



Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería en Medioambiente
Ingeniería Ambiental

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD EN AGUAS SUPERFICIALES DEL ESTERO
LIMACHE Y ESTERO QUILPUÉ MEDIANTE EL BIOENSAYO CON *LEMNA
MINÚSCULA*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO AMBIENTAL**

ASTRY MARTÍNEZ REYES

PROFESOR GUÍA: DR. HERNÁN GAETE OLIVARES.

VALPARAÍSO CHILE

2019

Agradecimientos

Primero que todo agradecer a mi madre, la cual es pilar fundamental en mi vida, agradecer por creer siempre en mí, por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, por ayudarme a ser mejor persona y por luchar por lo que uno quiere, por quererme y hacerme saber que el esfuerzo constante se premia y que al final del camino siempre habrá una gran recompensa esperando, por ayudarme de cualquier forma mientras estuviera a su alcance, por dejarme volar cuando fue necesario y por ser una madre 24/7.

Agradecer a mis amigos de la Universidad: Alejandra, Paola, Andrés, Matías y Enrique, los cuales llegamos hasta las últimas y que sin ustedes el viaje por la universidad no hubiera sido lo mismo sin las risas, los buenos momentos y las desveladas de estudio.

A mis amigas de la vida: Natalia y Valentina, las cuales con su apoyo y cariño incondicional logré sobrevivir el último año. Gracias por estar siempre para mí, por creer en mí, por ser personas extraordinarias.

A Cristóbal: el cual llegó en la etapa final de mi época universitaria, gracias por creer en mí, por apoyarme y por ayudarme en la última instancia de mi trabajo de título, gracias por todo el amor y la sabiduría que siempre entregas.

A mi familia, la cual a pesar de estar lejos siempre sentí su amor y buenos deseos para mí, por siempre tener una palabra de ánimo o algún buen consejo, por ayudarme a creer que todo es posible mientras uno lo sienta de corazón.

Y a toda persona a lo largo de estos años que aportó con su granito de arena de cualquier forma para poder terminar la universidad.

Resumen

Debido a las actividades antrópicas que se realizan en las cercanías de los esteros Limache y Quilpué es que estos pueden verse afectados de forma negativa producto de la generación de residuos por parte de industrias y actividades agrícolas, entre otras. En este ámbito, es que las macrófitas acuáticas que son base de las tramas tróficas pueden verse afectadas por los agentes químicos, provocando daños a otros componentes del ecosistema acuático. La poca información sobre la calidad de estas aguas hace que sea difícil conocer el estado en que se encuentran, por lo que es importante la existencia de normas de calidad ambiental secundarias que permitan conservar y proteger los sistemas acuáticos. El objetivo de este trabajo es realizar el bioensayo de toxicidad con la macrófita acuática *Lemna minúscula* para conocer la toxicidad de las aguas de los esteros Limache y Quilpué, mediante cuatro variables respuesta: número de fronda, área de fronda, peso seco y contenido de clorofila total. Para esto, primero se utilizó un tóxico de referencia (Sulfato de Cobre pentahidratado) para implementar la metodología como alternativa para su uso en normas secundarias de calidad ambiental de aguas superficiales. Posteriormente, durante 7 días se observaron los cambios de número y área de fronda, mientras que para el peso seco se pesó una muestra característica de lemnas al final del ensayo. Para la medición de clorofila, esta se realizó al final de los 7 días de exposición. Los resultados arrojaron crecimiento de número de frondas en todos los puntos muestreados siendo mayores en la planta de tratamiento de aguas (PTA) para el estero Limache y en la Planta Carozzi (PC) para el estero Quilpué, siendo esta variable respuesta la más sensible de las cuatro analizadas. Se evidenció que el estero Limache presenta algunos sectores tóxicos, mientras que para el estero Quilpué se observó que no existe toxicidad, al arrojar resultados similares en todas las estaciones de muestreo con respecto al número de frondas.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Contaminación de los cuerpos de agua	2
1.2	Efectos que produce la contaminación de aguas.	3
1.3	Biodiversidad	4
1.4	Normativa Chilena	5
1.5	Uso de bioensayos	8
1.5.1	Uso de <i>Lemna sp</i> en bioensayos.	8
1.5.2	<i>Lemna minúscula</i>	9
2	Problema	13
3	Hipótesis	14
4	Objetivos	14
4.1	Objetivo general	14
4.2	Objetivos específicos	14
5	Metodología	15
5.1	Implementación de bioensayo	15
5.2	Determinación de toxicidad de las aguas superficiales de los esteros Limache y Quilpué	15
5.2.1	Área de estudio	15
5.2.1.1	Estero Limache	15
5.2.1.2	Estero Quilpué	16
5.2.2	Elección del material de estudio	16
5.2.3	Recolección y cultivo.	17
6	Diseño de muestreo	18
6.1	Implementación de bioensayo	18
6.2	Determinación de toxicidad de las aguas superficiales de los esteros Limache y Quilpué	19
6.2.1	Caracterización fisicoquímica de las aguas superficiales.	19
6.2.2	Determinación de las variables respuesta.	22
6.2.2.1	Número de frondas	22
6.2.2.2	Tamaño de las frondas	22
6.2.2.3	Tasa de crecimiento específico	23
6.2.2.4	Medición de clorofila total	23
6.2.2.5	Porcentaje de inhibición	24
6.2.3	Análisis estadísticos	24
7	Resultados	25
7.1	Implementación de bioensayo con Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	25
7.1.1	Número de fronda	25

7.1.2	<i>Tamaño de fronda</i>	27
7.2	Determinación de toxicidad de las aguas superficiales de los esteros Limache y Quilpué	29
7.2.1	<i>Caracterización física y química de las aguas superficiales</i>	29
7.2.1.1	Estero Limache	29
7.2.1.2	Estero Quilpué	30
7.2.2	<i>Determinación de la toxicidad de aguas superficiales</i>	31
7.2.2.1	Número de frondas	31
7.2.2.2	Tamaño de fronda	33
7.2.2.2.1	Área de frondas	33
7.2.2.2.2	Peso seco	36
7.2.2.3	Contenido de Clorofila total	38
7.2.2.4	Porcentaje de inhibición	39
7.2.2.5	Correlación de variables respuesta	41
8	Discusión	42
8.1	Implementación de bioensayo con Sulfato de Cobre (CuSO ₄)	42
8.1.1	Número de frondas	42
8.1.2	Tamaño de las frondas	42
8.2	Caracterización física y química de las aguas superficiales.	43
8.3	Número de frondas.	45
8.4	Tamaño de las frondas.	46
8.4.1	Área de las frondas.	46
8.4.2	Peso seco.	47
8.5	Contenido de clorofila	48
9	Conclusiones	49
10	Bibliografía	50

Índice de figuras

Figura 1: Lemna minúscula en laboratorio _____	10
Figura 2: Morfología Lemna valdiviana _____	12
Figura 3: Morfología Lemna minúscula _____	12
Figura 4: Ubicación de los puntos de muestreo en Estero Limache _____	20
Figura 5: Ubicación de los puntos de muestreo del estero Quilpué _____	21
Figura 6: Número de frondas de las diferentes concentraciones con CuSO ₄ _____	26
Figura 7 Regresión lineal entre número de frondas y las diferentes concentraciones de CuSO ₄ . _____	26
Figura 8: Área de frondas de las diferentes concentraciones en ensayo con CuSO ₄ _____	28
Figura 9 Regresión lineal entre la tasa de crecimiento del área de las frondas y las diferentes concentraciones de CuSO ₄ . _____	28
Figura 10: Tasa de crecimiento para el número de frondas en Estero Limache _____	32
Figura 11: Tasa de crecimiento para el número de frondas en Estero Quilpué _____	33
Figura 12: Tasa de crecimiento para el área de las frondas del Estero Limache _____	35
Figura 13: Tasa de crecimiento para el área de frondas en el Estero de Quilpué _____	36
Figura 14: Tasa de crecimiento para el peso seco de las frondas del Estero Limache _____	37
Figura 15: Tasa de crecimiento para el peso seco de frondas en Estero Quilpué _____	37
Figura 16: Contenido de clorofila total en las muestras del Estero Limache _____	38
Figura 17: Contenido de clorofila total en las muestras de Estero Quilpué _____	39

Índice de Tablas

Tabla 1: Contaminantes, procesos y fuentes que afectan la calidad del agua. _____	2
Tabla 2: Diferencias entre <i>L. minúscula</i> y <i>L. valdiviana</i> . _____	11
Tabla 3: Preparación del medio 20X-AAP _____	17
Tabla 4: Puntos de muestreo Estero Limache. _____	19
Tabla 5: Puntos de muestreo Estero Quilpué. _____	20
Tabla 6: Porcentaje de inhibición, tasa de crecimiento y desviación estándar para el ensayo con CuSO ₄ respecto al número de frondas. _____	25
Tabla 7: Porcentaje de inhibición, tasa de crecimiento y desviación estándar para el ensayo con CuSO ₄ respecto al área de las frondas. _____	27
Tabla 8: Parámetros físicos y químicos de los puntos de muestreo de Estero Limache. _____	29
Tabla 9 Parámetros físicos y químicos de los puntos de muestreo de Estero Quilpué. _____	30
Tabla 10: Crecimiento del número de frondas de <i>L. minuta</i> en los diferentes puntos de muestreo del Estero Limache durante los 7 días de exposición. _____	31
Tabla 11: Crecimiento del número de frondas de <i>L. minuta</i> en los diferentes puntos de muestreo del Estero Quilpué durante los 7 días de exposición. _____	31
Tabla 12: Crecimiento del área de frondas de <i>L. minuta</i> en los diferentes puntos de muestreo del Estero Limache durante los 7 días de exposición. _____	34
Tabla 13: Crecimiento del área de frondas de <i>L. minuta</i> en los diferentes puntos de muestreo del Estero Quilpué durante los 7 días de exposición. _____	34
Tabla 14: Porcentajes de inhibición para las cuatro variables respuesta analizadas para el Estero Limache. _____	40
Tabla 15: Porcentajes de inhibición para las cuatro variables respuesta analizadas para el Estero Quilpué. _____	40
Tabla 16: Correlación de Pearson entre puntos finales de Estero Limache. _____	41
Tabla 17: Correlación de Pearson entre puntos finales del Estero Quilpué. _____	41

1 Introducción

El ser humano se ha ido adaptando a las diferentes necesidades que han ido apareciendo con el paso del tiempo, es por esto que las civilizaciones fueron avanzando y poco a poco la visión de la vida paso a ser antropogénica, la cual se consolidó en la Edad Media y en la época industrial (Bifani, 1980) (Castillo et al, 2016).

Poco a poco este nuevo pensamiento lleva al hombre a usar y abusar de la naturaleza de una manera descontrolada y en su búsqueda de sustento y abrigo, logra ser poseedor de nuevos conocimientos y avances tecnológicos, produciendo así un aprovechamiento de los recursos naturales.

