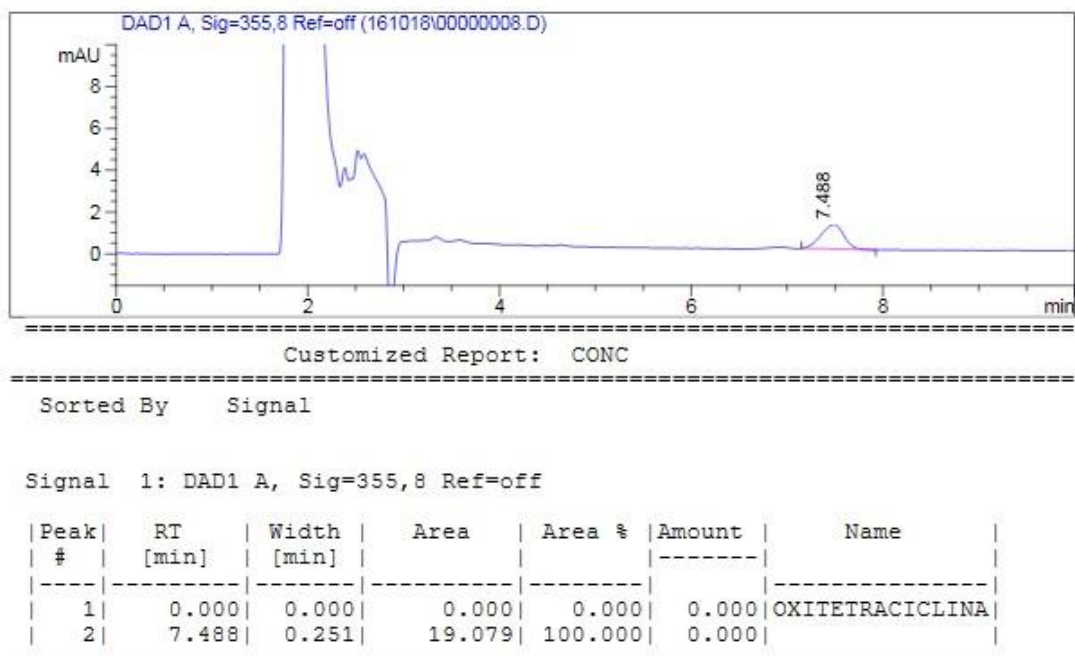


Figura 20. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 2(réplica C)

E.2 D

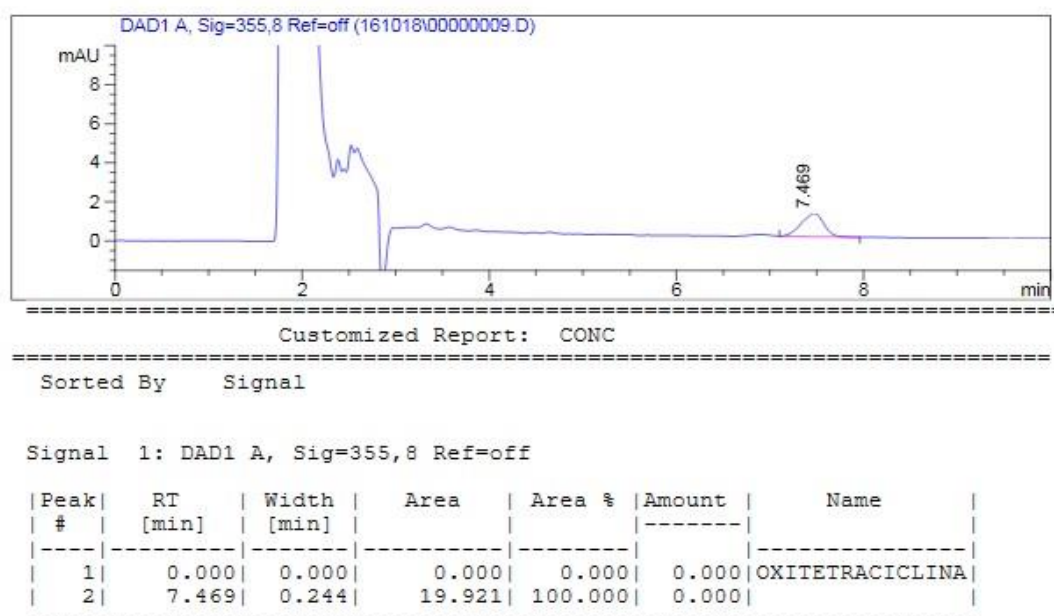


Figura 21. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 2(réplica D)

Extracción Estación 3

E.3 A

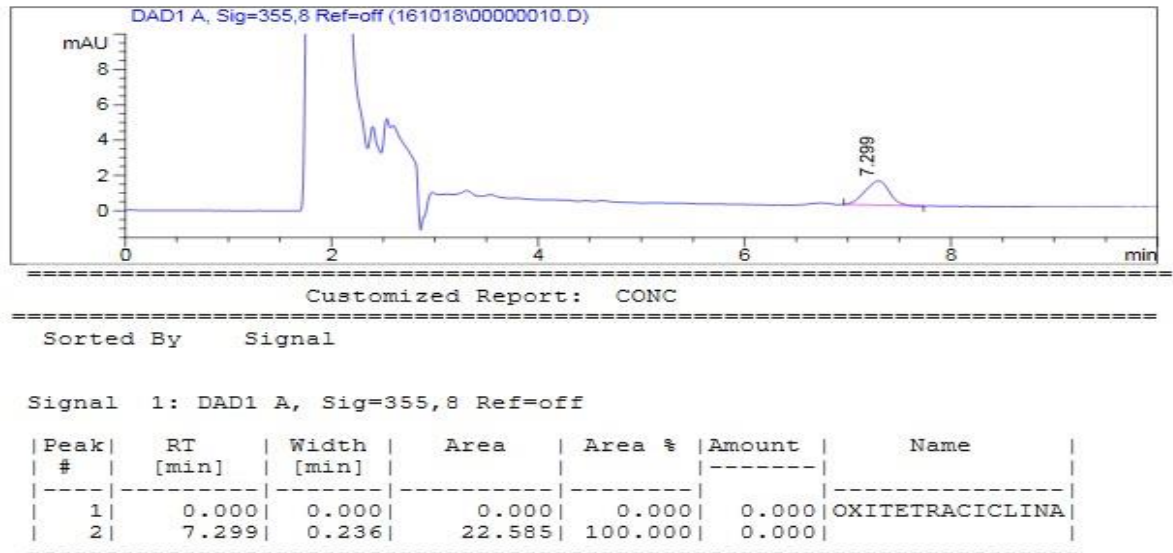


Figura 22. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica A)

