

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE AGUAS SUPERFICIALES
DEL RÍO ACONCAGUA SOBRE LA MICROALGA *Selenastrum
capricornutum* EN UN SECTOR DE ACTIVIDAD MINERA**

Tesis para optar al Título de Ingeniero Ambiental

**Tesista: MARÍA GABRIELA CIENFUEGOS GONZÁLEZ
Profesor Guía: Dr. HERNÁN GAETE OLIVARES**

VALPARAÍSO, Julio 2005.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIALES Y MÉTODO.....	12
1. Muestreo.....	12
2. Bioensayo.....	17
3. Análisis químico.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
1. Caracterización Físico – Química.....	20
2. Análisis de Metales.....	23
3. Bioensayos.....	27
4. Toxicidad de cobre.....	32
CONCLUSIONES.....	35
AGRADECIMIENTOS	36
REFERENCIAS.....	37

RESUMEN

Los estudios de calidad de aguas se han desarrollado históricamente por métodos analíticos, faltando información respecto a los efectos que los tóxicos tienen sobre los organismos. Entorno al río Aconcagua se desarrollan las principales actividades económicas de la cuenca, entre ellas la minería, lo que supone un aporte de metales pesados que podría otorgar características de toxicidad al río.

Se realizó un estudio ecotoxicológico de las aguas del río Aconcagua en un sector de actividad minera. Las muestras de agua fueron recolectadas en época de bajo caudal, en Noviembre de 2004 en 7 puntos de muestreo. La toxicidad de las muestras ambientales fue evaluada a través de bioensayos con la microalga de agua dulce *Selenastrum capricornutum* y conjuntamente se analizaron los niveles de molibdeno, zinc, cobre total, cobre disuelto además de Cu^{2+} . Los parámetros físico – químicos fueron determinados *in situ*.

Los resultados muestran valores bajo la normativa para calidad de agua según diferentes usos en la gran mayoría de los parámetros medidos, superándose la norma en la Estación 3 para conductividad, cobre y molibdeno. Se obtuvo una alta correlación entre los valores de SDT, conductividad y cobre disuelto, así como también entre cobre disuelto y Cu(II) . Los resultados del bioensayo mostraron valores críticos en los sectores de mayor actividad antrópica, registrándose una relación inversa entre los niveles de Cu(II) y la tasa de crecimiento de *S. capricornutum*.

Los niveles de cobre determinados y su distribución espacial sugieren que la actividad minera hasta antes de Planta Molibdeno no representa una clara influencia en la tasa de crecimiento de *Selenastrum capricornutum* ni es causante de las concentraciones de cobre en esa zona, sin embargo los niveles de cobre determinados en este punto son atribuibles a la descarga de la Planta señalada.

INTRODUCCIÓN

Existe un creciente interés por estudiar el efecto tóxico de los metales pesados sobre los organismos acuáticos, debido al aumento de actividades económicas, tales como la minería, la industria y la metalurgia, que generan este tipo de residuos y descargan sus efluentes sobre los cuerpos de agua.

Los primeros monitoreos en ríos destinados a conocer la calidad del recurso hídrico, principalmente para su uso en riego, comenzaron en el año 1968. En 1982 se establecieron claramente los puntos de muestreo, frecuencia y parámetros que se estudian hasta la actualidad en Chile [43].

En el año 1990 se realizó una evaluación del estado de las aguas del río Aconcagua, centrado en la contaminación de origen minero. En él se analizaron diferentes parámetros físico – químicos, observándose un aumento en los niveles de pH y cobre total entre los años 1970 y 1990, atribuible a los relaves de División Andina de Codelco – Chile [33]. Cabe señalar que este estudio se realizó antes de que Chile tuviera una normativa ambiental organizada, como es la Ley N°19.300, de Bases Generales sobre el Medio Ambiente.

Actualmente en Chile la normativa que establece los parámetros de calidad y emisión relativo a cuerpos de aguas superficiales es la siguiente:

- DS N°90/2000 [14]. Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales. Publicada en el Diario Oficial el 7 de Marzo de 2001.
- NCh 1333. Of1978 modificada en 1987 [12]. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos.

La normativa señalada en el párrafo anterior regula, entre otros parámetros, las concentraciones de metales pesados máximas en efluentes o en cuerpos de agua receptores, sin embargo, dichas concentraciones no aseguran la protección de los

organismos, dado que el impacto que los niveles de metales pesados tendrán sobre el sistema natural, dependerá de la forma en que actúen estos tóxicos.

La importancia que los metales pesados representan en los sistemas naturales se debe principalmente a su persistencia en el ambiente y a su capacidad de bioacumulación, generando efectos tóxicos sobre los organismos que no sólo dependen de su concentración, si no también de la forma química en que se presenten [34], es decir, de su especiación, afectando la biodisponibilidad y así la ecotoxicidad de las especies de cobre [1, 27].

La biodisponibilidad se define como la fracción del metal total que está disponible para ejercer acción y efecto sobre el organismo receptor, y resulta importante señalar que no todas las formas químicas de cobre se encuentran biodisponibles. La biodisponibilidad está determinada, entre otros factores, por el pH, el carbono orgánico disuelto, la temperatura, los ligandos inorgánicos, material suspendido, óxidos inorgánicos y la solubilidad acuosa. Estos factores necesariamente deben ser considerados si se desea realizar una evaluación de riesgo referida a metales, ya que serán claves para conocer y estimar la exposición de los organismos [1].

Entre los metales pesados de mayor interés en Chile se encuentra el cobre, dada la importancia de su extracción y refinación en el país. Este metal produce daños severos en la morfología de las células vegetales, debilitando la membrana plasmática al adsorberse a la pared celular. De esta manera, la toxicidad del metal se relacionaría también con la superficie de contacto que tiene la célula para unirse al metal, estableciéndose relaciones entre tamaño celular y tolerancia al tóxico [45].

La toxicidad del cobre puede ser influenciada por factores físico – químicos, como son el pH, dureza, temperatura y sulfuros, entre otros [1, 36]. Se han realizado estudios de toxicidad del cobre sobre microalgas, que describen un rol fotoprotector hacia los organismos del carbono orgánico disuelto (COD), limitando la exposición de dichos organismos a la radiación ultra violeta y disminuyendo con ello la toxicidad del cobre [44]. El ciclo diurno de la respiración y metabolismo de

comunidades de algas ha mostrado en algunos sistemas de agua dulce el potencial de alterar la toxicidad del Cu en el transcurso del día, provocando considerables oscilaciones en la actividad iónica y toxicidad del cobre [36].

La especie más ampliamente biodisponible del cobre suele atribuirse a las formas *lábil*es, que incluye los iones cúpricos libres (Cu^{2+} o Cu(II)) y los complejos inorgánicos fácilmente dissociables e intercambiables, la forma química de cobre más disponible es el ión de cobre libre hidratado, $\text{Cu(H}_2\text{O)}_6^{2+}$ [27]. Sin embargo, estudios señalan que el cambio en la concentración de Cu^{2+} y así la proporción de Cu en forma biodisponible no cambia significativamente la concentración efectiva que ocasiona la disminución del 50% de la población de la especie de prueba (CE_{50}) en términos de Cu disuelto total [44].

En aguas naturales, se asume que generalmente el cobre divalente es el estado de oxidación predominante de cobre. Muchos estudios tratan sobre la especiación de Cu(II) , y se ha establecido que más del 90% de Cu(II) está complejado por ligandos orgánicos [7].

El estudio de los diversos tipos de contaminantes descargados en cursos de agua ha sido históricamente realizado utilizando determinaciones analíticas [32]. Posteriormente se han desarrollado métodos conocidos como ensayos de toxicidad, dado que los análisis químicos presentan dificultades para evaluar apropiadamente el peligro asociado a determinadas actividades, al no dar cuenta de la biodisponibilidad o de varias interacciones químicas complejas [18]. Así, los ensayos de toxicidad han sido desarrollados para saber el daño potencial a la biota causado por tóxicos individuales o mezclas complejas en efluentes [37], resultando una herramienta efectiva en la evaluación del efecto de los agentes químicos tanto en forma individual como de mezclas complejas [22].

Además de las dificultades que presenta el límite de detección de la instrumentación en química analítica, las técnicas químicas son incapaces de predecir los efectos perjudiciales que algunos contaminantes pueden tener sobre ecosistemas por causa de varios parámetros de calidad ambiental, incluida la

temperatura, dureza del agua y pH. Además, muchos tóxicos pueden actuar de diferente manera en combinación con otros respecto a lo que harían individualmente. Las pruebas químicas por sí solas no pueden predecir el impacto de mezclas de contaminantes sobre los componentes bióticos del ambiente [32].

Los ensayos de toxicidad pueden realizarse sobre especies representantes de diferentes niveles tróficos, tales como bacterias, microalgas, microcrustáceos y peces. La mayoría de los métodos de prueba de fitotoxicidad estandarizados actuales han sido desarrollados desde la década de 1960 por las agencias internacionales de estandarización como la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD), Organización Internacional de Estandarización (ISO), Comunidad Económica Europea (CEE) y la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), durante los estudios realizados, se ha comparado la sensibilidad de diferentes plantas y animales, encontrándose ser específicos para cada químico y especie [31].

Entre los ensayos de toxicidad se encuentran aquellos que se realizan a pequeña escala, también llamados microbioensayos, ensayos a microescala, microensayos o bioensayos de segunda generación, que fueron definidos como “la exposición de un organismo unicelular o pequeño unicelular a una muestra líquida en orden de medir un efecto específico” [2].

Los procedimientos que involucran indicadores como bacterias, protozoarios, microalgas y microinvertebrados comenzaron a aparecer en la década de 1970 [3]. En 1992 se publicó en Canadá el bioensayo de inhibición de crecimiento usando el alga de agua dulce *Selenastrum capricornutum* [4], el cual fue normalizado en Chile por el INN¹ y publicado en el año 2002 [13].