A pesar de que el ser humano como especie tiene pocos años de existir en la Tierra, es el mayor responsable de los desastres que han ocurrido a lo largo de los años. Prueba de esto, son los cambios climáticos y la extinción de especies a causa de la alteración de los hábitats (Canales, 2010).

En Chile, esto es un tema preocupante en el ámbito ambiental, pues el cambio climático está afectando gravemente al medio ambiente, lo que conlleva a conflictos entre la fauna y los seres humanos, cambios en los ecosistemas, alteraciones en las interacciones entre especies e incendios en áreas silvestres entre otras. (Kaeslin et al, 2013). Ante esto, es que se ha ido trabajando en la realización de nuevas leyes que permitan un uso sustentable de los recursos naturales y que ayuden a proteger y preservar el Medio Ambiente. Si bien este es un gran paso que viene a favor de la protección del Medio Ambiente, no basta solo con esto para lograr el resguardo de la naturaleza, sobre todo de los cuerpos de agua, los cuales son determinantes ya que condicionan la distribución de plantas, animales y seres humanos en la Tierra más que cualquier otro ecosistema (Comisión Económica para América y el Caribe, 2002). En ellos, existen mezclas complejas de agentes químicos los que pueden afectar negativamente la biota del lugar dependiendo del tipo de interacción que tengan entre ellos.

1.1 Contaminación de los cuerpos de agua

Según el Decreto Supremo N°1/1992 del Ministerio de Defensa que establece el Reglamento para el Control de la Contaminación Acuática se entiende por contaminación acuática a la introducción en las aguas sometidas a la jurisdicción nacional, por el hombre, directa o indirectamente, de materia, energía o sustancias de cualquier especie, que produzcan o puedan producir efectos nocivos o peligrosos, tales como la destrucción o daños a los recursos vivos, al litoral de la República, a la vida marina, a los recursos hidrobiológicos; peligro para la salud humana; obstaculización de las actividades acuáticas, incluidas la pesca; deterioro de la calidad del agua para su utilización, y menoscabo de los lugares de esparcimiento y del medio ambiente marino.

En este ámbito, las fuentes de contaminación son en su mayoría plantas industriales, actividades agrícolas y desechos domésticos (Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), 2002). Los principales contaminantes y procesos que afectan negativamente la calidad de las aguas se muestran en la tabla n° 1:

Tabla 1: Contaminantes, procesos y fuentes que afectan la calidad del agua (CEPAL, 2002)

Contaminantes y procesos	Descripción	Fuentes
Contaminantes orgánicos	Se descomponen en el agua y disminuyen el oxígeno disuelto, induciendo la eutrofización	Fuentes industriales, domésticas, asentamientos humanos
Nutrientes	Incluyen principalmente fosfatos y nitratos, su incremento en el agua induce a una eutrofización. Se originan de desechos humanos y animales, detergentes y escorrentía de fertilizantes agrícolas	Fuentes domésticas, industriales, escorrentía agrícola
Metales pesados	Se originan principalmente alrededor de centros industriales y mineros. También pueden provenir de actividades militares o a través de lixiviados	Fuentes industriales, mineras, asentamientos humanos.
Contaminación microbiológica	Desechos domésticos no tratados, criaderos de animales (E. coli, protistas, amebas, etc)	Fuentes municipales
Compuestos tóxicos orgánicos	Químicos industriales, dioxinas, plásticos, pesticidas agrícolas, hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos poli cíclicos generados de la combustión del petróleo.	Fuentes industriales, asentamientos humanos, escorrentía agrícola

Continuación Tabla 1

Contaminantes y procesos	Descripción	Fuentes
Químicos traza y compuestos farmacéuticos	Desechos hospitalarios, son sustancias peligrosas no removidos necesariamente por los tratamientos convencionales y han sido reconocidos con disruptores endocrinos y carcinogénicos.	Industria química y farmacia, desechos hospitalarios
Partículas suspendidas	Pueden ser orgánicas o inorgánicas y se originan principalmente de prácticas agrícolas y del cambio en el uso de la tierra, como deforestación, conversión de pendientes en pastizales originando erosión	Industria, asentamientos humanos, escorrentía agrícola y cambios en el uso de la tierra
Desechos nucleares	Incluye una gama amplia de radio núcleos utilizados en fines pacíficos	Plantas nucleares, desechos hospitalarios, desechos industriales
Salinización	Se produce por la presencia de sales en los suelos y drenajes inadecuados. También ocurre por afloramiento de agua proveniente de zonas altas, donde se riega (lavado de sales)	Presencia de sales en los suelos, la que aflora por carecerse de un buen drenaje, agua de yacimientos secundarios de petróleo
Acidificación	Está relacionada con un pH bajo del agua dado por la deposición sulfúrica producida por la actividad industrial y por las emisiones urbanas	Fuentes industriales y fuentes municipales

1.2 Efectos que produce la contaminación de aguas.

Los ríos concentran contaminantes que captan en las cuencas, donde existen ecosistemas sensibles para la reproducción de especies, produciéndose un sinnúmero de efectos negativos, entre los cuales se encuentran: alteración de las funciones ecológicas, reducción de la diversidad biológica, daño a los hábitats acuáticos, contaminación de los cauces bajos y efectos en la salud humana. Producto de esto, es que a nivel mundial las especies se ven amenazadas con su subsistencia en el planeta.

Para el caso de la salud humana, esta se ve afectada por el consumo de aguas contaminadas y de especies que habiten en ellas, provocando enfermedades como hepatitis, daños al hígado, y hasta daños neuronales si se han expuesto a altas concentraciones de metales.

Actividades como pesca, turismo y recreación también resultan afectadas al disminuir su valor paisajístico.

1.3 Biodiversidad

Según el Convenio de la Diversidad Biológica, la biodiversidad comprende la variabilidad de los organismos vivos, que forman parte de todos los ecosistemas terrestres y acuáticos dentro de una misma especie, entre especies y entre ecosistemas.

El rol que juega la biodiversidad en el planeta es vital, ya que se ha observado que sistemas ecológicos con altos niveles de diversidad son típicamente más resilientes que aquellos con menor diversidad (Ministerio de Medioambiente, 2018). Otro de los aspectos relevantes de la biodiversidad es el de entregar los servicios ecosistémicos los cuales, según el Ministerio de Medioambiente, son definidos como todos los bienes, fenómenos y procesos que se derivan del funcionamiento de los ecosistemas y que resultan benéficos para la humanidad, a través de su uso directo o indirecto.

Durante las últimas décadas, los seres humanos han dañado la naturaleza más rápidamente que antes provocando impactos negativos los que constituyen amenazas sobre la biodiversidad, estos son (Ministerio de Medioambiente,2018):

- Pérdida y fragmentación de los hábitats naturales
- Sobreexplotación directa de especies y recursos
- Introducción de especies exóticas
- Contaminación ambiental
- Cambio climático

La pérdida de biodiversidad puede ser perjudicial para la sobrevivencia en el planeta, para el ser humano se transforma en escasez de alimentos, pérdida de sitios naturales con potencial

turístico y recreativo, pérdida de sombra y regulación térmica en ciudades y disminución de la cantidad y calidad del agua, entre otros.

Para los cuerpos de agua, la disminución de la biodiversidad deriva en la degradación de ciclos naturales, como en las tramas tróficas, los ciclos de nutrientes y el ciclo del agua, etc. Por lo que es importante que cada país cuente con leyes y normativas que permitan la conservación de la biodiversidad, la cual tiene por objetivo posibilitar la continuidad de los procesos evolutivos y ecológicos.

1.4 Normativa Chilena

La Ley sobre Bases Generales del Medio Ambiente (Ley N° 19.300, modificada por la Ley N° 20.417/2010, ambas del Ministerio Secretaría Regional de la Presidencia), establece en su artículo n° 32, la existencia de dos tipos de normas de calidad ambiental: primarias y secundarias.

El artículo 2° de la Ley las define de la siguiente forma: Las Normas Primarias de Calidad Ambiental son las que establecen los valores de las concentraciones y períodos, máximos o mínimos permisibles de elementos, compuestos, sustancias, derivados químicos o biológicos, energías, radiaciones, vibraciones, ruidos o combinación de ellos, cuya presencia o carencia en el ambiente pueda constituir un riesgo para la vida o la salud de la población.

Las Normas Secundarias de Calidad Ambiental corresponden a aquellas que establecen los valores de las concentraciones y períodos, máximos o mínimos permisibles de sustancias, elementos, energía o combinación de ellos, cuya presencia o carencia en el medio ambiente pueda constituir un riesgo para la protección o la conservación del Medio Ambiente, o la preservación de la naturaleza (Superintendencia del Medio Ambiente (SMA)).

Estas últimas, tienen por objetivo proteger o conservar los ecosistemas y sus servicios ecosistémicos a través de la mantención y mejoramiento de la calidad de las aguas de la cuenca; estas son de carácter local y no necesariamente nacional y consideran las

particularidades de cada cuenca hidrológica definiendo niveles de calidad por áreas de vigilancia.

Según la guía de CONAMA (2004), para el Establecimiento de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para Aguas Continentales Superficiales y Marinas, existen criterios nacionales específicos para el establecimiento de estas normas para la protección de las aguas continentales superficiales, los que tienen por objetivo:

- Proteger, mantener o recuperar la calidad de las aguas destinadas a la producción de agua potable.
- Proteger, mantener o recuperar la calidad de las aguas para proteger y conservar las comunidades acuáticas.
- Proteger, mantener o recuperar la calidad de las aguas para la conservación de especies hidrobiológicas de importancia para la pesca deportiva y recreativa y para la acuicultura.
- Proteger la calidad de las aguas para la bebida de animales sea que vivan en estado silvestre o bajo el cuidado y dependencia del hombre.
- Proteger la calidad de las aguas para riego de manera de conservar los suelos y las especies vegetales.
- Mantener o recuperar el estado trófico de los cuerpos lacustres.
- Proteger cuerpos o cursos de agua de extraordinaria calidad como componentes únicos del patrimonio ambiental.

Las normas secundarias de calidad ambiental asociadas a la protección de las aguas continentales superficiales, para la protección y conservación de las comunidades acuáticas y para los usos prioritarios, deben considerar las siguientes clases de calidad:

- Excepcional: Indica un agua de mejor calidad que la Clase 1 que, por su extraordinaria pureza y escasez, forma parte única del patrimonio ambiental de la República.
- Clase 1 (Muy buena calidad): Indica un agua adecuada para la protección y conservación de las comunidades acuáticas, para el riego irrestricto y para los usos comprendidos en las Clases 2 y 3.

- Clase 2 (Buena calidad): Indica un agua adecuada para el desarrollo de la acuicultura, de la pesca deportiva y recreativa y para los usos comprendidos en la Clase 3.
- Clase 3 (Regular calidad): Indica un agua adecuada para la bebida de animales y para riego restringido.
- Clase 4 (Mala calidad): No adecuada para la conservación de las comunidades acuáticas o su aprovechamiento para los usos prioritarios sin el tratamiento adecuado.