E.3 B

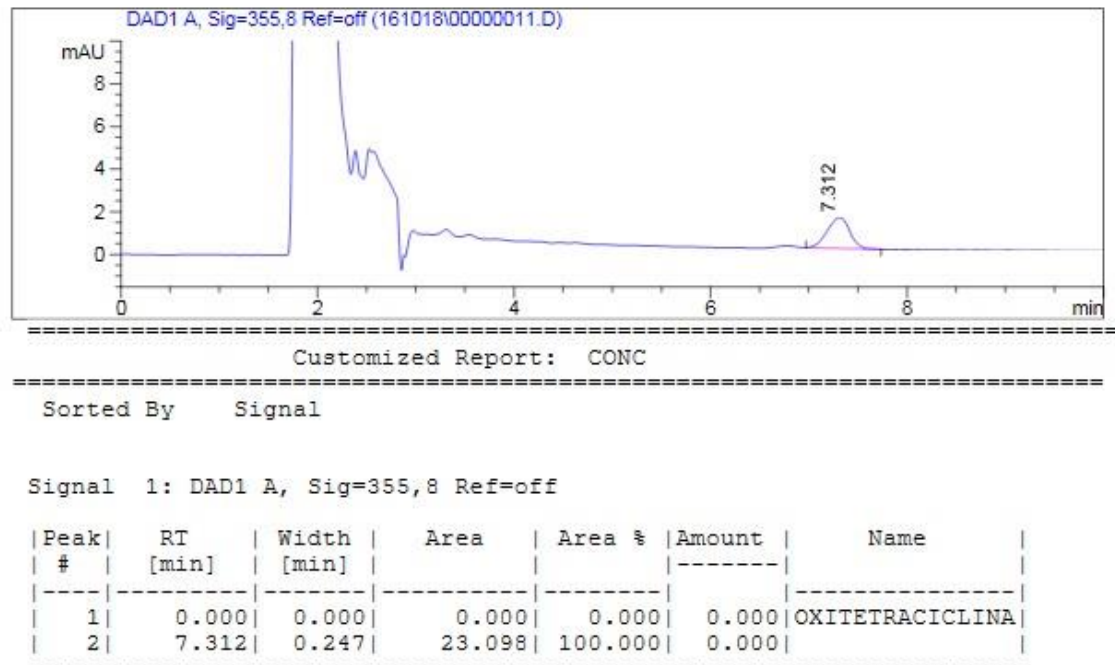


Figura 23. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica B)

E.3 C

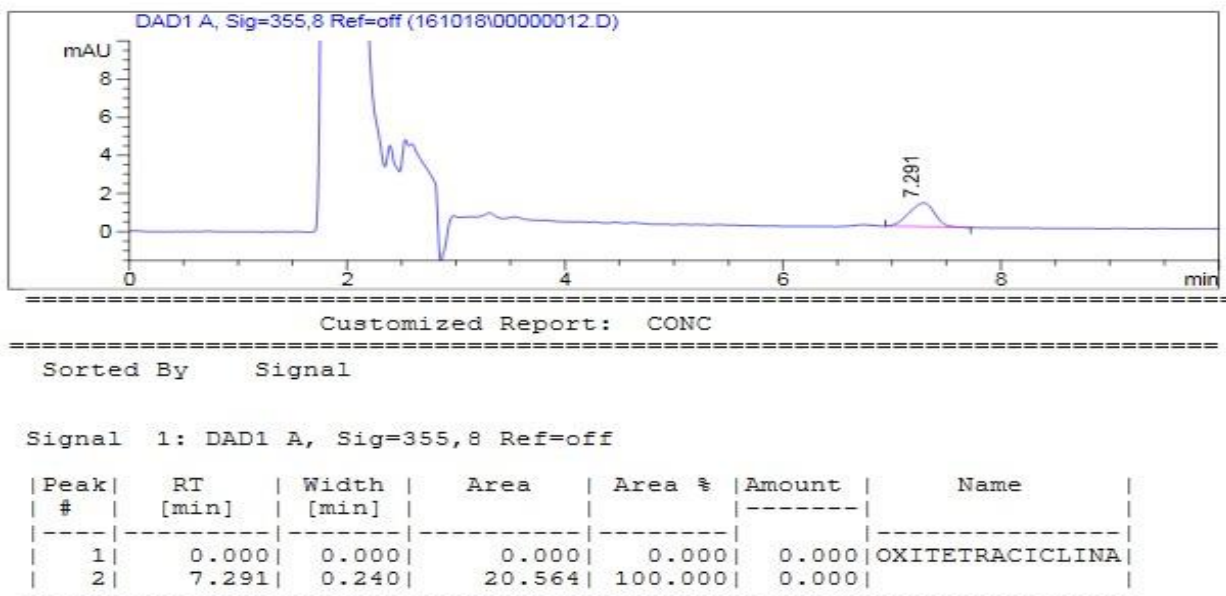


Figura 24. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica C)

E.3 D

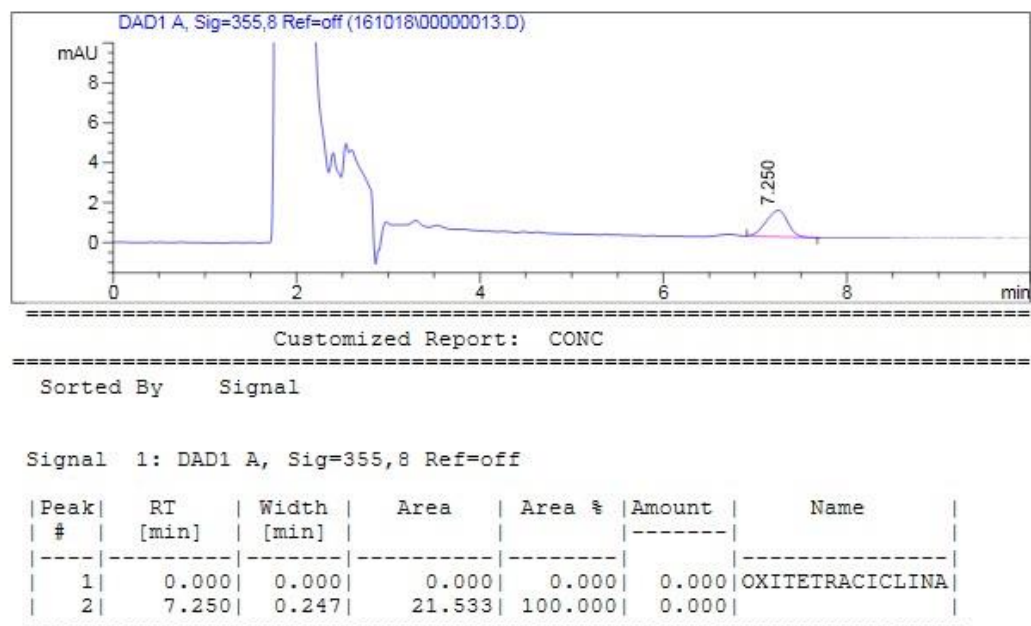


Figura 25. Espectro extracción Oxitetraciclina Estación 3(réplica)