Estudios realizados con el alga verde *Scenedesmus subspicatus* señalan que la correlación entre inhibición de crecimiento en microalgas y la concentración de

¹ Instituto Nacional de Normalización

cobre total y disuelto en el agua es significativa, siendo la concentración de Cu una herramienta aproximadamente buena en la predicción de toxicidad en algas de agua dulce en presencia de ligandos orgánicos [34].

La toxicidad del cobre en microalgas, considerando su concentración total, está condicionada y varía de acuerdo a la concentración de la materia orgánica disuelta en el ambiente acuático [34]

Si bien el uso de bioensayos resulta útil para evaluar el efecto de los tóxicos sobre el ambiente, existe discrepancia entre los investigadores respecto de la validez o utilidad de los bioensayos estáticos con cultivos unialgales. Quienes están a favor de ellos, señalan que son útiles para establecer concentraciones tolerables en el medio natural y que la selección de microalgas debe restringirse a las especies más sensibles y dentro de ellas, a aquellas que puedan ser mantenidas fácilmente bajo condiciones de laboratorio estándares [15]. A mayor estandarización y uso de especies seleccionadas, mayor es la reproducibilidad en los resultados [35]. Otros cuestionan su utilidad por su limitada relevancia ecológica [8, 23]. Esta limitación puede compensarse con el uso de indicadores bioquímicos del crecimiento en el diseño de nuevos métodos para bioensayos con mayor validación ecológica, ya que la mayoría de las algas expuestas a cambios ambientales experimentan variaciones en su composición macromolecular mediante ajustes metabólicos que les permiten mantener la tasa de crecimiento intrínseca [15].

La norma chilena NCh2706 señala que los valores de CE_{50} , $NOEC^2$ y $LOEC^3$ dan una indicación de riesgo potencial, pero no pueden ser usados directamente para predecir efectos en el ambiente natural [13], sin embargo, este procedimiento significa un aporte a las evaluaciones de riesgo ambiental, debido a que, en

² Mayor concentración ensayada a la cual estadísticamente no hay reducción o inhibición significativa del crecimiento o de la tasa de crecimiento respecto a los controles [13]

³ Menor concentración ensayada, a la cual estadísticamente hay inhibición significativa del crecimiento o de la tasa de crecimiento, respecto a los controles [13].

conjunto con bioensayos en otros niveles tróficos y análisis químicos entregan un mejor conocimiento de las condiciones a las que los ecosistemas se encuentran expuestos y los efectos que estas condiciones producen en el medio.

Para lograr un mejor conocimiento del efecto de los ecosistemas sobre los organismos expuestos debe otorgarse especial cuidado en la selección de organismos sensibles a los tóxicos para ser usados en los ensayos de toxicidad. Una buena selección debería asegurar una mayor protección de la biodiversidad en ecosistemas acuáticos [37].

En los ensayos de toxicidad sobre microalgas, sólo una o dos especies de algas verdes son usadas comúnmente, éstas son *S. capricornutum* y *Scenedesmus sp.* En Canadá, la mayor parte de publicaciones de bioensayos con microalgas desde un comienzo se desarrollaron con *S. capricornutum* [5]. Especies de algas verde azuladas y diatomeas no son frecuentemente usadas debido a su lento crecimiento y requerimientos de cultivo. En un estudio que utilizó 27 pesticidas, *Navicula pelliculosa* fue generalmente la menos sensible de las especies y *S. capricornutum* la más sensible [32].

Algunos autores señalan la conveniencia de usar un grupo de especies que representen diferentes grupos funcionales [31], sin embargo, en la práctica esto puede resultar difícil de realizar y suele ser más conveniente elegir las especies disponibles, que son principalmente “buenos organismos de laboratorio” [15], en los que deben primar, por ejemplo, las ventajas relativas a su cultivo, crecimiento y manipulación, sobre aquellas relacionadas con su sensibilidad y abundancia en la naturaleza [38].

Las especies de la división Chlorophyta satisfacen los requisitos anteriormente mencionados y están además, mejor representadas en ambientes dulceacuícolas. De este grupo, *Selenastrum capricornutum* ha sido la especie de uso preferencial en bioensayos de rutina [15]. En ensayos de toxicidad con cobre, se ha registrado una EC_{50} de 0,11 mgCu/L, con un rango de referencia entre 0,2 – 0,94 mgCu/L

[26] y porcentajes de inhibición de crecimiento de 57%, 72% y 99% para valores de 10.5; 40.6; y 156.1 [Cu] total(μM) [34].

Algunas especies tienen la capacidad de disminuir la toxicidad de metales pesados, adsorbiendo los tóxicos a su pared celular, es el caso de *Scenedesmus subspicatus* [34], la tolerancia a metales está dada por su capacidad de bioacumularlos [45].

Las células más pequeñas tienen relativamente mayor área superficial y por lo tanto mayor sitio para la unión de metales que las células de mayor tamaño, luego la acumulación de Cu en células de menor tamaño es generalmente mayor que en las células más grandes [29, 45].

Un bioensayo algal, complementado con un análisis químico, es una herramienta efectiva para el mejor entendimiento de los impactos ecológicos de las descargas de efluentes industriales y mineros, entre otros, en cuerpos de agua receptores [39, 37], resultando de esta manera los microbioensayos muy útiles y prácticos como herramientas de diagnóstico ambiental para la ecotoxicología [3]. Así, el bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Selenastrum capricornutum* puede utilizarse para evaluar el efecto de [13]:

1. Efluentes industriales o efluentes de aguas servidas, tratados o no tratados, después de decantación, o filtración si es necesario;
2. Sustancias químicas solubles en las condiciones del bioensayo;
3. Sustancias químicas insolubles o de baja solubilidad en agua, las que mediante el uso de un cosolvente, permiten la aplicabilidad del bioensayo en las condiciones descritas;
4. Aguas continentales superficiales o subterráneas.

En todos estos medios se puede utilizar el bioensayo de inhibición de crecimiento, con el alcance de evaluar el riesgo potencial que el medio estudiado presenta sobre el nivel trófico analizado en el bioensayo.

Teniendo en cuenta que los bioensayos de inhibición de crecimiento pueden utilizarse para evaluar aguas continentales superficiales [13], resulta de interés aplicarlos para conocer el estado de los cuerpos de agua en Chile, como es el río Aconcagua, dado que uno de los usos consuntivos más importantes en el país es el riego, siendo también el uso principal de este río. En esta cuenca, la infraestructura hidráulica para el sector agrícola tiene capacidad para satisfacer las demandas de aproximadamente 61.000 ha, las cuales se abastecen de una red de 186 canales. De éstos, 69 captan recursos del río Aconcagua, 37 son canales pequeños del valle del río Putaendo y 80 captan sus aguas de esteros de subcuencas laterales [10].

Otro tipo de actividad realizada en el río Aconcagua es la minería. El sector minero metálico más importante de la V Región de Valparaíso es la explotación de cobre fino. CODELCO Andina cuenta con el mayor yacimiento de la región, ubicado en la Cordillera de Los Andes a 3.800 metros de altura, en la provincia de Los Andes, donde se localizan las minas Andina y Sur - Sur. La producción de estas mineras se procesa en Ventanas, y se exporta en forma de concentrado de cobre [17]. La producción de cobre y molibdeno el año 2004 fue de 239.862 y 2.980 toneladas métricas finas respectivamente en División Andina [16].

La Cuenca del río Aconcagua es uno de los principales ecosistemas dulceacuícolas del país [43], siendo el río Aconcagua, con una longitud de 142 km y un caudal medio de 24,7 m³/s su cauce natural más importante. Dicho río nace en la cordillera de Los Andes de la unión de los ríos Juncal y Blanco. Su régimen es mixto; presentando crecidas importantes con las lluvias en invierno, y en primavera y principios de verano, con el deshielo. Los ríos tributarios de alta cordillera, Juncal, Blanco y Putaendo, obedecen a un régimen principalmente nival; en cambio, los de la cuenca baja son típicamente pluviales [24].

El río Aconcagua presenta generalmente sus mayores caudales en verano, producto de los deshielos, especialmente en el curso superior; sin embargo, las crecidas extraordinarias más importantes han tenido origen pluvial y se han originado como producto de lluvias con línea de nieve alta [24].

La DGA⁴ en un estudio exploratorio evaluó el grado y tipo de contaminación por cuencas en los años 1989 y 1991, calificando en la cuenca del río Aconcagua en Chacabuquito el grado de contaminación a la fecha como *media*, con un grado potencial *alto*. El tipo de contaminación, tanto actual (a esa fecha) como potencial fue de carácter química, física y bacteriológica [43].

Al año 2000, mediciones realizadas en Los Andes indicaron excedencias a la NCh 1333 para cobre en 2 ocasiones [40], lo que no se repitió en las siguientes fechas de muestreo.

Los estudios mencionados anteriormente han considerado mediciones de parámetros y concentraciones de sustancias tóxicas principalmente, siendo necesario conocer el impacto de estos parámetros sobre el sistema.

La presencia de actividad minera en la cuenca del río Aconcagua sugiere que se podría estar confiriendo características de toxicidad a las aguas superficiales de la cuenca debido a la presencia de metales pesados. Esto plantea la necesidad de evaluar los efectos que las actividades desarrolladas en torno al río Aconcagua tienen sobre la biota. Para esto resulta una buena herramienta la utilización de bioensayos de inhibición de crecimiento con la microalga *Selenastrum capricornutum*.

Se plantea como hipótesis que debido a que los metales pesados pueden estar presentes en diferentes fracciones, se esperaría que el crecimiento microalgal se correlacione inversamente con las concentraciones de Cu^{+2} correspondiente a la fracción biodisponible y potencialmente más tóxica de cobre.

En este estudio se planteó como objetivo general determinar la relación entre cobre y toxicidad en una zona de actividad minera en la Cuenca del río Aconcagua, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos:

⁴ Dirección General de Aguas

- 1.- Caracterizar físico – químicamente las aguas superficiales en una zona de actividad minera en la Cuenca del río Aconcagua.
- 2.- Determinar las concentraciones de cobre disuelto, biodisponible (Cu^{2+}), cobre total, molibdeno y zinc en las aguas superficiales afectadas por contaminación de origen minero en el río Aconcagua;
- 3.- Determinar la toxicidad de las aguas superficiales del río Aconcagua en un sector de actividad minera a nivel trófico de producción primaria a través de bioensayo de inhibición de crecimiento con la microalga de agua dulce *Selenastrum capricornutum*; y
- 4.- Establecer la relación entre los niveles de toxicidad sobre *S. capricornutum* y las concentraciones de cobre presentes en el río.