En la Quinta Región de Chile, existe el río Aconcagua, el cual es el principal suministro de agua potable de las provincias de Los Andes, San Felipe, Quillota y Valparaíso, teniendo diferentes actividades antrópicas en los alrededores de la cuenca como agricultura, minería, agroindustria, manufactura, generación de electricidad, turismo y servicio de transporte, por lo que es importante que exista una normativa que permita proteger y conservar este cuerpo de agua (Ministerio de Medioambiente).

El anteproyecto de la Norma Secundaria para la cuenca del Aconcagua plantea que el agua constituye una parte esencial de los ecosistemas acuáticos de la cuenca hidrográfica del Aconcagua, por lo que una reducción de la calidad del recurso, genera efectos negativos sobre dichos ecosistemas, por lo que es necesario recuperar o mantener la calidad de sus aguas para la conservación de la biodiversidad, no solo por su valor intrínseco, sino también por su servicio fundamental para la vida del ser humano.

Ante esto, una herramienta complementaria que puede ser utilizada en las normas secundarias son los bioensayos de toxicidad, los cuales permiten determinar los impactos producidos sobre comunidades acuáticas, los usos prioritarios y/o el estado trófico de los lagos, canales, fiordos y estuarios, entre otros. Es por esto, que los bioensayos son utilizados como una fuente de información predominante para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos en los cuerpos de agua (CONAMA, 2004).

1.5 Uso de bioensayos

Los bioensayos son herramientas de diagnóstico para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Castillo, 2004). Los cuales se pueden clasificar de acuerdo a:

- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación o de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etc.

1.5.1 *Uso de Lemna sp en bioensayos.*

Las Lemnáceas, comúnmente llamadas lentejas de agua son plantas macrófitas monocotiledóneas que se adaptan a una amplia variedad de zonas geográficas y climáticas, su prolongación suele ocurrir a través de inundaciones y por aves acuáticas. Son plantas flotantes que se encuentran sobre la superficie del agua formando colonias en cuerpos de agua límnicos y crecen rápidamente en sistemas de aguas calmadas y ricas en nutrientes. Su origen es en América del Sur, aunque actualmente su distribución es mundial (Landolt, 1980).

Morfológicamente, son pequeñas, alcanzan los 4 mm de longitud y 2 mm de ancho, posee forma taloide, es decir, no se diferencian el tallo de las hojas, su fronda puede ser de forma ovoide o elíptica dependiendo de la especie, es de color verde y con una sola raíz delgada de color blanco (Arroyave, 2004) (Luévano, 2016).

Esta planta es utilizada en diferentes aplicaciones, entre ellas las que más destacan son: (Landolt & Schmidt-Mumm, 2009)

- Como alimentos para aves, pescados, camarones cerdos y ganado.
- Como fuente de energía para la fermentación y producción de metano o etanol.

- Para el tratamiento de aguas residuales, ya que remueve nitrógeno, fosforo y metales entre otros.
- En la regulación de ecosistemas acuáticos, ya que proporciona condiciones de hábitat necesarias para el crecimiento de otros organismos y además limitan el crecimiento de poblaciones de mosquitos.
- Como organismos bioindicadores en bioensayos ecotoxicológicos.

Con respecto a este último punto, según Mason (1984), en su libro enumera las características que debe poseer un organismo para que sea adecuado en la ejecución de bioensayos, en los siguientes puntos:

- El organismo debe ser sensible a las sustancias analizadas.
- Su distribución debe ser amplia y su disponibilidad en cantidades suficientes.
- Debe ser importante desde el punto de vista económico, recreativo o ecológico, tanto a nivel local como nacional.
- Debe poder cultivarse fácilmente en el laboratorio.
- Debe ser compatible con las técnicas de bioensayos.

En este ámbito, la especie *Lemna sp.* posee todas las características, pues es una especie capaz de absorber y eliminar cantidades significativas de metales tóxicos de soluciones acuosas. También, es una planta con una tasa de crecimiento rápido, es tolerante a los factores ambientales como la temperatura, se encuentra disponible en esteros donde exista un grado de estancamiento de agua y se adapta fácilmente a condiciones de laboratorio.

Las especies *Lemna minor* y *Lemna gibba* son las más utilizadas como plantas modelo para evaluar los riesgos ecológicos que producen los contaminantes para la salud ambiental y humana (Nurcan, 2016).

1.5.2 *Lemna minúscula*

Es una planta frecuentemente solitaria (Figura 1), rara vez permanecen más de 2 conectadas. Miden de 1.0 a 2.5 mm de largo y entre 0.7 y 1.5 mm de ancho, su contorno suele ser ovoide

y de ápice redondeado (tabla 1). En la superficie es ligeramente convexa y con un nervio distintivo. Es de color verde claro (Daubs, 1965). Posee pequeñas bolsas reproductivas que se encuentran unidas más en la parte basal que lateral, tiene espátula abierta, fruto de larga excreción que se estrecha hacia el término, semilla alargada, transversalmente estriada. (Landolt,1986)



Figura 1: Lemna minúscula en laboratorio

Es comúnmente confundida con *Lemna valdiviana*, la cual es más alargada, asimétrica en la base y se presenta de forma más conglomerada, sin embargo, poseen características similares en cuanto a floración y fructificación.

La fruta y la semilla de *L. minúscula* son ligeramente más pequeñas en circunferencia y la fruta puede dirigirse hacia fuera desde la base de la planta de manera similar a la forma de unión de la fronda hija. La distribución geográfica de *L. minúscula* es más restringida, encontrándose en la parte occidental de Estados Unidos, principalmente en California y en Sudamérica en Chile, Argentina y Uruguay. En cambio *L. valdiviana* tiene una mayor área de distribución en el este y sur de Estados Unidos y México y en sectores de Europa (Daubs, 1965).

En las Figuras 2 y 3 se observan las diferencias entre ambas especies de Lemnas:

Tabla 2: Diferencias entre *L. minúscula* y *L. valdiviana*.

		<i>L.</i> <i>minúscula</i>	<i>L.</i> <i>valdiviana</i>
Tamaño (mm)	Largo	1.0 - 2.5	2.5 - 5.0
	Ancho	0.5 - 1.5	0.5 - 1.5
Forma	Contorno	ovalado	elíptico
	Ápice	obtuso	obtuso
	Base	simétrica, obtusa	fuertemente asimétrica
Color		verde medio	verde suave
Conformación superficie superior		de plana a ligeramente convexa	aplanada
Conformación superficie inferior		de plana a ligeramente convexa	plana
Nervatura		Delgada, cilíndrica	no prominente
Vaina de raíz		obtusa	fuertemente curvada, obtusa
Fruta	Forma y posición	alargada	elipsoide
	Número de semillas	1	1
	Posición óvulo	ortótropo	ortótropo
Semilla	Forma	alargada	elipsoide
	Superficie	acanalada	acanalada

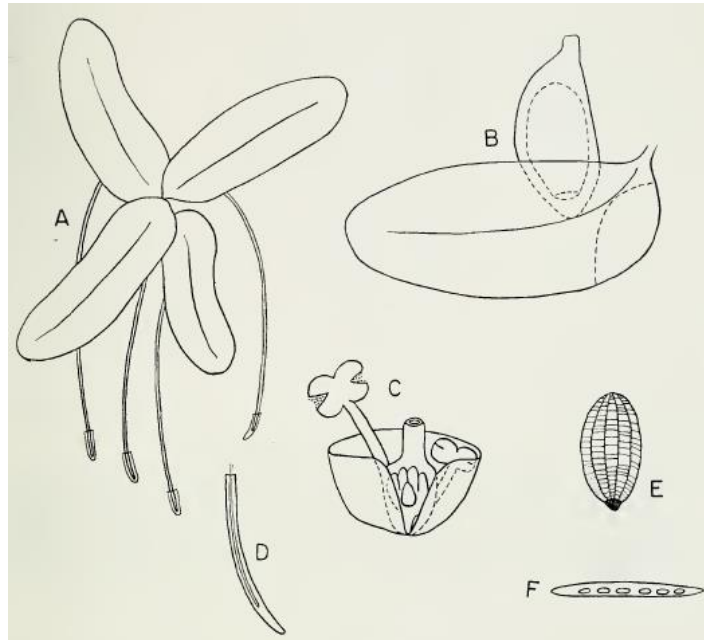


Figura 2: Morfología *Lemna valdiviana*. (A: características de la fronda, B: Fruta alargada y base asimétrica de la fronda, C: estructura floral típica, mostrando también ortótropos, D: punta de la raíz fuertemente curvada, E: semilla, F: sección media transversa)

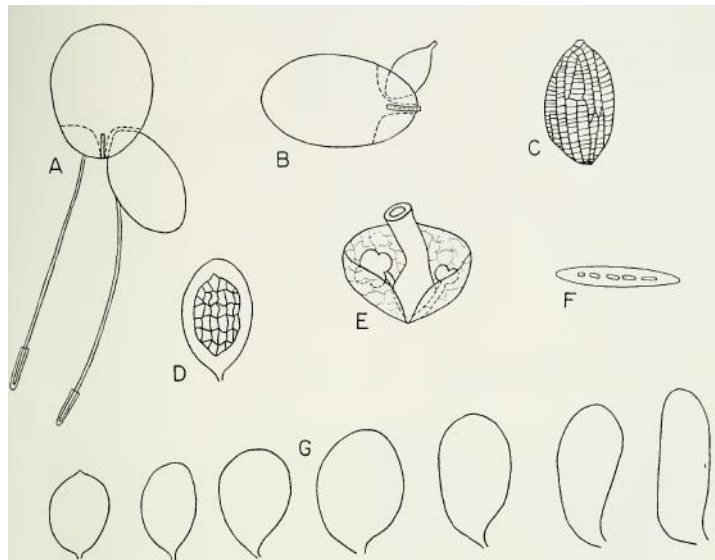


Figura 3: Morfología *Lemna minúscula*. (A: Fronda madura de forma característica con fronda hija mostrando el apego típico, B: forma típica de la fruta y su apego, C: semilla, D: ubicación de espacios aéreos, lo que hace que fronda tenga un margen fino, E: flores)

2 Problema

Las actividades antropogénicas tales como industriales, doméstica y agrícolas entre otras generan residuos que pueden tener agentes químicos potencialmente tóxicos, los cuales pueden llegar directa o indirectamente a los ecosistemas acuáticos.

Las macrófitas acuáticas están entre los organismos que pueden verse afectados de forma adversa. Estos efectos pueden provocar daños a los otros componentes de estos ecosistemas, debido a que las plantas acuáticas son la base de las tramas tróficas acuáticas.

El Estero Limache y el Estero Quilpué, ubicados en la región de Valparaíso, son receptores de los residuos provenientes de las diversas actividades antrópicas que se realizan en sus cuencas. Son pocos los estudios publicados sobre la calidad ecotoxicológica de estas aguas superficiales por lo que se desconoce el efecto sobre las macrófitas acuáticas, lo que es importante, ya que cualquier efecto amenazaría a los niveles tróficos superiores, poniendo en riesgo la conservación de la biodiversidad acuática.