8.c Espectros extracción por recuperación

Estación 1

E1.A

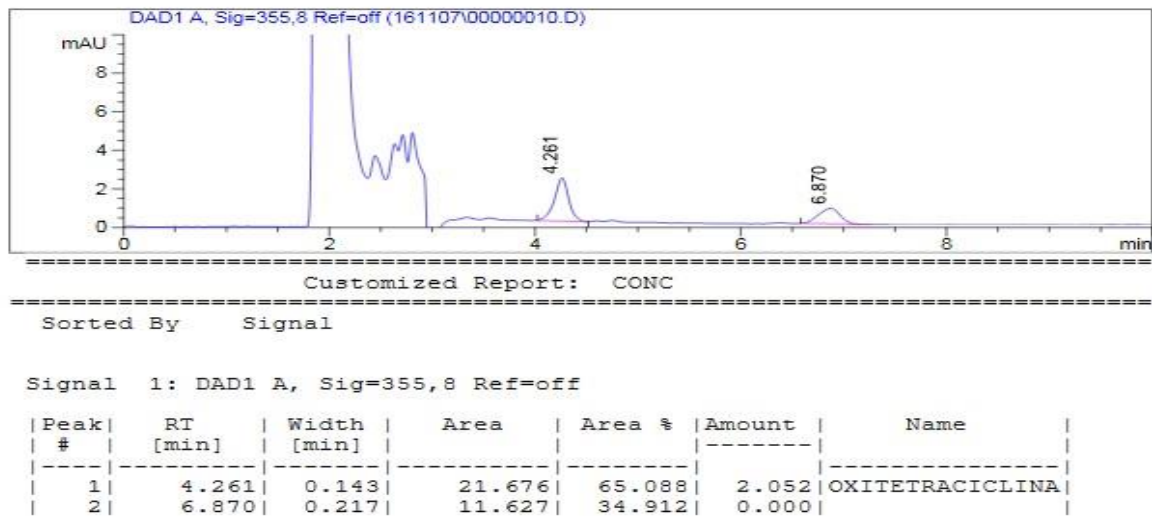


Figura 26. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1 (réplica A)

E1.B

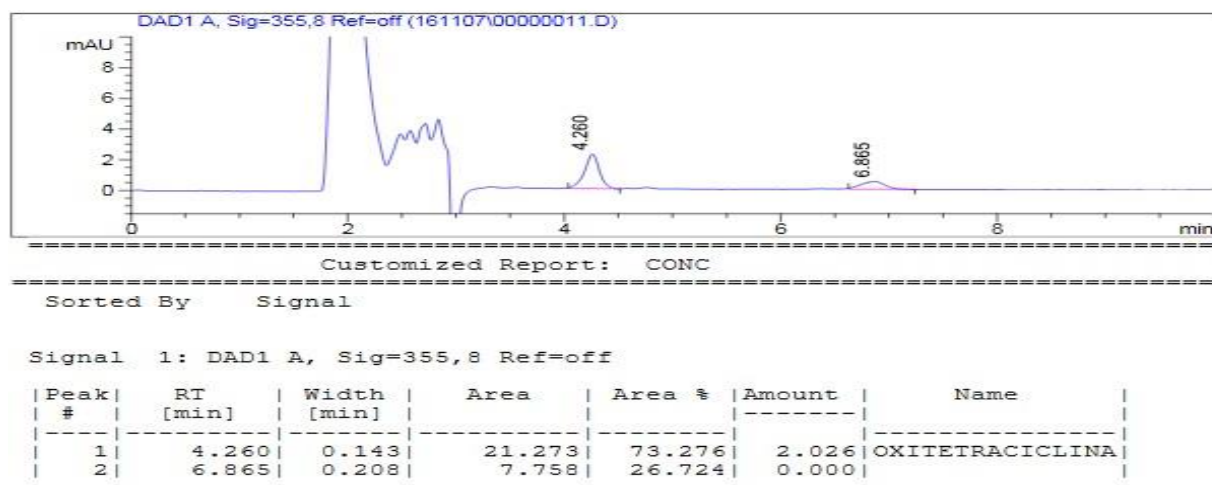


Figura 27. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1 (réplica B)

E1.C

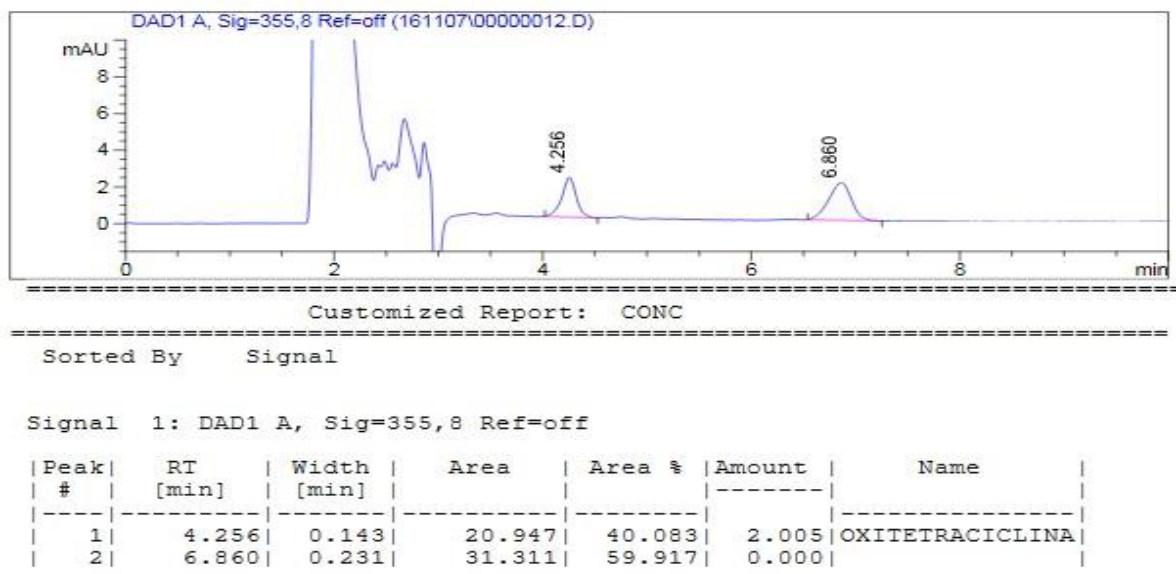


Figura 28. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1 (réplica C)