MATERIALES Y MÉTODO

1. Muestreo

Las muestras de agua fueron recolectadas en 7 puntos de muestreo a lo largo del río Aconcagua (Figura 1 — Figura 9) en Noviembre de 2004. En la Tabla 1 se entrega la localización de las estaciones de muestreo en la Cuenca del río Aconcagua.

Tabla 1. Puntos de muestreo

Estación	Coordenadas	Altura (m)
1 Juncal	S 32° 54' 07.3" W 70° 14' 20.5"	1667
2 Río Blanco aguas arriba planta Molibdeno	S 32° 55' 58.1" W 70° 16' 50.4"	1573
3 Río Blanco en descarga planta Molibdeno	S 32° 55' 30.7" W 70° 17' 17.8"	1507
4 Confluencia ríos Blanco y Juncal	S 32° 54' 35.1" W 70° 18' 6.2"	1400
5 Chacabuquito aguas abajo Río Colorado	S 32° 51' 51.8" W 70° 24' 58.9"	1066
6 Los Andes	S 32° 49' 29.3" W 70° 35' 32.6"	806
7 Catemu	S 32° 46' 46.1" W 70° 58' 32.5"	408

La selección de las estaciones de muestreo se realizó utilizando los siguientes criterios de localización:

- Estación 1: Aguas arriba de las descargas de efluentes mineros (estación control).
- Estación 2: Aguas abajo de Minera Andina, en sector de realización de piscicultura.
- Estación 3: Aguas receptoras de efluentes de Planta Molibdeno.
- Estación 4: Confluencia de los ríos Blanco y Juncal. Se esperan efectos en la toxicidad debidos a la dilución de contaminantes.
- Estación 5: Aguas abajo de río Colorado, se espera efectos del aporte de este río.
- Estación 6: Principal centro poblado de la parte alta de la cuenca. Se esperan influencias de residuos domiciliarios y descargas de las diferentes actividades desarrolladas en Los Andes.
- Estación 7: Alejada de las otras estaciones. En el sector se desarrollan actividades con productos agrícolas (descarga de materia orgánica).

Las muestras se recolectaron de acuerdo a lo señalado en la NCh411/c94, Calidad del agua – Muestreo, parte 6 [11].

La caracterización físico – química se realizó *in situ*. La determinación de pH, conductividad (C) y sólidos disueltos totales (SDT) se realizó con un equipo multiparámetro Hanna HI 98130, y la determinación de las variables oxígeno disuelto (OD), % de saturación de oxígeno (%O₂) y temperatura (T°) se realizó con un equipo LABCOR Consort C534. Los niveles de nutrientes (NO₃ – N y P) se determinaron a través de colorimetría con un equipo Orbeco – Hellige 975 MP.

Las muestras fueron transportadas a la Universidad de Valparaíso para su posterior análisis químico y realización del bioensayo de inhibición de crecimiento microalgal.

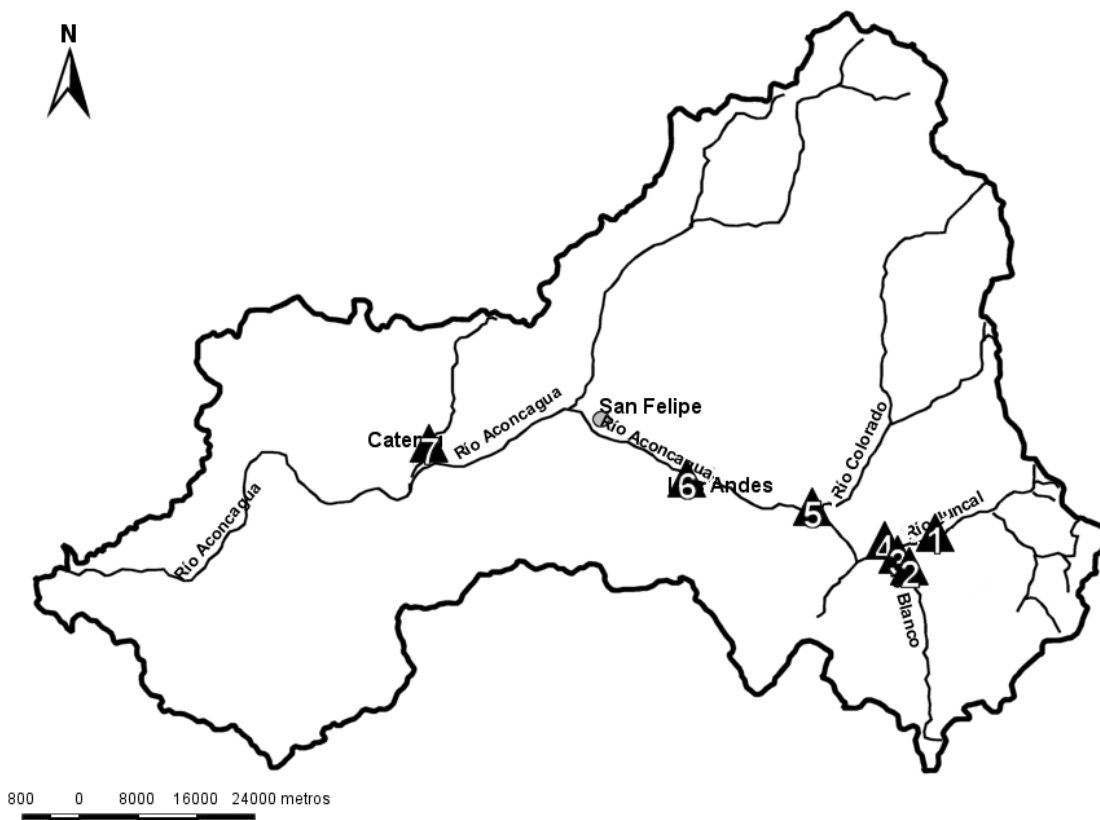


Figura 1.- Puntos de muestreo en la zona de estudio (río Aconcagua).



Figura 2. Estación 1.



Figura 3. Estación 2.



Figura 4. Estación 3.



Figura 5. Descarga RILes Planta de Molibdeno, Estación 3.



Figura 6. Estación 4.

Determinación de la toxicidad de aguas superficiales del río Aconcagua sobre la microalga *Selenastrum capricornutum* en un sector de actividad minera



Figura 7. Estación 5.



Figura 8. Estación 6.



Figura 9. Estación 7.

2. Bioensayo

Como organismo de prueba, se utilizó la microalga unicelular de agua dulce *Selenastrum capricornutum*, perteneciente al orden Chlorococcales clase Chlorophyceae, división Chlorophyta [42]. La cepa fue adquirida del Laboratorio de Ficología de la Universidad de Concepción.

S. capricornutum es recomendada para bioensayos de rutina como especie extranjera [15] y su bioensayo se encuentra normalizado en Chile.

El bioensayo fue realizado de acuerdo con el procedimiento descrito en la norma NCh2709/Of2002 [13] (véase además [25]), en matraces Erlenmeyer de 125 ml, con 4 réplicas por muestra, usando como control de laboratorio una solución compuesta por medio de cultivo más inóculo.

Las muestras fueron enriquecidas con la misma composición del medio de cultivo, de manera de no favorecer falsos negativos a causa de escasez de nutrientes. A las muestras enriquecidas con nutrientes se les denominó *tratamientos*.

La densidad celular (N) se determinó cada 24 horas por conteo directo en microscopio utilizando Cámara Neubauer de línea brillante, ajustando la N inicial a 10^5 céls/ml, que resulta adecuada para la sensibilidad de este método de conteo.

Los cultivos se mantuvieron con luz continua y agitación manual 2 veces por día. La disposición de los matraces en la cámara de cultivo fue rotatoria al azar para evitar variaciones debidas a las diferencias de luminosidad.

Una vez obtenidos los valores de N a las 96 horas, se determinaron los valores de la tasa de crecimiento k , y porcentaje de inhibición de crecimiento $\%I_k$, según se señala en la norma. Además, para la Estación 3 se realizó un bioensayo con cinco diluciones, estimándose además de los indicadores recién mencionados, el valor de IC_{50} por medio del software ICP.

La correlación entre variables se determinó por análisis de Pearson y la significancia de la diferencia entre medias se realizó mediante la prueba T de Student. Estos cálculos se realizaron a través del software Systat.

3. Análisis químico

El análisis de molibdeno y zinc fue realizado por el Laboratorio de Toxicología Humana y Ambiental en Valparaíso.

Los niveles de dureza, Cobre disuelto y Cobre particulado, fueron realizados por el Laboratorio de Química de la Universidad de Valparaíso. Los valores para cobre total corresponden a la suma de las fracciones soluble y particulado del metal.

El análisis de Cu^{2+} se realizó en el Laboratorio de Materiales de la Universidad de Valparaíso mediante el método colorimétrico de la neocuproína [41]. Para determinar los niveles de esta fracción del metal en las muestras de agua, se tomaron 5 ml de cada muestra, disponiéndolos en un embudo de decantación, se agregó 1 ml de solución de ácido ascórbico (10 g de ác. ascórbico p.a. en 100 ml de agua desionizada.), 2,5 ml de solución de acetato de sodio (66 g de acetato de sodio hidratado p.a. en 100 ml de agua desionizada) y 1 ml de solución de

neocuproína (0,1 g de neocuproína p.a. en 100 ml de etanol absoluto p.a.) y luego de agitar la mezcla eliminando los gases producidos se extrajo la fase acuosa con cloroformo p.a. El extracto se analizó en un espectrómetro a 457 nm de longitud de onda, tomando como blanco cloroformo p.a. (Merck) y posteriormente se obtuvo la concentración molar a partir de $[M] = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{m}$, donde m corresponde a $\xi = 3208,47$ que es el coeficiente de extinción molar obtenido de una curva de calibrado realizada con solución patrón de cobre (Merck). Finalmente los valores obtenidos se convirtieron a unidades de mg/L.