Es importante destacar que el Estero Limache actualmente se encuentra como sitio Prioritario para la Conservación de la Biodiversidad, además es considerado como un afluente del río Aconcagua por lo que está propuesto como área de vigilancia para la dictación de una norma secundaria para el río Aconcagua, no obstante lo anterior, son escasos los estudios publicados sobre calidad ecotoxicológica de las aguas de estos esteros sobre las macrófitas acuáticas, ya que aunque existe información sobre la exposición a agentes químicos de manera individual, no es suficiente para determinar los efectos, puesto que estos cuerpos de agua son mezclas complejas de agentes químicos los que pueden generar diferentes tipos de interacciones.

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se estudia la calidad de las aguas de los esteros de Limache y de Quilpué mediante el uso de bioensayos de toxicidad con la macrófita acuática *Lemna minúscula* mediante el análisis de cuatro variables respuesta.

3 Hipótesis

Las aguas de los esteros de Limache y de Quilpué contienen agentes químicos en mezclas complejas que generan efectos tóxicos sobre la macrófita de agua dulce *Lemna minúscula*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad de las aguas del Estero Limache y Estero Quilpué mediante el bioensayo de toxicidad con *Lemna minúscula*.

4.2 Objetivos específicos

1. Implementar la metodología de bioensayo como alternativa para su uso en normas secundarias de Calidad Ambiental de aguas superficiales.
2. Caracterizar física y químicamente las aguas superficiales en el área de estudio.
3. Determinar la toxicidad de las aguas superficiales del Estero Limache y Estero Quilpué en los puntos seleccionados.
4. Comparar la respuesta de *Lemna minúscula* entre los puntos seleccionados.
5. Correlacionar las respuestas de *Lemna minúscula* con los resultados obtenidos con las variables físicas y químicas de los esteros.

5 Metodología

5.1 Implementación de bioensayo

Para la implementación del bioensayo con la lenteja de agua, se utilizó la metodología estandarizada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 2012): “Prueba de toxicidad para plantas acuáticas utilizando *Lemna sp*”. Para ello, se utilizó Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como tóxico de referencia para determinar la concentración de inhibición (IC50) del cobre en las plantas.

5.2 Determinación de toxicidad de las aguas superficiales de los esteros Limache y Quilpué

5.2.1 Área de estudio

5.2.1.1 Estero Limache

El estero Limache es el principal cuerpo de agua para la Provincia de Marga-Marga en la Región de Valparaíso. Fluye con morfología de ritrones y posee una extensión de 50 km y una superficie de 573 km², conformando una hoya de régimen pluvial en la cuenca del río Aconcagua, uniéndose a éste por la izquierda a 8 km del mar en Concón Alto. Tiene cabeceras en la vertiente poniente de los cerros La Campana y El Roble y del cordón de La Dormida, donde se junta con los esteros Las Palmas, Quebrada Alvarado y Pelumpén. Bisecta la ciudad de Limache y sigue al Oeste casi paralelo al curso del río Aconcagua. Presenta clima mediterráneo templado. (Aranda *et al.*, 2014)

De acuerdo a Córdova (2007), el estero Limache es la base para diferentes actividades antrópicas como, por ejemplo, para riego agrícola, extracción de áridos, actuando como receptáculo de la descarga del efluente de la planta de tratamiento de aguas y también para actividades recreativas.

5.2.1.2 Estero Quilpué

El Estero Quilpué también se ubica en la Provincia de Marga Marga, tiene una longitud de 17 km y nace al suroriente de la comuna de Villa Alemana. Sus principales afluentes son los esteros EL Belloto, El Retiro y Severín. Posee un régimen de alimentación pluvial, con escorrentías intermitentes, aumentando de caudal e invierno y reduciéndose en verano. Ocasionalmente posee alimentación nival cuando se producen precipitaciones sólidas en el sector de los Altos de Colliguay. Su cauce se alimenta de diferentes quebradas y esteros, los que a veces atraviesan los sectores urbanos, produciendo así, situaciones de contaminación producto del aporte de aguas servidas domiciliarias o basura en tramos expuestos.

Presenta un clima templado cálido con lluvias invernales. En su cauce drenan una gran cantidad de quebradas y esteros más pequeños, los que dotan de vegetación terrestre y acuática, sustentando numerosas especies de animales, sirviendo como corredor biológico para diversas aves, anfibios, peces insectos y otros grupos de animales (Becerra & Reyes, 2016) (Muñoz & Veliz, 2017)

5.2.2 Elección del material de estudio

Para este estudio se eligió como organismo de prueba *Lemna minúscula*, la cual ha sido ampliamente utilizada en ensayos toxicológicos en diversos países debido a sus numerosas ventajas mencionadas anteriormente, destacando su capacidad bioacumuladora de agentes químicos como plaguicidas y metales pesados entre otros, por adaptarse fácilmente a condiciones de laboratorio y por la rapidez, simplicidad y sensibilidad del test (Gür *et al.*, 2016).

Este bioensayo con la especie *Lemna sp* ha sido recomendado por las agencias estatales de los Estados Unidos y por la Organización Internacional para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) los cuales han afirmado que *Lemna sp* es más sensible a los herbicidas y a los metales pesados que a los productos químicos industriales (Arroyave, 2004). También existen estudios donde se ha comparado la *Lemna sp* con otros organismos de prueba donde se ha demostrado que la lenteja de agua es más sensible en los estudios en función de varios

puntos finales, incluido el número de frondas, las tasas de crecimiento y biomasa seca (Gür *et al.*, 2016).

5.2.3 Recolección y cultivo.

El organismo de prueba fue recolectado desde la Laguna Sausalito (71°53'69.44''O 33°01'10.97''S), y posteriormente transportados en recipientes plásticos junto con agua del mismo sector para ser analizadas en el Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Ingeniería en Medioambiente de la Universidad de Valparaíso.

En el laboratorio se seleccionaron las plantas que tuvieran características similares como tamaño de fronda, raíz y color las cuales fueron inoculadas con la misma agua recolectada de la laguna para su climatización.

Posteriormente, se utilizó el medio 20X-AAP para el cultivo de las plantas, el cual se describe en la Tabla 3. Se mantuvieron por un período de 7 días con dos recambios en los días 2 y 4 para evitar la aparición de algas.

Tabla 3: Preparación del medio 20X-AAP (USEPA, 2012).

Macronutrientes	Fórmula química	Concentración
Nitrato de Sodio	(NaNO ₃)	12,750 g
Cloruro de Magnesio hexa hidratado	(MgCl ₂ * 6H ₂ O)	6,082 g
Cloruro de Calcio di hidratado	(CaCl ₂ *2H ₂ O)	2,205 g
Sulfato de Magnesio hepta hidratado	(MgSO ₄ * 7H ₂ O)	7,350 g
Fosfato de Potasio	(K ₂ HPO ₄)	0,522 g
Bicarbonato de Sodio	(NaHCO ₃)	7,500 g
Micronutrientes		
Ácido Bórico	(H ₃ BO ₃)	92,760 mg

Continuación tabla n°3		
Cloruro de Manganeso tetra hidratado	(MnCl ₂ * 4H ₂ O)	207,690 g
Cloruro de Zinc	(ZnCl ₂)	1,635 mg
Cloruro Férrico hexa hidratado	(FeCl ₃ * 6H ₂ O)	79,880 mg
Cloruro de Cobalto hexa hidratado	(CoCl ₂ * 6H ₂ O)	0,714 mg
Molibdato de Sodio di hidratado	(NaMoO ₄ * 2H ₂ O)	3,630 mg
Cloruro de Cobre di hidratado	(CuCl ₂ * 2H ₂ O)	0,006 mg
Etilendiaminotetraacetato Disódico Dihidrato	(Na ₂ EDTA * 2H ₂ O)	150,000 mg

El pH fue ajustado a $7,5 \pm 0,1$ con 0,1 N o 1,0 N de hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl), respectivamente.

6 Diseño de muestreo

6.1 Implementación de bioensayo

El estudio se realizó entre el 15 de Octubre y 30 de Noviembre del 2018 en el Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Ingeniería en Medioambiente de la Universidad de Valparaíso.

Se realizaron 3 pruebas con CuSO₄-5H₂O a diferentes concentraciones y con un número uniforme de frondas. El primer análisis se realizó a concentraciones de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 y 0.1 mg/L, el segundo con concentraciones de 0.1, 0.08, 0.06, 0.04 y 0.02 mg/L y para el tercero se utilizaron concentraciones de 0.09, 0.07, 0.05, 0.04 y 0.02 mg/L.

Después de los 7 días de exposición se determinó la tasa de crecimiento de acuerdo al número y área de frondas y se obtuvo la concentración de inhibición del 50% de la población de lentejas de agua.

6.2 Determinación de toxicidad de las aguas superficiales de los esteros Limache y Quilpué

6.2.1 Caracterización fisicoquímica de las aguas superficiales.

Los muestreos de las aguas superficiales se realizaron entre el 6 y 12 de Noviembre del 2018 para el Estero Limache (Figura 4) y entre el 19 y 26 de Noviembre de 2018 para el Estero Quilpué (Figura 5). Para el análisis, se seleccionaron 5 puntos para ambos esteros, en función de los usos del suelo y actividades antrópicas de sus cuencas. En las tablas 4 y 5 se especifican las coordenadas de los puntos muestreados para cada estero:

Tabla 4: Puntos de muestreo Estero Limache.