E1

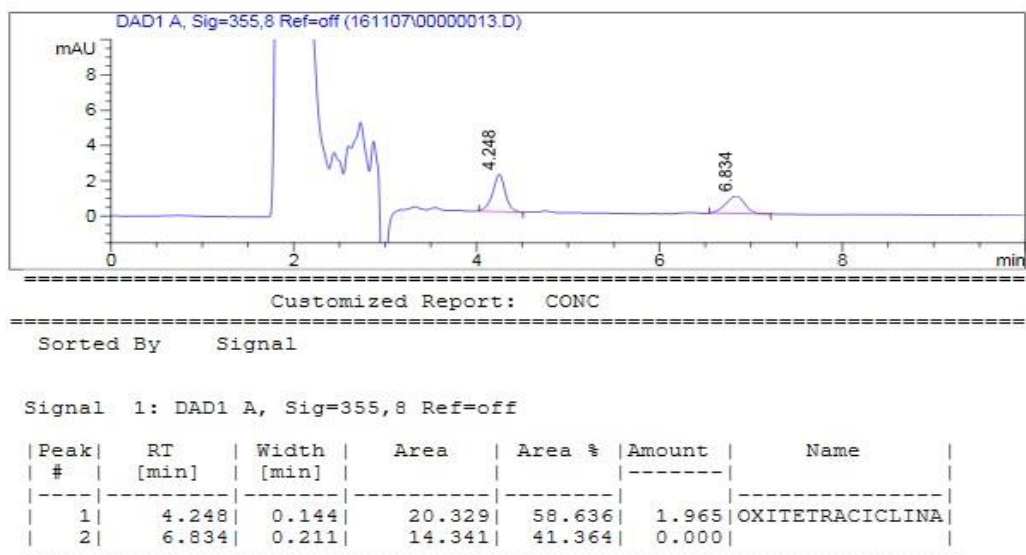


Figura 29. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 1 (réplica D)

Estación 2

E2.A

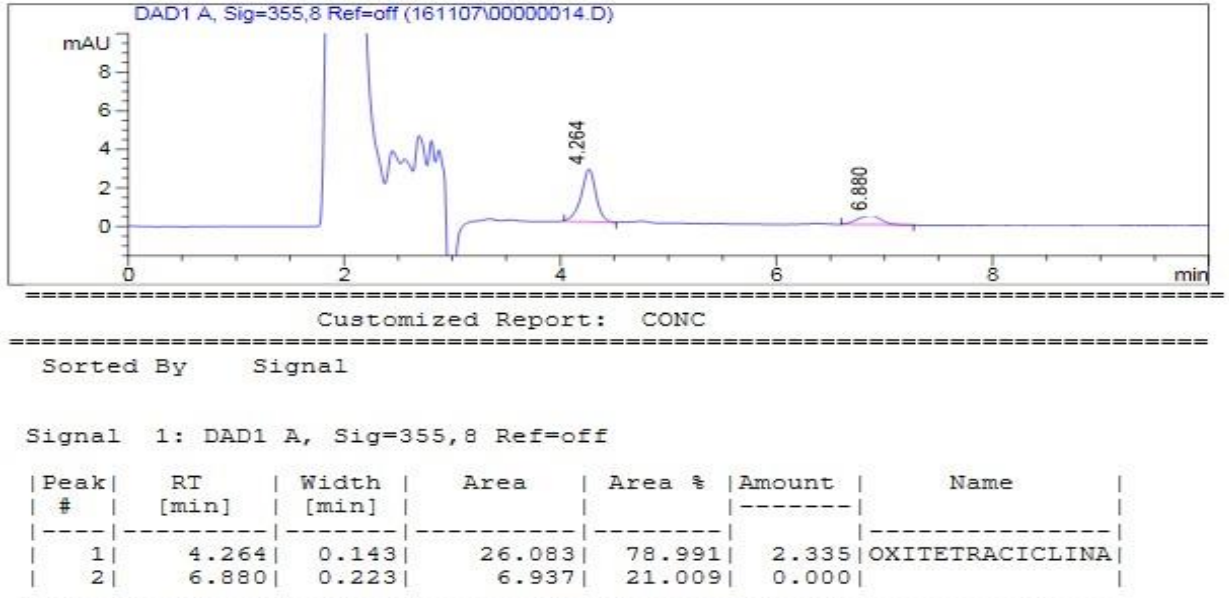


Figura 30. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2 (réplica A)

E2.B

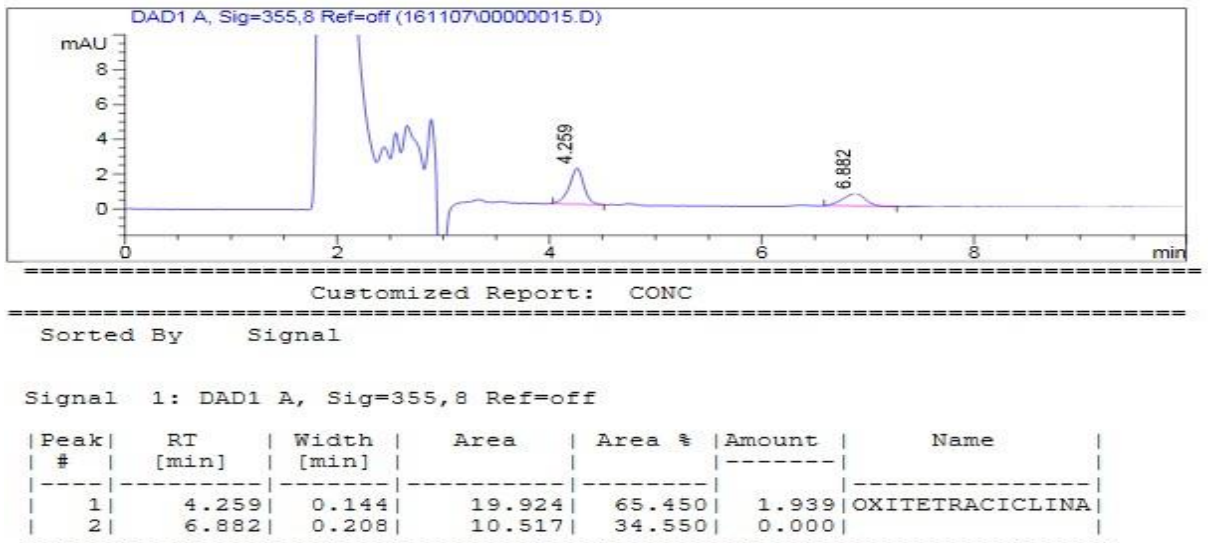


Figura 31. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2 (réplica B)