Los valores obtenidos para zinc, molibdeno y cobre total, se compararon con los establecidos por la NCh1333.

Al igual que para el bioensayo, la correlación entre variables se determinó por análisis de Pearson y la significancia de la diferencia entre medias se realizó mediante la prueba T de Student. Estos cálculos se realizaron a través del software Systat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización Físico – Química

En la Tabla 2 se observa que el pH fluctuó entre 8,03 (Estación 3) y 8,37 (Estación 5), siendo ligeramente alcalino y situándose dentro del rango permitido por la NCh 1333, que establece un pH comprendido entre 5,5 y 9,0. Estos valores se corresponden con los encontrados por la DGA el año 2004 [19].

La conductividad varió entre 0,14 mS/cm (Estación 5) y 1,8 mS/cm (Estación 3), siendo estos valores más bajos que los registrados en años anteriores [40, 19].

Los valores de sólidos disueltos totales se encontraron entre 0,06 $\mu\text{g/L}$ (Estación 5) y 0,9 $\mu\text{g/L}$ (Estación 3), valores similares a los registrados en mediciones anteriores realizadas en el río Aconcagua, que bordeaban los 0,4 $\mu\text{g/L}$ entre Septiembre de 1998 y Julio de 1999 [40].

Los parámetros físico – químicos medidos en los puntos de muestreo corresponden a “agua con la cual generalmente no se observarán efectos perjudiciales” tanto para riego como para vida acuática, según señala la NCh 1333. Sin embargo en la Estación 3 el valor registrado de conductividad corresponde a “agua que puede tener efectos adversos en muchos cultivos y necesita de métodos de manejo cuidadosos” ($1,50 < C \leq 3,00$ mS/cm) de acuerdo a la misma normativa. Cabe destacar que en las otras estaciones medidas, para el mismo parámetro los valores determinados corresponden a “agua con la cual generalmente no se observarán efectos perjudiciales” ($C \leq 7,50$ mS/cm).

Los valores más altos de SDT y conductividad se registraron en la Estación 3 (0,9 $\mu\text{g/L}$ y 1,8 mS/cm respectivamente), lo que podría deberse a que esta estación de muestreo se encuentra aguas abajo de una descarga de un efluente. La Figura 10 sugiere con el color de las rocas presentes un aporte importante de

Tabla 2. Caracterización físico - química de la zona de muestreo.

Parámetro	Estación de muestreo							NCh 1333	Años anteriores
	1	2	3	4	5	6	7		
Sólidos Disueltos Totales ($\mu\text{g/L}$)	0,16	0,09	0,9	0,14	0,06	0,14	0,27	< 500000 a 105°C (a),(b)	0,4 [40]
Conductividad (mS/cm)	0,32	0,19	1,8	0,29	0,14	0,26	0,53	$\leq 7,50$ (a),(b)	0,38 – 0,88 [19]
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	8,8	10,7	13,9	13,5	15,5	13,0	18,9	V.N. + 3 (c),(d)	1,0 – 29,0 [19]
Oxígeno Disuelto (mg/L)	11,1	10,4	9,5	10,1	8,8	7,3	8,8	>5,0 (c)	9,0 – 10,0 [19]
% Saturación de Oxígeno	102	97	96,5	96,5	92,5	75	99	No tiene	Sin registro
pH	8,35	8,34	8,03	8,26	8,37	8,06	8,08	5,50 – 9,00 (a)	7,7 – 8,2 [19]
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	0,14	0,11	0,05	0,28	0,09	0,18	4,00	(e)	1,58 [43]
P (mg/L)	4,49	33,17	26,80	28,22	64,68	170,61	366,3	(e)	Sin registro
Dureza ($\text{mgCaCO}_3\text{/L}$)	325	188	361	184	125	264	526	>20,0 (b)	Sin registro
Cu disuelto ($\mu\text{g/L}$)	12,4	19,3	251,0	28,2	8,43	12,8	1,91	No tiene	Sin registro
Cu particulado ($\mu\text{g/L}$)	36,6	28,9	115,0	49,3	30,6	1445,0	21,8	No tiene	Sin registro
Cu total ($\mu\text{g/L}$)	49,0	48,2	366,0	77,5	39,03	1457,8	23,7	200,0 (a)	20 – 3.380 [19]
Cu^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	40,0	40,0	198,0	40,0	40,0	79,0	<2,5	No tiene (a)	Sin registro
Mo ($\mu\text{g/L}$)	<3,0	4,0	172,0	010,0	4,0	4,0	<3,0	10,0 (a)	10,0 – 170,0 [19]
Zn ($\mu\text{g/L}$)	14,0	<7,0	<7,0	<7,0	8,0	83,0	<7,0	2000,0 (a)	<10,0 – 130,0 [19]

(a) NCh 1333 para aguas destinadas a regadío

(b) NCh 1333 para aguas destinadas a vida acuática (aguas dulces)

(c) Rango “Agua con la cual generalmente no se observarán efectos perjudiciales”

(d) V.N.: Valor natural

(e) La autoridad competente se debe pronunciar en cada caso específico

metales (tal como se verá más adelante en el análisis de metales), aumentando con ello la cantidad de iones y sólidos presentes en el agua.

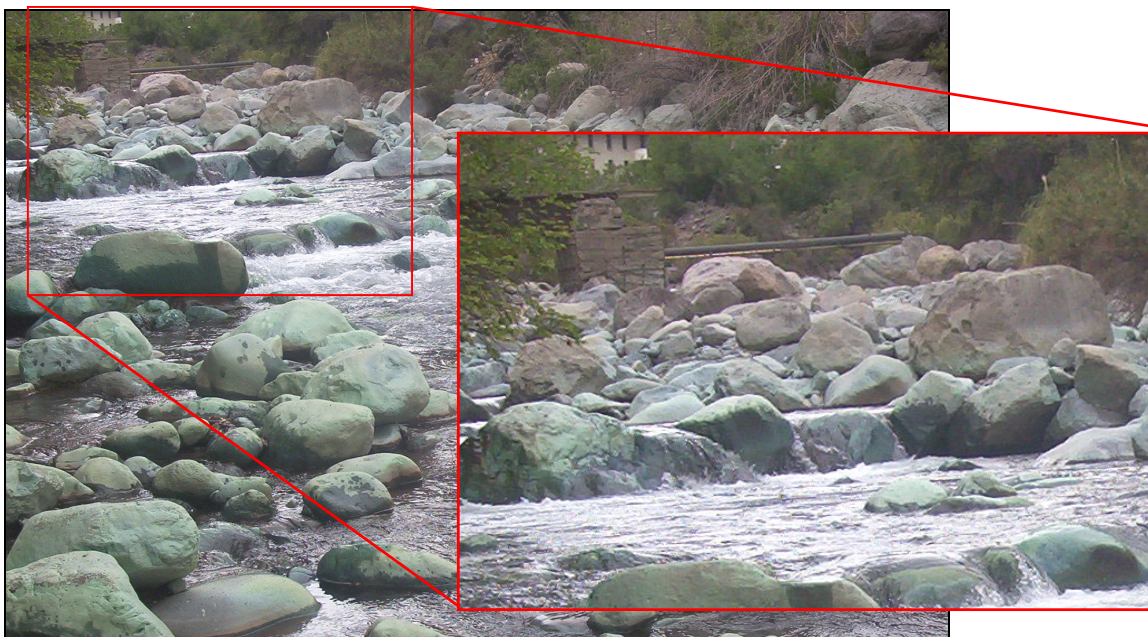


Figura 10. Estación de muestreo 3. Se aprecia en el detalle la diferencia de color de las rocas por las que circula el agua respecto a las que no están expuestas al caudal.

Las concentraciones de nitrógeno presente en nitratos ($\text{NO}_3\text{-N}$) son similares a lo largo de la zona de estudio, registrándose el valor más bajo en la Estación 3 (0,05 mg/L) y su máximo en la Estación 7 (4,00 mg/L), donde se alcanza un valor mayor a 6 veces la media entre los puntos de muestreo. En la Figura 11 se observa una alta densidad de vegetación acuática en esta estación de muestreo, que podría deberse al alto valor de $\text{NO}_3\text{-N}$ presente en este punto. A excepción de la Estación 7, los valores de $\text{NO}_3\text{-N}$ son menores que los registrados en años anteriores (1,58 mg/L) [43].

El fósforo presenta una tendencia al aumento a lo largo de la zona de estudio, registrándose el mínimo de 4,5 mg/L en la Estación 1 y el máximo de 366,3 mg/L en la Estación 7. Tal como ocurre con el nitrógeno, la presencia de vegetación acuática en este punto podría explicar el alto nivel de fósforo en esta estación de muestreo (ver Figura 11).



Figura 11. Estación de muestreo 7.

Los niveles de oxígeno disuelto fueron similares entre los puntos de muestreo, fluctuando entre valores de 7,3 mg/L y 11,1 mg/L (Tabla 2), correspondiéndose con los valores registrados anteriormente en la zona [19].

Respecto a los niveles de dureza determinados en el área de estudio, éstos no presentan una tendencia espacial definida, así como tampoco se correlacionan con los demás parámetros medidos.

2. Análisis de Metales

Los valores de zinc no superaron la norma de 2,00 mg/L (NCh 1333), registrándose el máximo valor en la Estación 6, con 0,083 mg/L, valores similares a los encontrados por la DGA en el año 2004 que fluctuaron entre <0,01 mg/L y 0,13 mg/L [19], lo que sugiere la ausencia de cambios significativos en las fuentes de descarga de este metal en el río Aconcagua entre el período de muestreo de dicho análisis y la fecha de muestreo de este estudio.