Puntos	Sector	Coordenadas
1	Puente Estero Limache (PE)	71°15'58,65"O 32°59'45,16"S
2	Planta de Tratamiento de Aguas (PTA)	71°14'5,92"O 32°59'58,07"S
3	Lo Gamboa (LG)	71°13'19,77"O 33°00'01,40"S
4	Ex Planta (CCU)	71°16'51,08"O 32°59'26,53"S
5	Desembocadura río Aconcagua (DA)	71°26'24,84"O 32°55'56,36"S

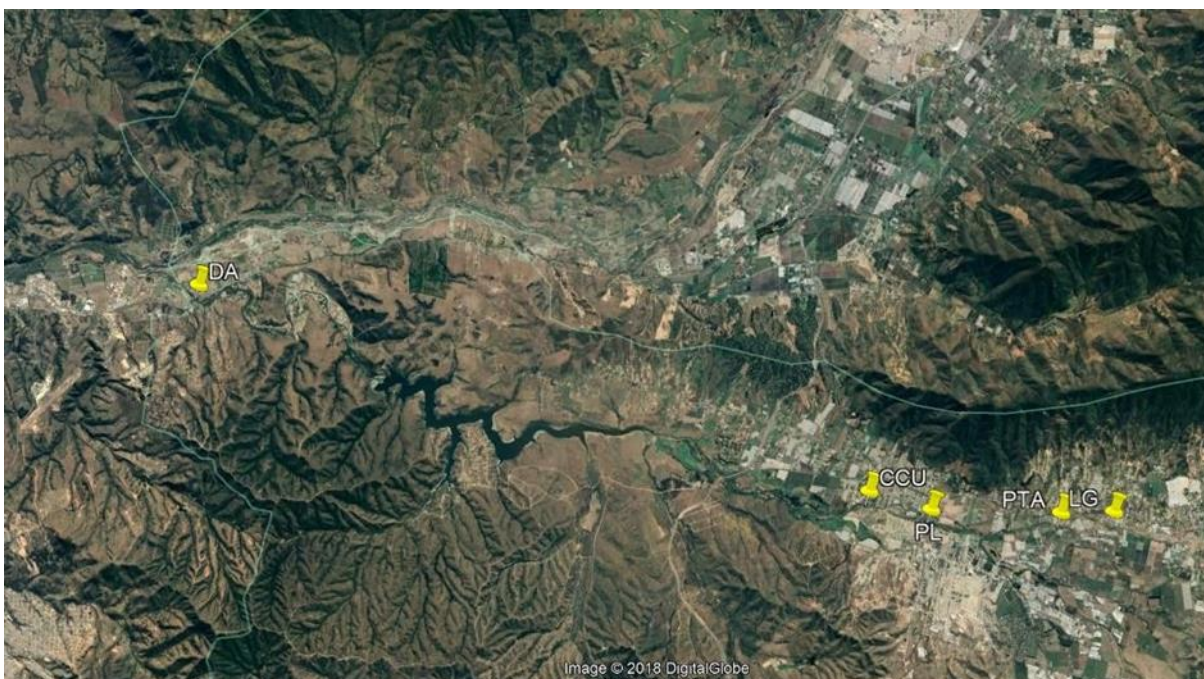


Figura 4: Ubicación de los puntos de muestreo en Estero Limache (DA: desembocadura río Aconcagua, CCU: ex industrias CCU, PL: puente Limache, PTA; planta de tratamiento de aguas, LG: Lo Gamboa).

Tabla 5: Puntos de muestreo Estero Quilpué.

Puntos	Sector	Coordenadas
1	Planta Carozzi (PC)	71°26'31,05''O 33°02'38,11''S
2	Puente de Quilpué (PQ)	71°25'57,08''O 33°02'14,94''S
3	Industrias Knop (IK)	71°24'45,30''O 33°02'29,94''S
4	Zoológico Quilpué (ZQ)	71°27'06,96''O 33°02'30,35''S
5	Colegio Aconcagua (CA)	71°28'37,04''O 33°02'36,93''S

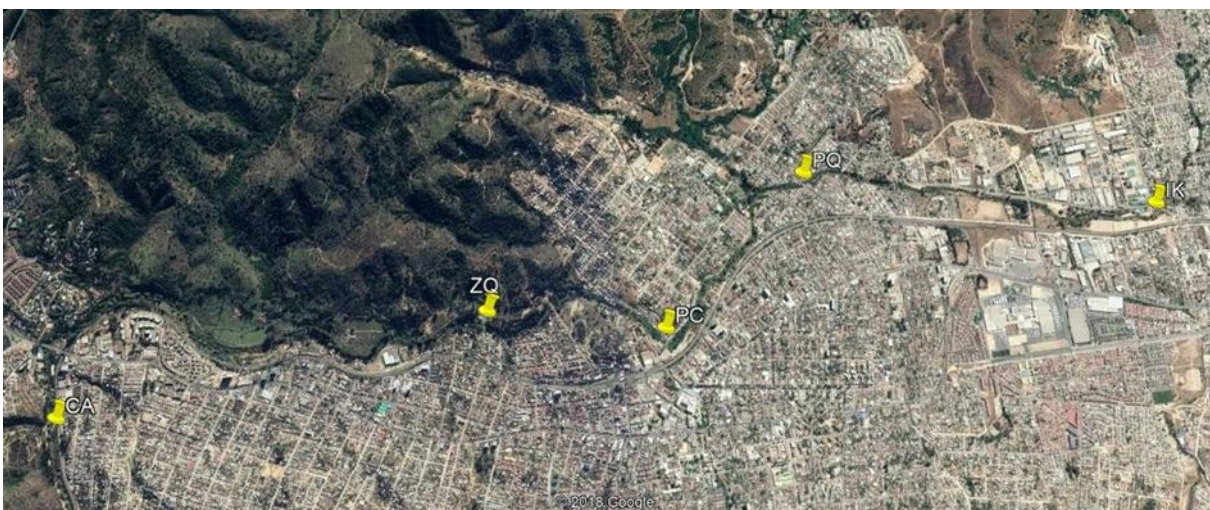


Figura 5: Ubicación de los puntos de muestreo del estero Quilpué. (CA: colegio Aconcagua, ZQ: zoológico Quilpué, PC: planta Carozzi, PQ: puente Quilpué, IK: Industrias Knop).

Se midió *in situ* los siguientes parámetros: Temperatura (T°), pH, Sólidos Suspendedos Totales (SST) y Conductividad (CE). En tanto, en el laboratorio se determinaron las concentraciones de cobre, nitrato y fosfato para los dos esteros en los cinco puntos de muestreo mediante espectrofotometría de absorción.

Posterior a ello, se evaluó la fitotoxicidad de la *Lemna minúscula* mediante tres parámetros para estimar los efectos inhibitorios de crecimiento: el número de frondas, tamaño de la fronda (área de fronda y peso seco) y clorofila total.

En el laboratorio con las muestras colectadas, se determinó la toxicidad sobre *Lemna minúscula* de acuerdo a la metodología propuesta por la USEPA (2012). Las variables respuesta medidas fueron: número de frondas, tamaño de frondas (área de fronda y peso seco) y contenido de clorofila total.

Por cada tratamiento se realizaron 4 réplicas de 4 individuos, las condiciones ambientales del laboratorio fueron: temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo continuado durante 7 días.

Se utilizaron un total de 14 frondas por recipiente, con el mismo número de plantas y frondas (dos plantas con 4 frondas y dos plantas con 3 frondas). Para el control se utilizó el mismo medio nutritivo utilizado para el cultivo de las lentejas de agua.

Los análisis en el laboratorio para el Estero Limache se realizaron entre el 6 y el 13 de Noviembre del 2018 y para el Estero Quilpué se realizaron entre el 19 y el 26 de Noviembre del 2018.

6.2.2 *Determinación de las variables respuesta.*

6.2.2.1 Número de frondas

El número de frondas en cada recipiente se observó durante los días 2, 4 y 7, mediante un microscopio de disección y se llevó un registro mediante fotografías. Se tomó en cuenta como fronda cualquier brote que fuera visible al momento de observar sobre el microscopio.

6.2.2.2 Tamaño de las frondas

El tamaño de las frondas se determinó por medio de la medición de peso seco y por el área de fronda; los cuales son medidos al inicio y término de la prueba.

Para el peso seco, se tomó una muestra representativa de las plantas (incluidas las raíces y los fragmentos de la raíz) desde el mismo medio de cultivo de las utilizadas en el experimento. Se enjuagaron con agua destilada y posteriormente fueron secadas en la estufa a 60 °C y enfriadas en un desecador, finalmente se pesaron en una balanza analítica.

Al finalizar el experimento, se realizó el mismo procedimiento para las distintas réplicas. Para calcular el peso seco se utilizó la siguiente ecuación:

$$W_{fronda} = \frac{W_{total}}{n} \quad (1)$$

Donde:

W_{total} = Peso seco total de la biomasa en el recipiente de prueba al final del test.

n = El número de frondas en el recipiente de prueba al final del test.

Para el área de las frondas, se determinó mediante el programa ImageJ, en el cual se analizaron las fotografías tomadas en el día cero, dos, cuatro y siete.

6.2.2.3 Tasa de crecimiento específico

La tasa de crecimiento específico se calculó como se muestra en la ecuación n° 2:

$$r_{i-j} = \frac{\ln(b_j) - \ln(b_i)}{t} \quad (2)$$

Donde:

Ri-j = tasa de crecimiento específico promedio de biomasa (número de frondas o peso seco) desde el tiempo i hasta el tiempo j (día⁻¹)

Bi = biomasa observada (número de frondas o peso seco) al comienzo del intervalo de observación, tiempo i.

Bj = biomasa observada (número de frondas o peso seco) al término del intervalo de observación, tiempo j.

t = período de tiempo desde i a j en días.

6.2.2.4 Medición de clorofila total

Para la prueba del contenido total de clorofila se utilizó la metodología propuesta por Hansmann (1973), en la cual se procedió a moler una cantidad representativa de plantas década réplica de los cinco puntos más el control, posteriormente, se diluyeron en acetona al 90% y se dejaron en oscuridad y a 4 °C durante 24 horas.

Finalizado este período y mediante la utilización de un espectrofotómetro se midió clorofila a dos absorbancias: 647 y 630 nm, utilizando como blanco acetona.

Para los cálculos se utilizó la ecuación de Inskeep y Bloom (1985) (ecuación n° 3):

$$Cl_{total} = (17,95 * A_{647}) + (7,9 * A_{630}) \quad (3)$$

6.2.2.5 Porcentaje de inhibición

Para cada variable respuesta, se calculó el porcentaje de inhibición (%) en cada tratamiento usando la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{(C-X)(100)}{C} \quad (4)$$

Dónde:

C = valor de respuesta media de control (rendimiento o tasa de crecimiento específico promedio).

X = valor de respuesta media del experimento (rendimiento o tasa de crecimiento específico promedio).

6.2.3 Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el análisis de varianza ANOVA, con un valor de significancia $p < 0,05$ y se compararon mediante el test de Tukey. Para correlacionar la respuesta de los puntos finales de *Lemna minúscula* se utilizó la correlación lineal de Pearson.

7 Resultados

7.1 Implementación de bioensayo con Sulfato de Cobre pentahidratado (CuSO₄ - 5H₂O)

7.1.1 Número de fronda

En la tabla 6 se observa que, a los 0,05 mg/L existe una inhibición el 50% del número de frondas, con una tasa de crecimiento promedio de 2,30 día⁻¹.

Tabla 6: Porcentaje de inhibición, tasa de crecimiento y desviación estándar para el ensayo con CuSO₄ respecto al número de frondas.

Concentraciones (mg/L)	%IC(%)	Tasa crecimiento (día⁻¹)
Control	0	6,71 ± 0,6
0,02	52,2	2,29 ± 0,6
0,04	52,6	2,25 ± 1,0
0,05	49,6	2,54 ± 1,0
0,07	52,2	2,29 ± 0,4
0,09	52,6	2,25 ± 1,5

En la Figura 6 se aprecia que al segundo día de exposición ya existe una diferencia con respecto al control, en donde el número de frondas comienza a disminuir.