E2.C

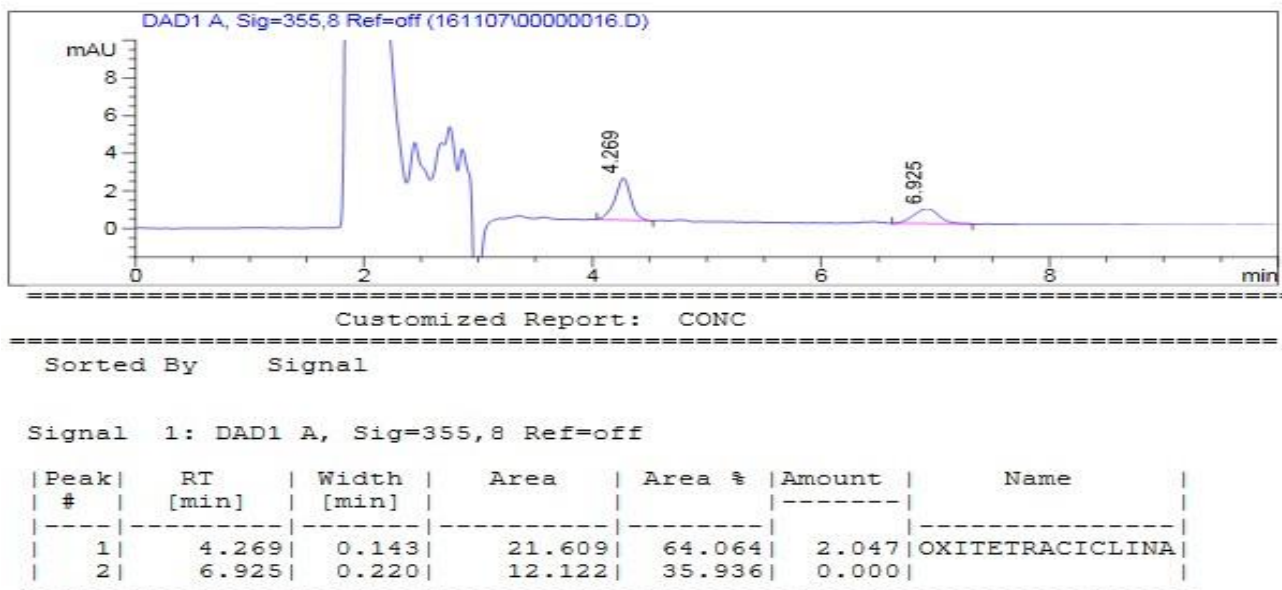


Figura 32. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2 (réplica C)

E2.D

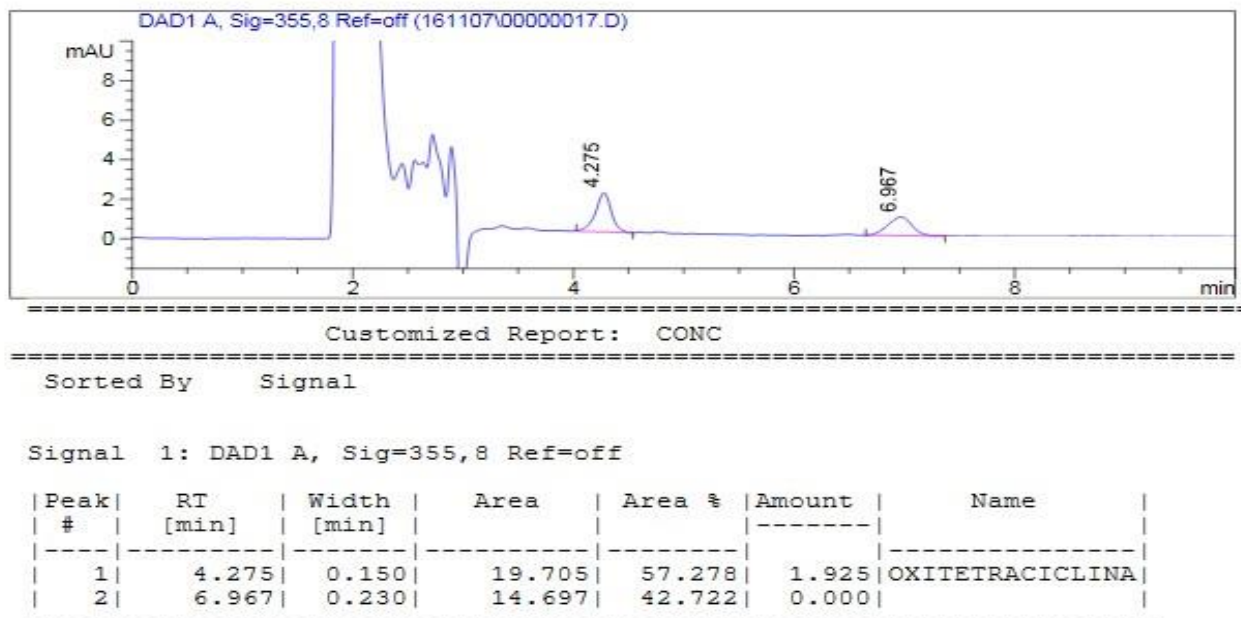


Figura 33. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 2 (réplica D)

Estación 3

E3.A

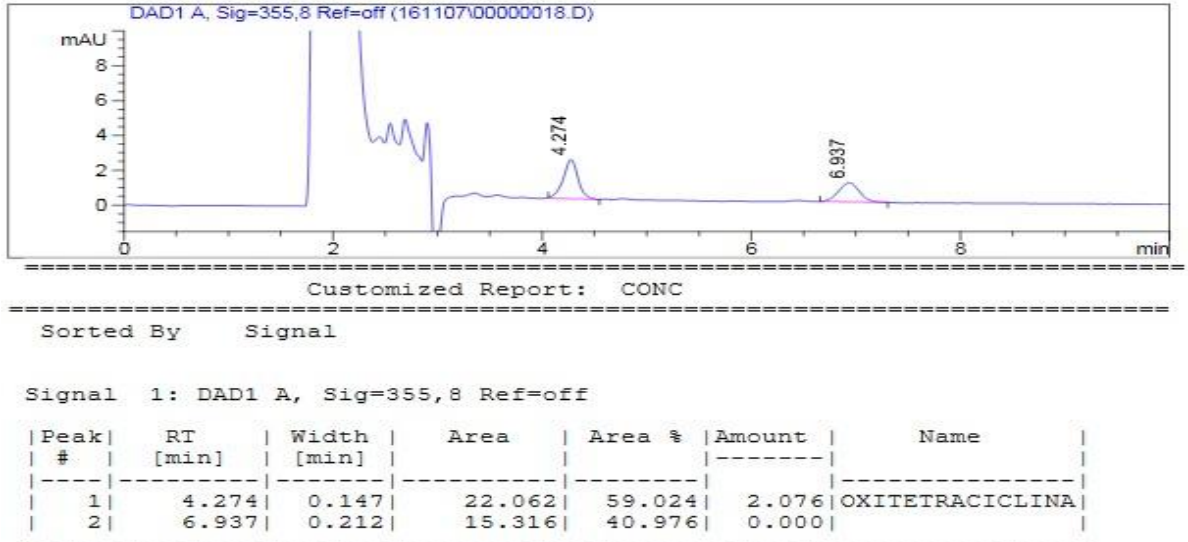


Figura 34. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3 (réplica A)