Los niveles de molibdeno también se encontraron bajo la norma que permite un máximo de 0,01 mgMo/L (NCh 1333), con excepción de la Estación 3 en que se

superó este valor 17 veces, con 0,172 mg/L. La Estación 4 alcanzó el valor límite para la norma. Esto muestra que el impacto de la Planta de Molibdeno es importante en el río Blanco, diluyéndose considerablemente cerca de 2 km aguas abajo (Estación 4), aunque aún sin el cumplimiento de la normativa de calidad existente para ese efecto. Los niveles encontrados en este estudio se corresponden con los registrados por la DGA el año 2004 [19].

La concentración de cobre no superó el máximo permitido por la norma (NCh 1333) en la mayor parte de los casos (Figura 12). En sólo dos estaciones se superó este valor: la Estación 3, en la cual el nivel de cobre fue de 0,366 mg/L; y la Estación 6, que superó la norma 6 veces, alcanzando un valor de 1,458 mg/L.

La única actividad minera activa de cobre aguas arriba de la zona de estudio es Minera Andina, alrededor de 17 km aguas arriba de la Estación 2 en río Blanco.

De los datos obtenidos, se observa que la concentración de cobre en Estación 2 representa menos de la mitad de lo establecido en la norma, alcanzándose un valor de 0,048 mg/L, lo cual sugiere que los casos en que se supera la norma no se deberían a la actividad minera desarrollada aguas arriba de este punto (Minera Andina). Esto, debido a que de ser el efluente de esta compañía el responsable de las concentraciones del metal, debería ser precisamente aguas abajo de la descarga el lugar donde debiera registrarse la concentración más alta, y dicha concentración tendería a disminuir aguas abajo a causa de la dilución. Sin embargo, los valores determinados de cobre no corresponden a este supuesto.

El valor obtenido para la Estación 6 podría deberse a la Mina Los Bronces, de la Compañía Minera Disputada de Las Condes S.A., ubicada en la comuna de Los Andes, cuyos efluentes se descargan al río Aconcagua. La clasificación CIU de esta mina indica que el cobre es uno de los parámetros típicos que se deberían encontrar en efluentes de este tipo de industria según el D.S. N°90/00 MOP [19].

La Figura 12 muestra los niveles de cobre encontrados en los 7 puntos de muestreo. De la figura se desprende que los valores de Cu^{2+} y cobre disuelto más

altos se registraron en la Estación 3, (0,198 mg/L y 0,251 mg/L respectivamente). En la Estación 6, sin embargo, se presenta la mayor cantidad de cobre total, el cual está formado este punto principalmente por cobre particulado (más de 99% de cobre particulado). El bajo porcentaje de la fracción disuelta del metal en esta estación podría deberse a que los factores que favorecen la presencia de los iones libres en forma disuelta en el agua (SDT, C, T, pH, dureza) registran valores que se encuentran mayoritariamente en la media de los valores encontrados en toda la zona de muestreo, los que además cumplen con la NCh 1333.

De los niveles determinados en este estudio se obtiene que los niveles de Cu^{+2} y cobre disuelto se relacionan significativamente, con una correlación de Pearson de 0,943 ($p < 0,05$). Lo mismo sucede con los niveles de cobre particulado y total, que presentan una correlación de Pearson de 0,985 ($p < 0,05$).

La relación obtenida entre las fracciones soluble y Cu (II) con el nivel de cobre total podría deberse a la interacción del metal con los factores anteriormente mencionados (SDT, C, T° , pH y dureza) [1].

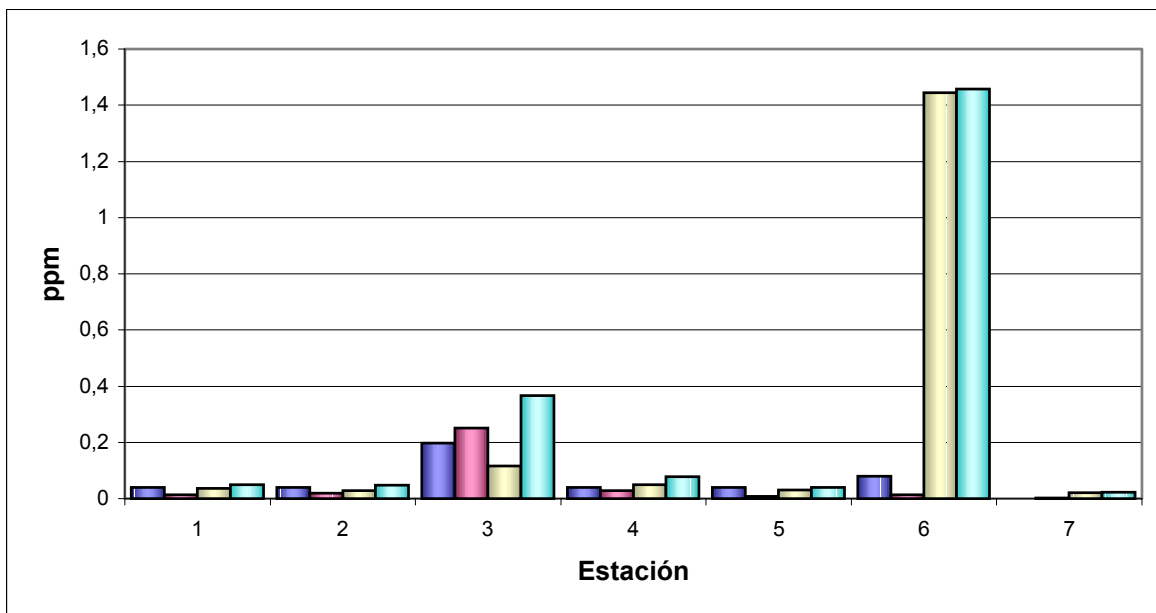


Figura 12.- Concentración de Cobre presente en la zona de muestreo, en sus diferentes fracciones.
■ Cu^{2+} ■ Cu disuelto ■ Cu particulado ■ Cu total

De los factores mencionados anteriormente, la concentración de SDT y la conductividad eléctrica muestran una correlación significativa respecto a las concentraciones de cobre disuelto y Cu(II) ($p < 0.05$). Esta correlación, sin embargo, no se observa con los niveles de cobre total y particulado. En la Figura 13 se observan los perfiles de los parámetros conductividad, sólidos disueltos totales, cobre disuelto y Cu^{2+} en la zona de muestreo.

Si bien entre los valores de pH y cobre no se encontró una correlación significativa en este estudio al considerar todas las estaciones ($p < 0,05$), aquellas que presentaron niveles de pH más ácido fueron la Estación 3 y Estación 6, coincidiendo con niveles de cobre más elevados. Esto podría explicarse porque al disminuir el pH aumenta la sorción⁵, incrementando las concentraciones de las fracciones disuelta y biodisponible del metal [1].

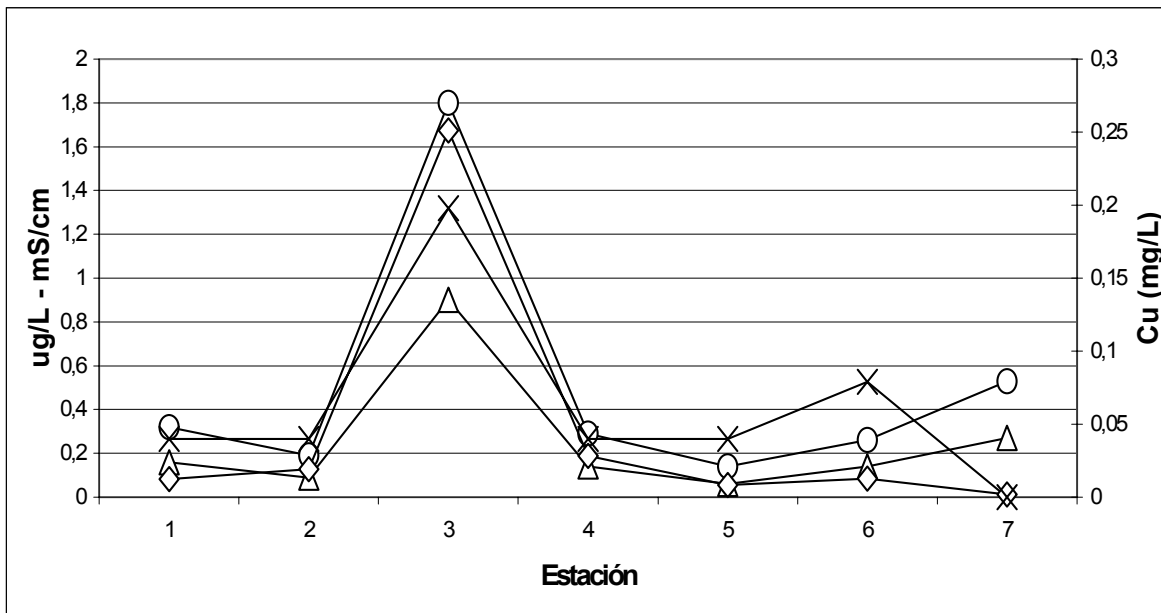


Figura 13.- Perfil de Sólidos Disueltos Totales, Cobre Disuelto y Conductividad. —△— SDT
—○— C —◇— Cu Disuelto —×— Cu^{2+}

⁵ Concentración de sólidos disueltos a través de absorción o adsorción en un sólido.

3. Bioensayos

Las muestras de las diferentes estaciones tuvieron efectos tanto inhibitorios como estimulantes sobre el crecimiento de la microalga respecto al control de laboratorio (Figura 14 y Figura 15).

Los valores de densidad celular a las 96 horas mostraron que las aguas de las estaciones 4 y 7 provocaron un aumento en el número de células a las 96 horas respecto al control de laboratorio, en tanto que las otras estaciones mostraron una densidad celular al final del bioensayo menor que la del control de laboratorio (Figura 14).