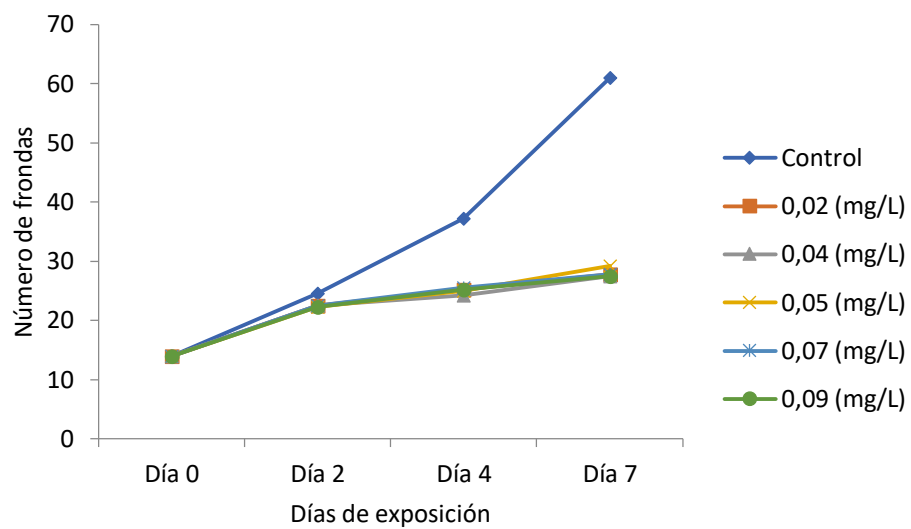


Figura 6: Número de frondas de las diferentes concentraciones con CuSO_4 . ($p < 0,05$)

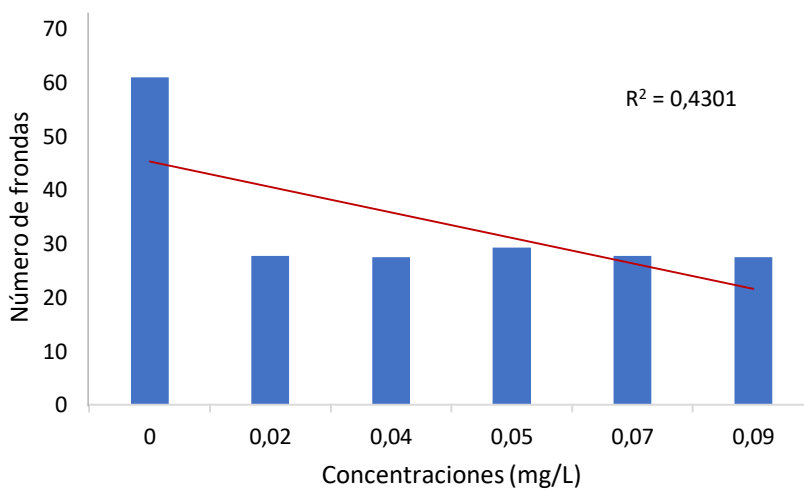


Figura 7 Regresión lineal entre número de frondas y las diferentes concentraciones de CuSO_4 .

7.1.2 Tamaño de fronda

Los porcentajes de inhibición y la tasa de crecimiento para el ensayo con Sulfato de Cobre se muestran en la tabla 7, donde se encontró que a los 0,05 mg/L hay un 50,25% de inhibición del área de la fronda.

Tabla 7: Porcentaje de inhibición, tasa de crecimiento y desviación estándar para el ensayo con CuSO_4 respecto al área de las frondas.

Concentraciones (mg/L)	%IC(%)	Tasa crecimiento (día⁻¹)
Control	0	0,288 ± 0,05
0,02	15,21	0,210 ± 0,2
0,04	22,01	0,206 ± 0,1
0,05	50,23	0,007 ± 0,3
0,07	55,7	-0,124 ± 0,2
0,09	72,5	-0,201 ± 0,0

En la Figura 8 se aprecia el crecimiento del área de las frondas en los 7 días de experimentación. Ya al segundo día de exposición se observan diferencias, mientras que ya al cuarto día comienza a disminuir el crecimiento a los 0,05 mg/L.

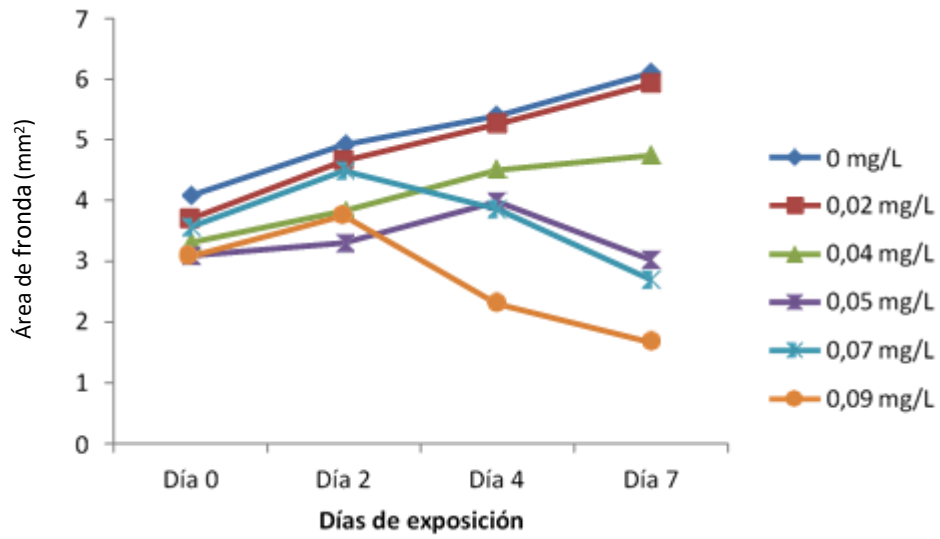


Figura 8: Área de frondas de las diferentes concentraciones en ensayo con CuSO_4 ($p < 0,05$)

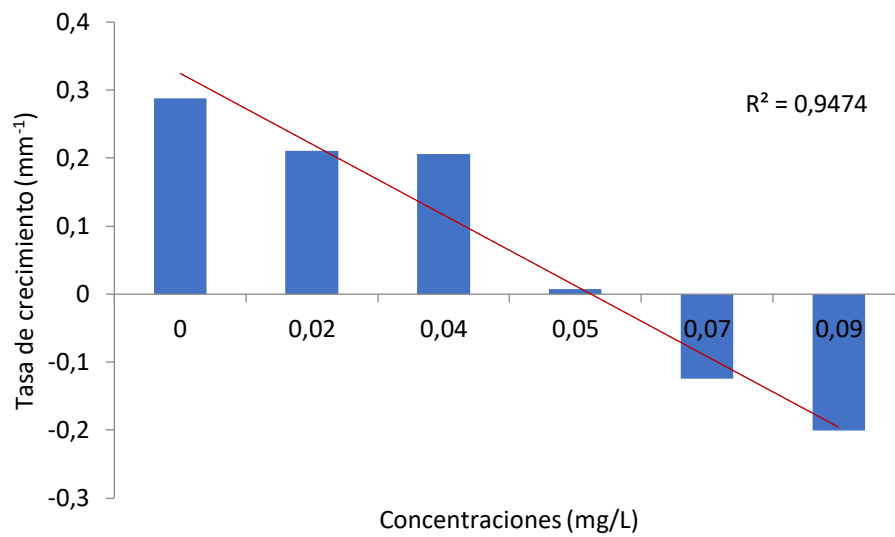


Figura 9: Regresión lineal entre la tasa de crecimiento del área de frondas y las diferentes concentraciones de CuSO_4 .

7.2 Determinación de toxicidad de las aguas superficiales de los esteros Limache y Quilpué

7.2.1 Caracterización física y química de las aguas superficiales

7.2.1.1 Estero Limache

En la tabla 8 se observan los parámetros fisicoquímicos donde se puede destacar el pH, el cual fue con tendencia alcalina, la temperatura fluctuó entre los 18 y 21 °C, para la conductividad eléctrica el valor más alto fue 2841 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para la estación de Puente Limache, el cual fue cuatro veces mayor a la registrada en la desembocadura del río Aconcagua. Para los sólidos suspendidos totales se observó la misma tendencia. Con respecto a los fosfatos, la concentración más alta se registró en la zona de Lo Gamboa y la menor en la zona de la Planta de Tratamiento de Agua. Caso contrario, para los nitratos, el valor más bajo se registró en la Desembocadura del río Aconcagua y el valor más alto en el Puente Limache. Con respecto a las concentraciones de cobre encontradas en las diferentes estaciones, la planta de tratamiento de agua fue donde se encontró menor cantidad de cobre y la ex industria CCU la mayor.

Tabla 8: Parámetros físicos y químicos de los puntos de muestreo de Estero Limache.

Sector	pH	Temperatura (°C)	Conductividad Eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Sólidos suspendidos totales (ppt)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Cobre ($\mu\text{g}/\text{L}$)
PE	8.4	21.86	2841	1.421	3.72	28.4	3.0	397
PTA	8.0	18.72	821	0.411	2.88	23.1	1.6	208
LG	8.0	20.90	1330	0.66	1.92	16.8	20.2	229
CCU	8.0	18.39	820	0.411	3.67	20.4	9.4	413
DA	8.0	20.37	685	0.343	4.01	4.8	2.1	304

*PE: Puente Estero Limache, PTA: Planta de tratamiento de agua, LG: Lo Gamboa, CCU: Ex Industria CCU, DA: Desembocadura río Aconcagua

7.2.1.2 Estero Quilpué

Como se aprecia en la tabla 9, los valores de pH fluctuaron entre 7.66 y 8.24 presentando también una tendencia a la alcalinidad. Por su parte, la temperatura varió entre los 18y y 19 °C. Los valores de conductividad eléctrica estuvieron cerca de los 700 $\mu\text{S}/\text{cm}$ siendo el más alto en la Industria Knop con 785 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Para el caso de los sólidos suspendidos totales, éstos no variaron significativamente y se mantuvieron en los 0,3 ppt.

Con respecto a los nitratos, éstos fueron mayores en el Puente de Quilpué y menores en la zona del Zoológico. Mientras que, para los fosfatos, los valores más altos se encontraron en la Planta Carozzi y los menores en Industrias Knop y Colegio Aconcagua, ambos con el mismo valor.

En tanto los valores de cobre oscilaron entre los 70 y 242 $\mu\text{g}/\text{cm}$, siendo la zona del zoológico la que obtuvo menor concentración de cobre y la Planta Carozzi la mayor.

Tabla 9: Parámetros físicos y químicos de los puntos de muestreo de Estero Quilpué.

Sector	pH	Temperatura (°C)	Conductividad Eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Sólidos suspendidos totales (ppt)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Cobre ($\mu\text{g}/\text{L}$)
PC	7.66	18.72	688	0.352	10.92	22.4	3.6	242
PQ	7.99	19.70	751	0.376	6.96	26.1	2.1	113
IK	8.02	18.70	785	0.393	8.44	17.1	1.2	167
ZQ	7.98	18.45	716	0.383	9.64	9.4	1.3	70
CA	8.24	19.18	767	0.384	9.22	15.7	1.2	211

*PC: Planta Carozzi, PQ: Puente Quilpué, IK: Industrias Knop, ZQ: Zoológico Quilpué, CA: Colegio Aconcagua.