E3.B

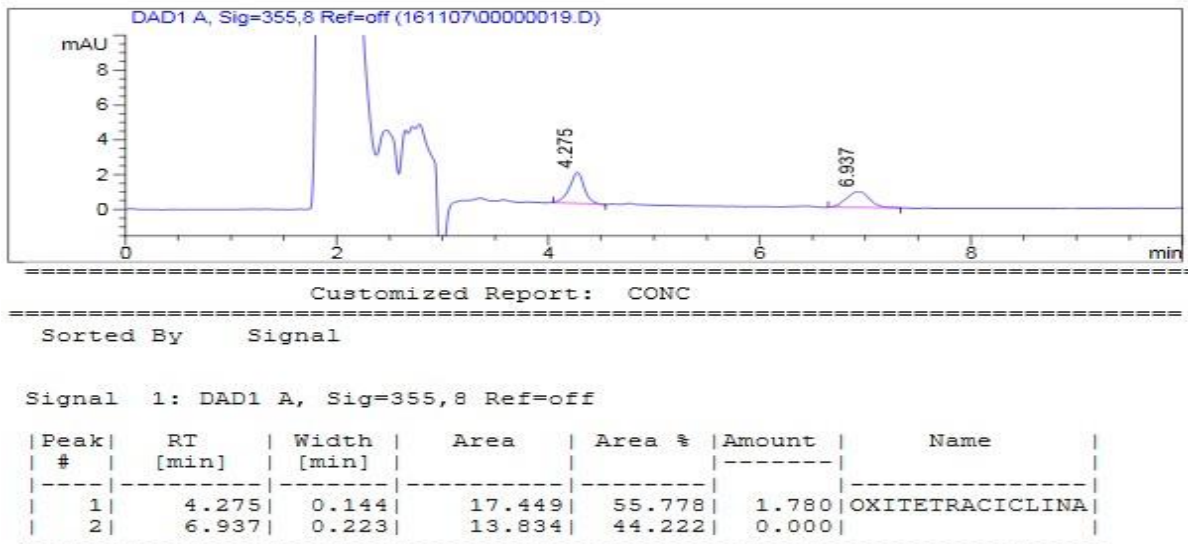


Figura 35. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3 (réplica B)

E3.C

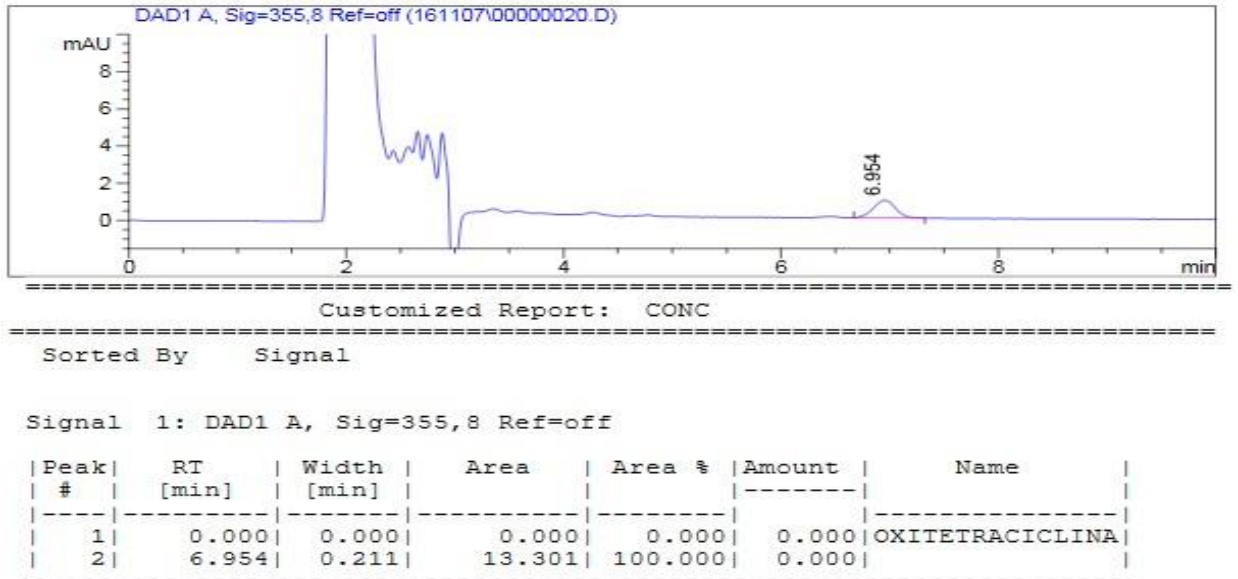


Figura 36. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3 (réplica C)

E3.D

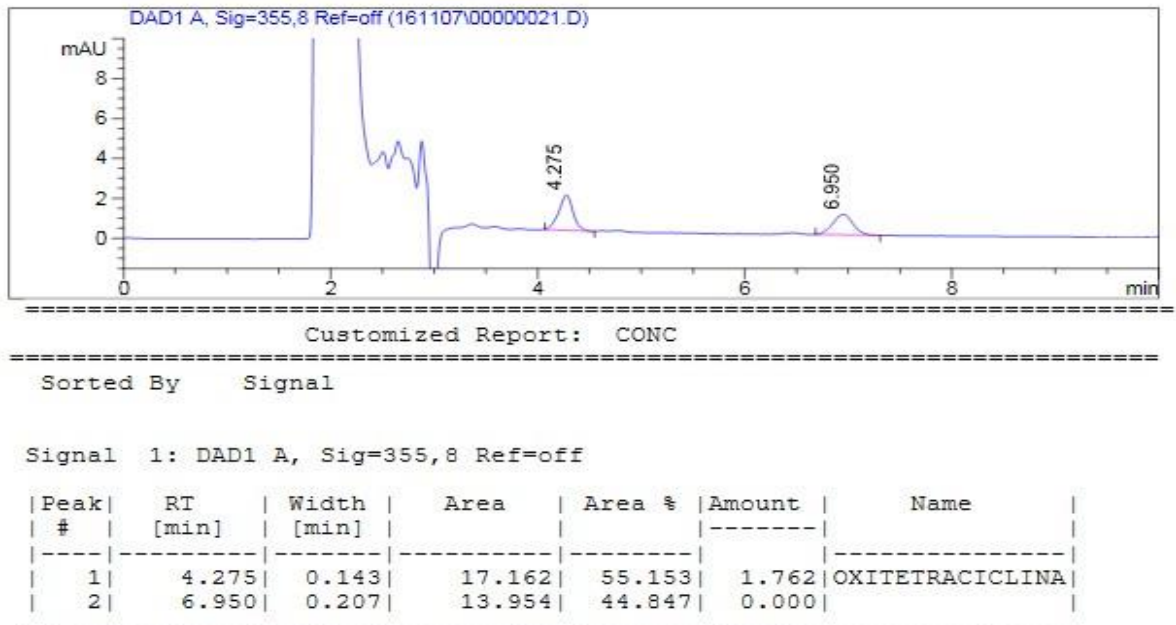


Figura 37. Espectro extracción por recuperación Oxitetraciclina estación 3 (réplica D)