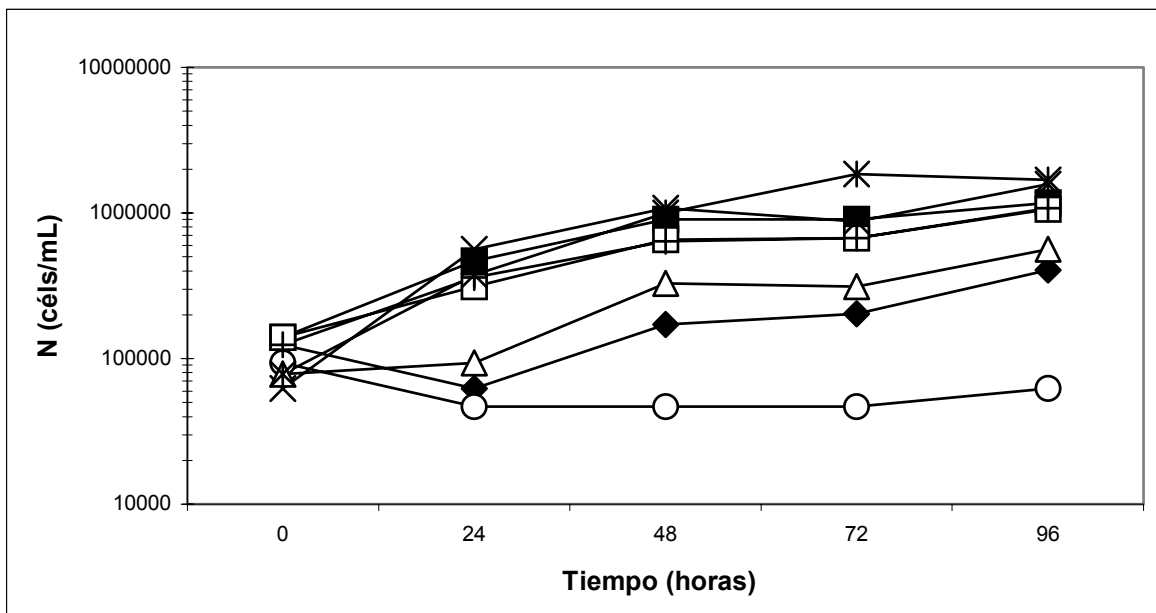


Figura 14.- Curva de crecimiento para *Selenastrum capricornutum* durante el bioensayo con los tratamientos. —■— Control Lab. —◆— Est. 1 —□— Est. 2 —○— Est. 3 —×— Est. 4 —+— Est. 5 —△— Est. 6 —*— Est. 7.

La tasa de crecimiento k en las estaciones 4, 5, 6 y 7 fue mayor que en el control de laboratorio (Figura 15 y Figura 17). El porcentaje de inhibición de k (Figura 16) muestra que la tasa de crecimiento fue menor en las estaciones 1, 2 y 3.

La estimulación del crecimiento que presenta la Estación 7 podría deberse a los elevados niveles de nutrientes, especialmente fósforo, además de la baja

concentración de metales presentes en el lugar. Catemu presenta diferencias significativas en la densidad celular a las 96 horas respecto a las estaciones 3 y 6, y diferencias significativas entre la tasa de crecimiento y las estaciones 2 y 3.

Respecto al control de laboratorio, sólo la Estación 3 presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) tanto en la tasa de crecimiento k como en la densidad celular al final del bioensayo (Figura 17). Esto podría atribuirse a los niveles de cobre libre encontrados en dicho punto. Lo anterior coincide con la relación estudiada en laboratorio entre concentraciones de Cu^{2+} y k [45, 36, 34, 31, 23].

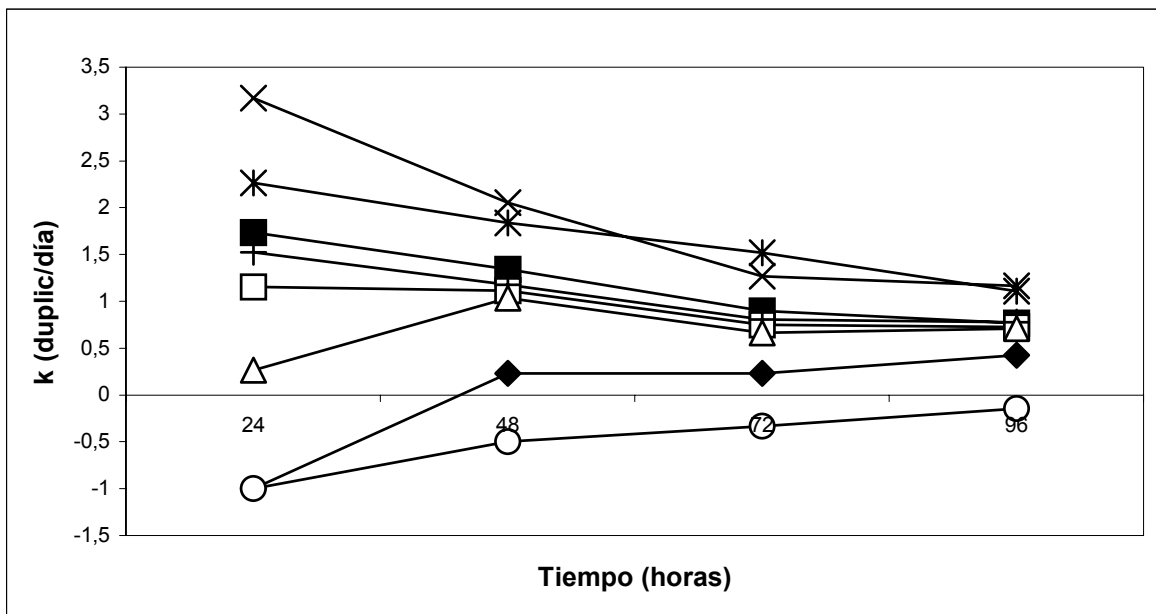


Figura 15.- Tasa de crecimiento k (diaria) para *Selenastrum capricornutum* durante el bioensayo definitivo. —■— Control Lab. —◆— Est. 1 —□— Est. 2 —○— Est. 3 —×— Est. 4 —+— Est. 5 —△— Est. 6 —*— Est. 7.

En la Figura 17 se observa que el valor de k a las 96 horas para la estación Juncal es menor que en todas las estaciones, excepto en la Estación 3, con la cual no presenta diferencias significativas. Este punto es de especial interés, dado que la estación Juncal no se encuentra afectada por la actividad minera de la zona, lo cual sugiere la existencia de otros factores que actúan sobre la toxicidad de los componentes del agua en ese punto. Lo anterior indica que esa estación no es un buen control

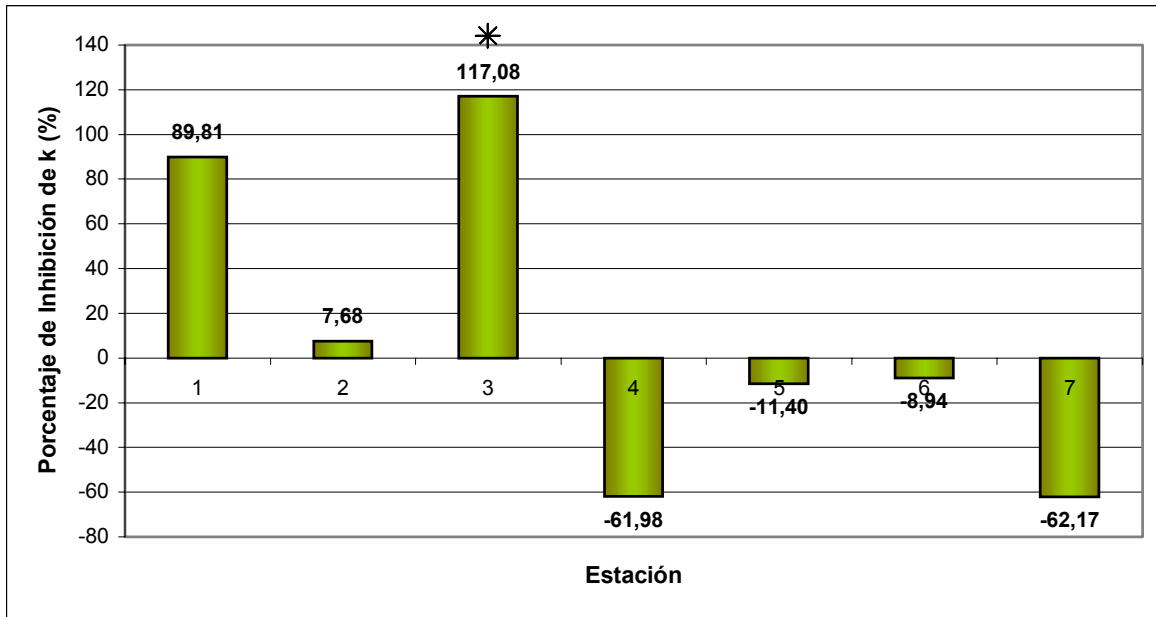


Figura 16. Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento k a las 96 h. * Indica diferencia significativa respecto al control de laboratorio ($p < 0,05$).