7.2.2 Determinación de la toxicidad de aguas superficiales

7.2.2.1 Número de frondas

En las tablas 10 y 11 se muestra el aumento al 2°, 4° y 7° día del número de frondas de *L. minúscula* en los diferentes puntos del Estero Limache y Estero Quilpué respectivamente. Para este último, las concentraciones al séptimo día estuvieron cerca del 50%.

Tabla 10: Crecimiento del número de frondas de *L. minuta* en los diferentes puntos de muestreo del Estero Limache durante los 7 días de exposición.

Puntos de muestreo	Número de fronda			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
Control	14	20	34,5	69,5
Puente Estero (PE)	14	19,5	32,25	49,2
Planta de Tratamiento de agua (PTA)	14	22,2	40,5	76,5
Lo Gamboa (LG)	14	17,2	24,7	25,5
Ex industrias CCU (CCU)	14	23,7	40,2	61,2
Desembocadura río Aconcagua (DRA)	14	22,7	31	42

Tabla 11: Crecimiento del número de frondas de *L. minuta* en los diferentes puntos de muestreo del Estero Quilpué durante los 7 días de exposición.

Puntos de muestreo	Número de fronda			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
Control	13	20,5	43	84,5
Planta Carozzi (PC)	13	21	32	46,2
Puente Quilpué (PQ)	13	23,5	31	43,2
Industria Knop (IK)	13	19,7	32	45,7
Zoológico Quilpué (ZQ)	13	20	30	43,2
Colegio Aconcagua (CA)	13	20	32,2	43,5

Para el Estero Limache, se observa en la Figura 10 que el crecimiento del número de frondas fue menor que el control en todos los puntos de muestreos a excepción de la Planta de Tratamiento de Agua donde hubo una estimulación del crecimiento, duplicándose hasta cinco veces más. El crecimiento más bajo se observó en la estación de Lo Gamboa donde se duplicó menos de dos veces.

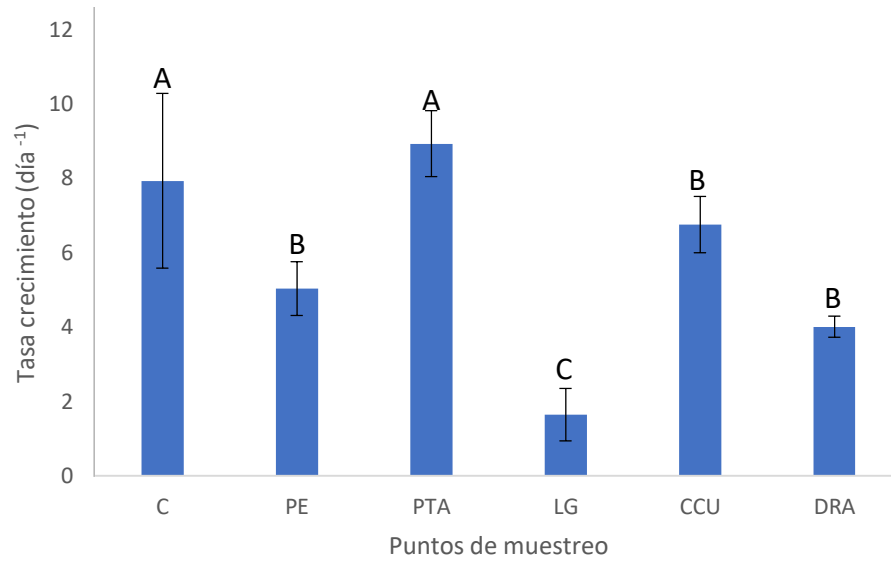


Figura 10: Tasa de crecimiento para el número de frondas en Estero Limache \pm desviación estándar. (C: control, PE: puente estero Limache, PTA: planta de tratamiento de agua, LG: Lo Gamboa, CCU: ex industrias CCU, DRA: desembocadura río Aconcagua) ($p < 0,05$)

Para el Estero Quilpué, en todas las estaciones hubo toxicidad diferente al control y similares entre sí (Figura 11), siendo los puntos de las industrias Knop y el zoológico los valores más pequeños.

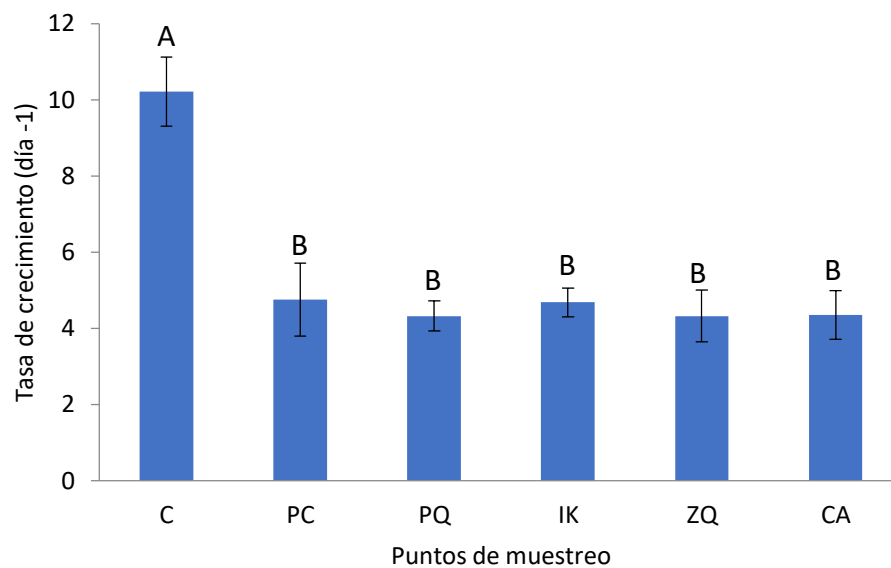


Figura 11: Tasa de crecimiento para el número de frondas en Estero Quilpué \pm desviación estándar. (C: control, PC: planta Carozzi, PQ: puente Quilpué, IK: industrias Knop, ZQ: zoológico Quilpué, CA: colegio Aconcagua) ($p < 0,05$)

7.2.2.2 Tamaño de fronda

7.2.2.2.1 Área de frondas

En las tablas 12 y 13 se muestran los valores obtenidos con respecto al área de las frondas en los Esteros Limache y Quilpué respectivamente en los días 2, 4 y 7 del experimento. Los valores entre ambos esteros son similares en el último día de exposición variando desde 4, 14 a 5,34 frondas.

Tabla 12: Crecimiento del área de frondas de *L. minuta* en los diferentes puntos de muestreo del Estero Limache durante los 7 días de exposición.

Puntos de muestreo	Área de fronda (mm ²)			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
Control	2,30	3,04	3,57	5,18
Puente Estero (PE)	2,55	3,16	3,64	4,14
Planta de Tratamiento de agua (PTA)	2,41	2,53	3,21	4,66
Lo Gamboa (LG)	2,78	3,67	4,29	4,94
Ex industrias CCU (CCU)	2,94	4,19	4,71	4,78
Desembocadura río Aconcagua (DRA)	2,97	3,71	4,28	4,88

Tabla 13: Crecimiento del área de frondas de *L. minuta* en los diferentes puntos de muestreo del Estero Quilpué durante los 7 días de exposición.

Puntos de muestreo	Área de fronda (mm ²)			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
Control	3,58	4,36	5,16	5,34
Planta Carozzi (PC)	3,35	3,42	3,52	5,01
Puente Quilpué (PQ)	4,00	4,01	4,24	5,06
Industria Knop (IK)	3,34	4,19	4,28	4,72
Zoológico Quilpué (ZQ)	3,39	4,25	4,83	5,12
Colegio Aconcagua (CA)	2,59	4,20	4,28	4,73

En la Figura 12 se observa que la tasa de crecimiento de las áreas de las frondas no varía significativamente con respecto al control en el Estero Limache, siendo en el puente Limache (PL) el lugar donde hubo una tasa menor y en la Planta de Tratamiento de Agua (PTA) el mayor.

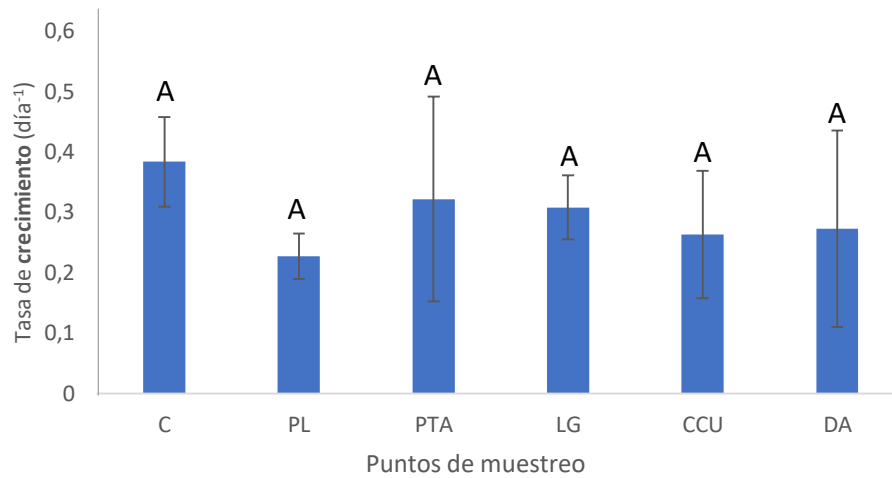


Figura 12: Tasa de crecimiento para el área de las frondas del Estero Limache \pm desviación estándar. (C: control, PE: puente estero Limache, PTA: planta de tratamiento de agua, LG: Lo Gamboa, CCU: ex industrias CCU, DA: desembocadura río Aconcagua) ($p > 0,05$)

Con respecto al Estero Quilpué, en la Figura 13 se aprecia que en la planta Carozzi, zoológico y Colegio Aconcagua la tasa de crecimiento del área de las frondas fue mayor y en el puente Quilpué e industrias Knop, la tasa de crecimiento fue menor.