Metodología extracción por recuperación

- Se tomó una muestra de aproximadamente 3 gramos de sedimento húmedo y se le agrega 600 ul de la solución 100 ppm y se deja reposar 30 min.
- Se agregó 30 mL de solución de ácido oxálico 0.1 M en metanol.
- Se agito vigorosamente en forma manual por 10 segundos y en vórtex por 30 Segundos.
- Se sonificó durante 30 minutos.
- Se centrifugo a 4000 rpm por 10 minutos.
- Con una jeringa de 5 mL, se tomó el sobrenadante y se filtró con filtro 0,22 μm , 13 mm. de diámetro, de PVDF sobre viales para HPLC, debidamente rotulado con tapa

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
concentraciones	22,06944444	5	4,413888889	1	0,46511943	3,32583453
Horas	38494,69444	2	19247,34722	4360,63247	1,9707E-15	4,10282102
Error	44,13888889	10	4,413888889			
Total	38560,90278	17				

Figura 38. Análisis de varianza 2 vias

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
concentraciones	0,002131	5	0,0004262	0,989016089	0,504687388	5,050329058
horas	0,004880333	1	0,004880333	11,32503094	0,019992618	6,607890974
Error	0,002154667	5	0,000430933			
Total	0,009166	11				

Figura 39. Análisis de varianza absorbancia *P.subcapita*.

9. REFERENCIAS

Aldermon,D.J y C.Michel .1992. Chemotherapy in Aquaculture Today .In: Chemotheraphy in Aquaculture from theory to reality. Office international des Epizooties,3-24 P.

Almanza.V, Figueroa.R, Parra.O, Fernandez.X, Baeza.C, Yañez.J, Urrutia.R; Bases limnológicas para la gestión de los lagos urbanos de Concepcion; Chile; 2016; pág. 320.

Ahumada, R.,Gerli , L., Sánchez,I. y Fernandez ,E.(en prensa) Metales trazas en aguas costeras y organismos de canales y fiordos australes. In: N. Silva. Editor.

Arche, Alfredo (1970).Sedimentología del proceso físico a la cuenca sedimentaria,(pp 171-321).España:CSIC

Adams, W.; Kierle, R. y Barnett, J. 1992. Sediment quality and aquatic life assessment. Environmental science and technology, 26: 1865-1875.

Barattini,P.(2012). Resultados Preliminares sobre el uso de lodos de Psiculturas sobre suelos Agropecuarios de origen volvanicos de la Patagonia Occidental (Aysen) , capitulo 8 : Antibióticos Agropecuarios ,61 P.

Batchelder A.R. (1981). Chlortetracycline and oxytetracycline on plant growth and development in liquid cultures. Journal of Environmental Quality 10(4): 515-518

Bielen.A, SimatoviC.A, Kosic-Vuksic.J, Senta.I, Ahel.M, Babic.A, Jurina.T, Gonzalez.J, Milankovic.M, Udikovic-KoliC.N; Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries; ELSEVIER; Water Research 126 (2017) 79e87; PAG 80

Buschman, Alejandro (2001). *Impacto ambiental e la acuicultura: El estado de la investigación en Chile y el mundo* (pp.9-11). Osorno, Chile: Universidad de Los Lagos.

Blume, L.J., B.A. Schumacher, P.W. Shaffer et al.1990. Handbook of Methods for Acid Deposition Studies Laboratory Analyses for Soil Chemistry. U.S. Environmental Protection Agency, Las Vegas, NV.

Buschman, Alejandro (2001). *Impacto ambiental e la acuicultura: El estado de la investigación en Chile y el mundo* (pp.15-19). Osorno, Chile: Universidad de Los Lagos.

Burton, G (2002), Sediment Quality Criteria in use around the world, *Limnology*, 65-75 P.

Burton, J. y Scott, K. (1992). Sediment toxicity evaluation, their niche in ecological assessment. *Environmental science and technology*, 26: 2068- 2075.

Burés S. (1997). *Sustratos*. Ediciones Agrotécnicas. Madrid. España.

Camargo J.A, Alonso.A .2007; Contaminación por Nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático; *Ecosistemas: revista científica y técnica de ecología y medio ambiente* ; Asociación Española de ecología terrestre (AEET); pag 99.Fuente: www.revistaecosistemas.net

Caccia, V.; Millero, F. y Palanques, A. 2003; The distribution of trace metals in Florida Bay sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 1420-1433.

Carlos de Liñan Carrol; *Revista Agrícola Terralia* [en línea], nº 8, [fecha de consulta 20 de febrero del 2016];fuente: www.terralia.com

Cook.A; 2014; Tesis de grado: Efecto de antibiótico utilizado en piscicultura, sobre parámetros ecotoxicológicos en piscicultura, sobre parámetros ecotoxicológicos en la macrofitas acuáticas; Universidad Austral de Chile, pag.18

Contreras,S;Miranda.C;(2011); Informe final: Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura;FIP n°2008-65; pag 24-25

Chamorro.S.; 2005; Seminario de título: Eliminación de Fitoesteroles a través de una Laguna aireada y evaluación toxicológica mediante *Daphnia magna*; Universidad de Concepción, pag.23.

De La Lanza, G. & C. Cáceres. 1994. Lagunas costeras y el litoral mexicano. Universidad Autónoma de Baja California Sur (Eds). México. 497 pp.

Dinnel,P, Strober.J,(1985), Methodology and analysis of sea urchin embryo bioassays. Fisheries Research Institute. U. Wash., Seattle, WA. Circular No. 85, 319 pp.

Elderfield, H. 1978. Chemical variability in estuaries. 171-178 pp. In: Biochemistry of estuarine sediment proceeding of a UNESCO/ SCOR Workshop, Bélgica, December, 1976. 293 pp.

Environmental Protection Agency. (1993). Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia* (*D. pulex* and *Ceriodaphnia*), 131-147.

Granados .Y , Ronco .A y Báez .M (2008) ; Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México; Ensayo de toxicidad crónica con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) por el método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer, 84 pp.

Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Silva, M.C. & Soares, M.V.M. 2000 Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 357-362.

Hustvedt, S.O., Salte, R., Kvendset, O. & V. Vassvik. (1991). Bioavailability of Oxolinic Acid in Atlantic salmon (*Salmon Salar L.*) from medicated food. *Aquaculture*. 97:305-310.P

Izquierdo C, Usero J & Gracia I (1997) Speciation of heavy metals in sediments from Salt Marshes on the Southern Atlantic coast of Spain. *Mar. Pollut. Bull*, 34 (2): 123-128.