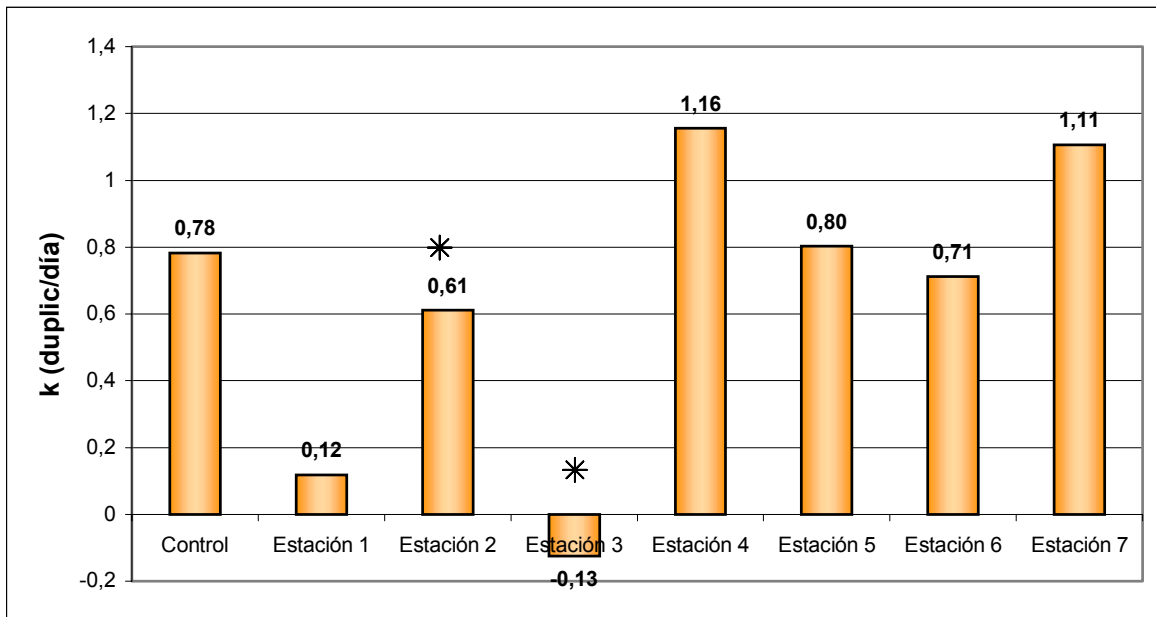


Figura 17. Tasa de crecimiento k a las 96 horas. * Indica diferencia significativa respecto a la Estación 7 ($p < 0,05$).

para el estudio a pesar de encontrarse libre de la influencia de la actividad minera de la zona.

El crecimiento diario (Figura 15) muestra que en los tratamientos de las estaciones 1, 3 y 6 se presenta una curva de k diario con pendiente positiva, mientras que los tratamientos de las estaciones 2, 4, 5 y 7 presentan una curva con pendiente negativa.

En las estaciones 2, 4, 5 y 7 el valor máximo de k se registró a las 24 horas, y el valor mínimo a las 96 horas, mostrando una alta tasa de reproducción al comienzo del bioensayo que disminuye durante el desarrollo del mismo. Esto muestra que el retardo que producirían los agentes químicos en la fase exponencial de crecimiento es menor que en las otras estaciones. Esto se corresponde con lo descrito por Kuwabara (1986) [30], quien señala que el crecimiento exponencial de *S. capricornutum* en el cultivo control ocurre inmediatamente después del inóculo, a una razón de aproximadamente 2 duplic/día.

En las estaciones 1 y 3 el perfil diario de k mostró el valor mínimo de k a las 24 horas y el máximo al final del bioensayo. Esto sugiere una acción retardadora de la muestra sobre la microalga, que se corresponde con Kuwabara en 1986 [30], señalando que en presencia de cobre la fase exponencial de crecimiento para *S. capricornutum* comienza luego de una fase de retardo que dependerá de la concentración del metal en el medio de cultivo. Cabe destacar que a pesar de que los valores de k diario presentaron una tendencia al aumento durante el bioensayo en las estaciones 1 y 3, estos valores de k siempre registraron un valor menor a los alcanzados en las estaciones que no presentaron retardo en la fase de crecimiento exponencial.

En el tratamiento de la Estación 6 la forma de la curva de la tasa de crecimiento k muestra una pendiente positiva entre las 24h y las 48 h, disminuyendo el valor de k disminuye hacia el final del bioensayo. Esto sugiere que los compuestos presentes en el agua de ese punto de muestreo tienen un efecto retardador del crecimiento, además de inhibitorio, disminuyendo el valor de k máximo alcanzado

por el cultivo. En este caso los valores de k alcanzados en los tratamientos de las estaciones 2, 4, 5 y 7.

En la Figura 14 se observa que a las 96 horas la densidad celular del cultivo de Estación 3 es menor que su densidad celular inicial. Esto explica el valor negativo de su tasa de crecimiento (Figura 15 y Figura 17), dado que el cultivo se observa en fase de decaimiento, registrándose una densidad celular menor a medida que avanza el tiempo.

La toxicidad del cobre en todos los tratamientos podría ser potencialmente mayor que lo que reflejan los valores de k . Esto se debe a que la densidad celular inicial del bioensayo fue de 10^5 céls/ml para obtener resultados aceptables en el conteo celular con cámara de Neubauer. La sensibilidad de la microalga al efecto tóxico del cobre podría ser mayor con densidades celulares iniciales de $10^2 - 10^3$ céls/ml [21].

El valor de k en la Estación 3 corresponde a la mayor inhibición entre todas las estaciones (Figura 16), además de presentar este punto los valores más críticos en la mayoría de los parámetros medidos (ver Tabla 2). Por esta razón se realizó un bioensayo con 5 diluciones, obteniéndose un valor de $IC_{50}=18.91\%$ de la muestra, lo que indica que para que se produzca una inhibición de 50% en la tasa de crecimiento a las 96 horas, el agua en dicha estación debería diluirse a menos del 20% de su concentración actual. El porcentaje de inhibición de k para esta dilución se muestra en la Figura 18.



Figura 18. Porcentaje de inhibición de k en el bioensayo de dilución realizado a la Estación 3.

Considerando que el valor de cobre total para la Estación 3 fue de 0,366 mg/L y el de cobre disuelto de 0,251 mg/L, podría establecerse una comparación con los valores de referencia de IC_{50} obtenidos en ensayos de toxicidad de cobre realizados en laboratorio (IC_{50} nominal). El valor de $IC_{50} = 18,91\%$ obtenido para la muestra, representaría una concentración de cobre total 0,069 mg/L respecto a la concentración de cobre presente en ese punto de muestreo, y un valor de cobre disuelto de 0,047 mg/L. Estos valores se corresponden con los registrados en ensayos de laboratorio que señalan IC_{50} de 0,02 – 0,94 mgCu/L [6] y 0,05 mgCu/L [9].

4. Toxicidad de cobre

Si bien la correlación obtenida entre k , $Cu_{disuelto}$ y Cu_{total} no fue significativa ($p > 0,05$), la concentración de $Cu(II)$ presentó una correlación respecto a k de $-0,724$, correlacionándose significativamente ($p < 0,05$). Esto sugiere que el resultado del bioensayo, en cuanto a la tasa de crecimiento, podría deberse a las concentraciones de ión cúprico en el agua de río. El valor negativo de la correlación indica una relación inversa entre ambos parámetros.

Respecto a los valores de Zinc y Molibdeno, éstos no mostraron una relación causa – efecto con la tasa de crecimiento, registrándose correlaciones no significativas entre la tasa de crecimiento k , Zn y Mo ($p > 0,05$).

La relación entre cobre total y k obtenida es diferente a lo señalado en otros estudios en los cuales existe correlación entre estas variables [45, 26, 6]. Esto podría deberse a que en dichos estudios la concentración de cobre se manipula en laboratorio, manteniendo constante para cada concentración de cobre los factores que condicionan la especiación del metal. Sin embargo, en este estudio se analizaron muestras de agua de río, cada una con diferentes valores para dichos factores, lo que podría explicar la diferencia al influir estas variaciones sobre la especiación del metal y con ello, sobre su toxicidad.

Los tratamientos que presentaron valores más alejados de la media, tanto para cobre disuelto como para k , coinciden en una relación inversa entre estas dos variables. La Estación 3 registró el valor máximo para cobre disuelto y al mismo tiempo, el valor mínimo para k y las estaciones 4 y 7 registraron, a su vez, los valores mínimos para cobre disuelto, traduciéndose en los valores más altos de k . El comportamiento de la microalga en las estaciones 4 y 7 podría ser además, el resultado de la estimulación que se produce en bajas concentraciones de cobre [21].

Un estudio de aclimatación de *S. capricornutum* a niveles de cobre a largo plazo señala que la microalga puede adquirir resistencia al incremento en la concentración de cobre [6]. De esta forma la toxicidad puede verse reducida luego de algunas generaciones de exposición a cobre [28], lo que explicaría la pendiente positiva en la tasa de crecimiento para los cultivos en los medios que presentaron las concentraciones más altas de cobre.

La influencia del carbono orgánico disuelto no ha sido examinada en este estudio. Este parámetro puede ser especialmente importante en la evaluación de toxicidad de cobre, ya que los complejos orgánicos actúan reduciendo la toxicidad del metal [6], pudiendo explicar los resultados obtenidos en los bioensayos.

Los cambios causados por la combinación de nutrientes, como fosfato o nitrato, con contaminantes puede considerarse un elemento de estrés [20], lo que podría explicar el comportamiento de los cultivos frente a las concentraciones de cobre. El tratamiento de la Estación 6 obtuvo un valor de k de 0,71 duplic/día, sin diferencias significativas respecto a las estaciones de mayor valor de k , sin embargo los niveles de cobre total fueron altos en ese punto. La alta concentración de nitrato y fosfato en esta estación podrían tener acción sobre la toxicidad de cobre en el mismo punto, explicando el valor de k obtenido.

La temperatura es otro factor que condiciona la toxicidad, sin embargo, su acción se produce desde otro punto de vista. A diferencia de los factores anteriormente mencionados, que actúan sobre la biodisponibilidad de los metales, la temperatura influencia el metabolismo biológico, incluyendo las actividades de defensa enzima – dependientes contra los efectos de contaminantes [20]. A pesar de la importancia biológica de este parámetro en los sistemas naturales, tanto la tasa de crecimiento k como la densidad celular no presentaron correlación significativa ($p < 0,05$) con la temperatura de la estación de muestreo. Esto puede explicarse porque durante los bioensayos se controló la temperatura, manteniéndose constante y uniforme para todos los tratamientos. De esta manera, el efecto que podría producir en la toxicidad al actuar sobre la microalga se ve alterado siendo además, teóricamente el mismo para los tratamientos de las diferentes estaciones de muestreo al tener éstos la misma temperatura durante los bioensayos.

CONCLUSIONES

1. Las mayores inhibiciones del crecimiento se registraron en los tratamientos de sector Planta Molibdeno y el centro poblado correspondiente a Los Andes.
2. Los niveles de Cu(II) son dependientes de la concentración de cobre disuelto presente en el agua.
3. Los niveles de cobre determinados y su distribución espacial muestran que el nivel de Cu^{2+} no proviene claramente de aportes aguas arriba de Planta Molibdeno, pero sí hay aporte en esa zona en dirección aguas abajo.
4. La hipótesis planteada se acepta, señalándose que la concentración de la fracción biodisponible de cobre, ión cúprico, se correlaciona inversamente con la tasa de crecimiento k para *Selenastrum capricornutum* en las aguas del río Aconcagua estudiadas.
5. Debido a que entre Cu_{total} y k se encontró una baja correlación, a diferencia de lo sucedido entre Cu^{2+} y k se sugiere que la determinación de la fracción biodisponible de metales debe incluirse en los estudios de toxicidad, lo que contribuirá en la representatividad de los efectos tóxicos observados.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de tesis se realizó gracias al Proyecto "Toxicidad y especiación de metales pesados en aguas superficiales afectadas por la actividad minera en la cuenca del río Aconcagua" (DIPUV-REG 06-2003).

Junto con ello, doy mis agradecimientos a las siguientes personas que colaboraron en este trabajo de tesis:

Los profesores Marisol Tejos, José Cáceres, Marcela Zahr, y la química Carolina Garín, y en particular a la profesora Ana Silvia Cifuentes, de la Universidad de Concepción, por su importante entrega de conocimientos, facilitación de materiales e instrumentos, buena disposición y tiempo otorgados.

Los técnicos de laboratorio Marco Fuenzalida, Jorge Hernández y Sra. Luisa García, por su constante ayuda en la facilitación de material y labores de laboratorio.

Dr. Hernán Gaete, profesor guía de este trabajo de tesis, por el tiempo, dedicación y durante la realización del trabajo, especialmente en terreno.

La familia, amigos y cercanos que entregaron su apoyo, ayuda y paciencia durante el desarrollo de la tesis, en especial a Claudia, mi hermana, por todo lo anterior y por su ayuda en laboratorio.

A todos ellos, los más sinceros agradecimientos por colaborar para que este estudio pudiera concretarse.

REFERENCIAS

1. BAKER, S., HERRCHEN, M., HUND-RINKE, K., KLEIN, W., KÖRDEL, W., PEIJNENBURG, W., y RENSING, C. 2003. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety* (56): 6 – 19.
2. BLAISE, C. 1991. Microbiotests in aquatic toxicology: Characteristics, utility and prospects. *Toxicology Assessment*. (6): 145 – 155.
3. BLAISE, C. 1998. Microbiotesting: An expanding field in Aquatic Toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (49): 115 – 119.
4. BLAISE, C. 2003. Canadian application of bioassays for environmental management: a review. *Sediment Quality Assessment and Management: Insight and Progress*. 39 – 57.
5. BLAISE, C., FÉRARD, J., VASSEUR, P., 1998. Microplate toxicity tests with microalgae: a review. *Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques, and practice*. Chapter 18. 269 – 288.
6. BOSSUYT, B., JANNSEN, C. 2004. Long-term acclimatation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak ti different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology* (68): 61 – 74.
7. BUERGE – WEIRICH, D., SULZBERGER, B. 2004. Formation of Cu(I) in Estuarine and Marine Waters: Application of a New Solid – Phase Extraction Method To Measure Cu(I). *Environmental Science and Technology* (38): 1843 – 1848.
8. CAIRNS, J. R. 1984. Are single species tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Environmental Monitoring Assessment* (4): 259 – 273.

9. CANTOX ENVIRONMENTAL. 2001. Appendix F. Toxicity profiles. Ecological profiles. Ecological risk assessment program. [En línea] Disponible en <www.teckcominco.com/articles/tr-ecorisk/techreports/2001-initial-pfr/2001-05-pfr-apxf.pdf> [05 de Febrero de 2005].

10. CICA. 1982. Estudio integral de riego de los valles Aconcagua, Ligua y Petorca. Comisión Nacional del Riego, Chile.

11. CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 1998. NCh 411/6. Of1998. Calidad del agua - Muestreo - Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua. 15 pp

12. CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 1987. NCh 1333.Of78. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. 9 pp.

13. CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 2002. NCh 2709.Of2002. Norma Chilena Oficial. Calidad de agua – Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*). 28 pp

14. CHILE. MINISTERIO SECRETARÍA GENERAL DE LA PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA. 2000. DS N°90. Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales. 16 pp.

15. CIFUENTES, A., SILVA, J., BAY – SCHMITH y LARRAÍN, A. 1998. Selección de cepas de microalgas para ser utilizadas en bioensayos de toxicidad. Gayana Oceanol. 6 (1 –2): 1 – 9.

16. CODELCO. 2004. Memoria anual. p.25.

17. COMISIÓN NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE. 2004. Política ambiental de la Región de Valparaíso. [En línea] Disponible en <<http://www.conama.cl/portal/1255/article-26207.html>> [05 de Agosto de 2004].

18. COTÉ, C.; BLAISE, C.; SCHROEDER, J.; DOUVILLE, M.; MICHAUD, J. 1998. Investigating the adequacy of selected micro – scale bioassays to predict the toxic potential of freshwater sediments through a Tier process. *Water Qual. Res. J. Canada.* (33) No. 2: 253 – 277.
19. DIRECCIÓN GENERAL DE AGUAS. 2004. Diagnóstico y Clasificación de los Cursos y Cuerpos de Agua según Objetivos de Calidad. Cuenca del Río Aconcagua. p. 71, 72, 94 – 118.
20. EGGEN, R.; BEHRE, R.; BURKHARDT – HOLM, P.; ESCHER, B.; SCHWEIGERT, N; SWISS FEDERAL INSTITUTE FOR THE ENVIRONMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY (EAWAG). 2004. Challenges in Ecotoxicology. *Environmental Science & Technology.* (February 1): 58A – 64A.
21. FRANKLIN, N., STAUBER, J., APTE, S., LIM, R. 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21 (4): 742 – 751.
22. GAETE, H.; LARRAÍN, A.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Y BAY – SCHMITH, E. 1999. Efecto de aguas receptoras de efluentes de industrias de celulosa localizadas en la Cuenca del río Biobío (Chile, central) sobre la tasa de crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornutum* y reproducción del cladocero *Daphnia pulex*. *Rev. Invest. Cient. Tecnol., ser. cienc. mar* (5): 19 – 29.
23. GOUDEY, J.D., 1987. Modeling the inhibitory effects of metals on phytoplankton growth. *Aquatic Toxicology* (10): 265 – 278.
24. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS. 2003. Estadísticas del Medio Ambiente 1998 – 2002, Capítulo II. Estadísticas del Medio Ambiente Natural, II.2 Aguas [en línea] Disponible en <<http://www.ine.cl/17-ambiente/II-2.pdf>> [04 de febrero de 2005].

25. ISO. 1989. Water quality – fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* ISO 8692 Geneva, Switzerland, 6 pp.
26. KANEKO, H., SHIMADA, A., HIRAYAMA, K. 2004. Short – term algal toxicity test based on phosphate uptake. *Water Research* (38): 2173 – 2177.
27. KARLÉN, C., ODNEVALL WALLINDER, I., HEIJERICK, D., LEYGRAF, C. 2002. Runoff rates, chemical speciation and bioavailability of copper released from naturally patinated copper. *Environmental Pollution* (120): 691 – 700.
28. KLERKS, P., WEIS, J. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental pollution* (45): 173 – 205.
29. KHOSHMANESH, A., LAWSON, F., PRINCE, I.G. 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chem. Eng. J.* (1): 13–19.
30. KUWABARA, J., LELAND, H. 1986. Adaptation of *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry* (5): 197 – 203.
31. LEWIS, M. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental pollution* (87): 319 – 336.
32. LOVETT DOUST, J. SCHMIDT, M. y LOVETT DOUST, L. 1994 Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biol. Rev* (69): 147 – 186.
33. LUNA, R., LAGOS, G. 1990. Evaluación del estado de las aguas del río Aconcagua. Contaminación por acción de origen minero. p. 2,9.
34. MA, M., ZHU, W., WANG, Z., WITKAMP, G. 2003. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus*

86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology* (63): 221 – 228.

35. MATULOVÁ, D. 1991. The application of algae as test organisms. *Archiv für Protistenkunde* (139): 279 – 289.

36. MEADOR, J., SIBLEY, T., SWARTZMAN, G., TABÚ, F. 1998. Copper tolerance by the freshwater algal species *Oocystis pusilla* and its ability to alter free-ion copper. *Aquatic Toxicology* (44): 69 – 82.

37. MORENO – GARRIDO, I., LUBIÁN, L. M. y SOARES, A. M. V. M. 1999. Oxygen Production Rate as a Test for Determining Toxicity of Copper to *Rhodomonas salina* Hill and Wehterbee (Cryptophyceae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (62): 776 – 782.

38. NYLHOLM, N. & KÄLLQVIST. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* (8): 689 – 703.

39. OKAMURA, H., PIAO, M., AOYAMA, I., SUDO, M., OKUBO, T., NAKAMURA, M. 2002. Algal growth inhibition by river water pollutants in the agricultural area around Lake Biwa, Japan. *Environmental Pollution* (117): 411 – 419.

40. SAG. 2001. Consolidado del programa de prevención y contaminación de los recursos hídricos año 1999. p 73 – 102.

41. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1995. 19th Edition.

42. TORMO, R., Universidad de Extremadura. Lecciones hipertextuales de botánica [en línea]. Disponible en <<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/chloroph.htm>> [26 de Mayo de 2004].

43. UNIVERSIDAD DE CHILE, INSTITUTO DE ASUNTOS PÚBLICOS, 2002. Informe País. Estado del Medio Ambiente en Chile 2002. 1^a Ed. LOM Ediciones.

44. WEST, L., LI, K., GREENBERG, B., MIERLE, G., SMITH, R. 2003. Combined effects of copper and ultraviolet radiation on a microscopic alga in natural soft lake waters of varying dissolved organic carbon content. *Aquatic Toxicology* (64): 39 – 52.

45. YAN, H. y PAN, G. 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* (49): 471 – 476.