Iannacone, J. & Alvarino, L. 2007 Ecotoxicidad acuática de dos colorantes y de tres antiparasitarios de importancia en acuicultura en *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, 6: 101-110.

Iannacone, J.; Alvarino, L.; Soto, J.C. & Salcedo, C. 2007 a Efecto toxicológico del "Sachayoco", *Paullinia clavifera* (Sapindaceae) sobre *Daphnia magna* y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2: 15-25.

Iannacone, J. & Alvarino, L. 2009 Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, 8: 71-80.

Kallquist, T.; Grung, M. & Tollefsen, K.E. 2006 Chronic toxic of 2,4,2', 4'-Tetrabromodiphenil ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1657-1662.

Kobraei, M.E., White, D.E. (1996). Effects of 2,4-Dichloroheoxyacetic acid on Kentucky algae, simultaneous laboratory and field toxicity testings. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 571e580.

Lunestad, B.T. 1992. Fate and effects of antimicrobial agents in aquatic environments. Pages 152-161 In: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Libes, S. 1992. An introduction to Marine Biogeochemistry. John Wiley & Sons.752 pág.

Maleki, A.; Mahvi, A.H.; Mesdaghinia, A. & Naddafi, K. 2007, Degradation and toxicity reduction of phenol by ultrasound waves. Bulletin of the Chemical Society of Etiopia, 21: 33-38

Mladinic.P, Hrepic.N, Quintana.E; Caracterización física y química de las aguas de los lagos Chungará y Cotacotan; Arch. Biol. Med. Exp. 20: 89-94 (1987); pag 93

Mitdtvedt, T. & e.Lingaes.(1992). Putative public health risks of antibiotic resistance development in aquatic bacteria.

Municipalidad de Tucapel, Actualización plan de Desarrollo Comunal de Tucapel (2010-2014), 19 pp.

Nelson, D.E. and L.E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Methods of Soil Analysis, Inc. Madison, WI

NCh 2083 (1999). Aguas-Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Norma Chilena Oficial NCh 2083.Of1999. Instituto Chileno de Normalización, INN, Santiago de Chile, 19 pp.

NCh 2706 (2002). Calidad de agua-Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Seleastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*). Norma Chilena Oficial NCh 2706.Of2002. Instituto Chileno de Normalización, INN, Santiago de Chile, 28 pp.

Leticia Pelus, Pablo Almada, Mariana Abelando, Alicia E Ronco;2012; Evaluación de la toxicidad de sedimentos de los ríos Paraguay-Paraná utilizando *Hyalella curvispina* ,7^{mo} Congreso de Medio Ambiente ,Argentina, pag 4.

Pentreath, V, González,E., Barquín,M., Maris,S y Perales,S.(2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. Rev. salud ambient 2015;15(1):4-12.

Persoone, G.; Baudo, R.; Cotman, M.; Blaise, C.; Thompson, K.Cl.; Moreira-Santos, M.; Vollat, B.; Törökne, A. & Han, T. 2009 Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test- Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 393: 1-29.

Prescott J.F., Baggot J.D. (1991). Tetraciclinas. En: Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria. Prescott, J.F. & Baggott J.D. (Eds.), Acribia, Zaragoza, pp. 225-239.

Ramirez.R,P.,Mendoza.C,A., (2008) Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México.Mexico,(pp.371-372) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.

Reynaldi, S.; Duquesne, S.; Jung, K. & Liess, M. 2006. Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. Environmental Toxicology and Chemistry, 25: 1831-1835

Revista Aqua (2013); Piscicultura comercial más antigua de Chile cumple 60 años. 15 de Noviembre del 2013.

Redfield, A.C. et al (1963) The influence of organisms on the composition of sea water. In: Hill, M.N., ed. The Sea. Wiley, NY, pp: 26-77.

Redfield AC (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am. Sci.* 46: 206-221.

Rehbein, N. (2011). Propuesta de metodología para la estimación del impacto económico de la contaminación del fondo marino por la emisión de alimento y heces de la salmonicultura. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil, Universidad Austral de Chile, Puerto Montt, Chile.

Rivas.Z. , Sanchez.J. , Troncone. F. ,Marquez. R. , Ledo de Medina, Colina. M. , Gutierrez. E. , 2009 ; Nitrógeno y Fósforo totales de los ríos tributarios al sistema lago fr Maracaibo ; Venezuela.

Roldan.G. , Ramirez.J., (2008), Fundamentos de limnología neo tropical, editorial Universidad de Antioquia ,2nda edicon -205 pp.

Rudolph,A. , Medina,P., Urrutia,C., Moscoso ,J. , Ahumanda,R. , Calidad Toxicológica de los sedimentos de mar interiores de Chiloé , Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción -243.

Ruiz .M , Granero.M, Rodriguez.M, Bustamante.M, Ruibal.A, (2005), Importancia de los sedimentos como fuente interna del Fósforo en el embalase San Roque (Cordoba): Determinación de una metodología para su estudio. XX Congreso nacional del agua y III simposio de recursos hídricos del cono sur, Mendoza.

Sánchez-Ortíz, J.R.; Sarma, S.S.S. & Nandini, S. 2010. Comparative population growth of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 45: 37-41.

Samuelsen, O.B. 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizootics, Paris.

Sancha .A,(2005) ,Criterios de calidad de aguas o efluentes tratados para uso en riego: Informe final, Universidad de Chile .

Suárez,M. ,Marcano,A. ,Ramírez,A. ,Segura.Y. ,Parra,M. , Distribución espacial de fósforo en sedimentos superficiales del Lago de Valencia, Universidad, Ciencia y Tecnología , Volumen 17, N° 66, marzo 2013

Stanley E. Manahan, 2007, *Introducción a la Química Ambiental*, pág. 159.

US EPA (1993). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Weber, C.I. (ed.). Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-90/027F.

US EPA (2002). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Fifth Edition. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460. EPA-821-R-02-012.

UNGEMACH, H. 1960. *Sedimentchemismus und seine Beziehungen zum Stoffhaushalt in 40 Europäischen Seen*. Universität Kiel, Kiel. Pags. 129-138 en:

Esteves, F. 1983. Levels of phosphate, calcium, magnesium and organic matter in

the sediments of some brazilian reservoirs and implications for the metabolism of the ecoystems. Archiv für Hydrobiologie 96.

Verma, Y. 2008. Acute toxiciy assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using Daphnia magna bioassay. Toxicology and Industrial Health, 24: 491-500.

Valencia.S, 2005; Ciclos del Nitrogeno ; cap.5.51
Fuente:www.mardechile.cl

Walker, C.,Hopkin ,S., Sidly, R. y Peakall ,D., 2006, Principle of ecotoxicology taglos y francias ,315 p.

Wetzel R (1981) *Limnología*. Omega. Barcelona, España. 679 pp.

Willard, H., Merrit, L., Dean, J. (1974). Instrumental Methods of analysis., Fourth edition., Ed. D. Van Nostrand Company., Inc., N. Y.