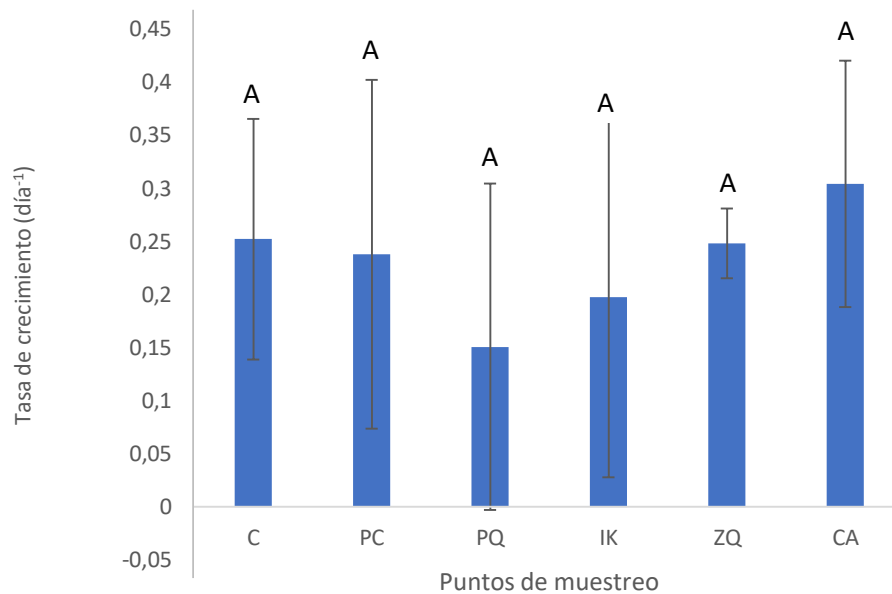


Figura 13: Tasa de crecimiento para el área de frondas en el Estero de Quilpué \pm desviación estándar. (C: control, PC: planta Carozzi, PQ: puente Quilpué, IK: industrias Knop, ZQ: zoológico Quilpué, CA: Colegio Aconcagua) ($p > 0,05$)

7.2.2.2.2 Peso seco

Los valores de peso seco (en gramos) se observan las Figura 14 y 15 para los esteros Limache y Quilpué respectivamente.

Los puntos con mayor valor fueron en la desembocadura del río Aconcagua, ex industrias CCU y en la planta de tratamiento de aguas para el Estero Limache, y en la Planta Carozzi, Colegio Aconcagua e industrias Knop para el Estero Quilpué.

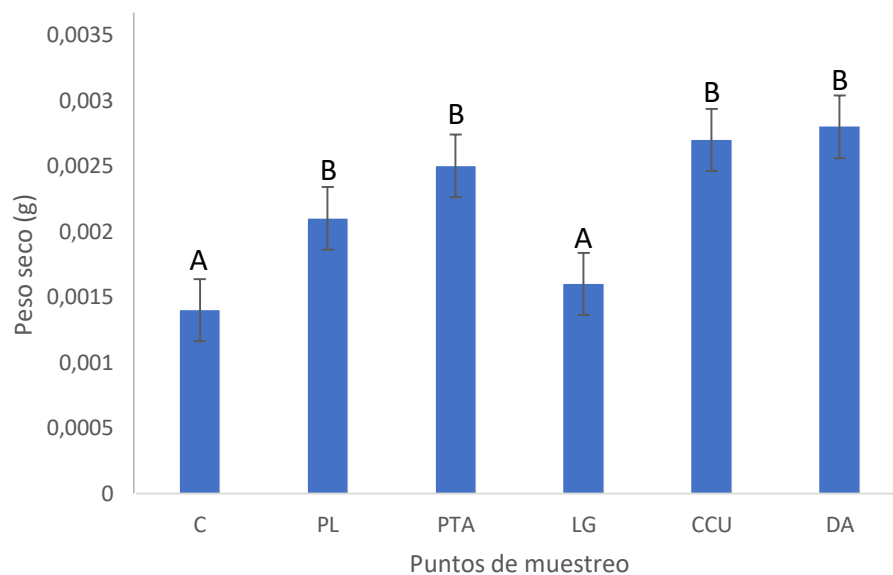


Figura 14: Tasa de crecimiento para el peso seco de las frondas del Estero Limache \pm desviación estándar. (C: control, PE: puente estero Limache, PTA: planta de tratamiento de agua, LG: Lo Gamboa, CCU: ex industrias CCU, DA: desembocadura río Aconcagua) ($p > 0,05$)

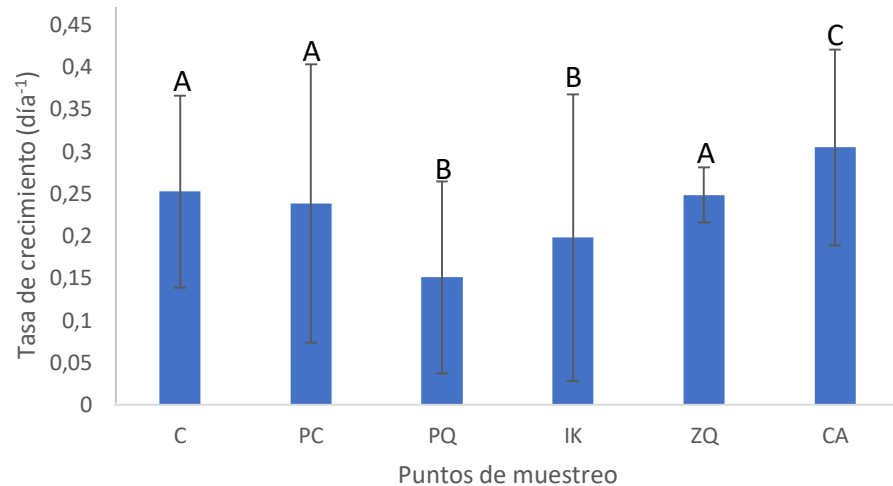


Figura 15: Tasa de crecimiento para el peso seco de frondas en Estero Quilpué \pm desviación estándar. (C: control, PC: planta Carozzi, PQ: puente Quilpué, IK: industrias Knop, ZQ: zoológico Quilpué, CA: colegio Aconcagua) ($p > 0,05$)

7.2.2.3 Contenido de Clorofila total

En la Figura 16 se observan los valores de clorofila total al finalizar el experimento en los puntos muestreados del Estero Limache más el control. Se puede apreciar una baja cantidad de clorofila en la desembocadura del río Aconcagua, mientras que la planta de tratamiento de aguas, Lo Gamboa y la ex industria CCU fueron similares. En el puente Limache (PE) la cantidad de clorofila fue similar al control.

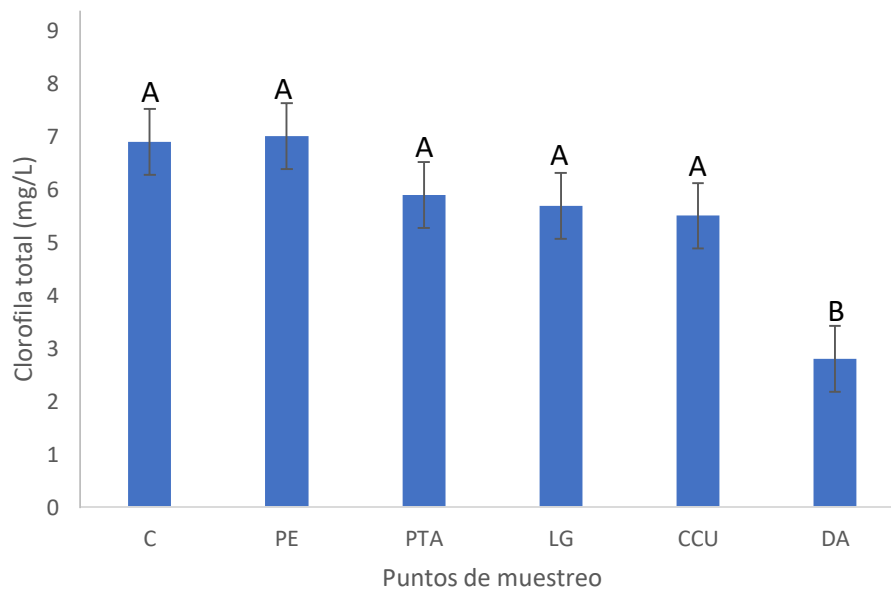


Figura 16: Contenido de clorofila total en las muestras del Estero Limache \pm desviación estándar. (C: control, PE: puente estero Limache, PTA: planta de tratamiento de agua, LG: Lo Gamboa, CCU: ex industrias CCU, DA: desembocadura río Aconcagua) ($p > 0,05$)

Para el caso del Estero Quilpué, se aprecia en la Figura 17 que en todos los puntos el contenido de clorofila total fue mayor con respecto al control, siendo el sector del puente Quilpué el de mayor valor.

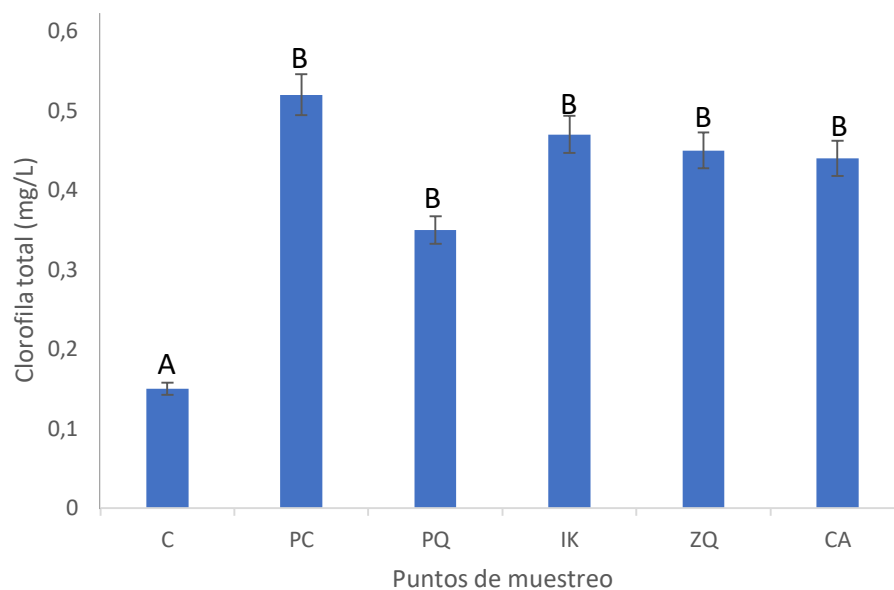


Figura 17: Contenido de clorofila total en las muestras de Estero Quilpué \pm desviación estándar. (C: control, PC: planta Carozzi, PQ: puente Quilpué, IK: industrias Knop, ZQ: zoológico Quilpué, CA: colegio Aconcagua) ($p > 0,05$)

7.2.2.4 Porcentaje de inhibición

En las tablas 14 y 15 se observan los porcentajes de inhibición de los puntos finales evaluados para el Estero Limache y Quilpué respectivamente.

Se puede apreciar que, para el peso seco y contenido de clorofila, los valores superaron el 100% en ambos esteros, por lo que hubo un aumento con respecto al control.

Tabla 14: Porcentajes de inhibición para las cuatro variables respuesta analizadas para el Estero Limache.

Puntos de muestreo	Inhibición frondas (%)	Inhibición área (%)	Inhibición peso (%)	Inhibición Clorofila (%)
Control	0	0	0	0
Puente Estero	29,1	20,1	-50	-0,4
Planta de Tratamiento de Aguas	-10,1	10,1	-78,6	15,1
Lo Gamboa	63,3	4,8	-114	15,3
Ex industrias CCU	11,9	7,8	-92,9	17,8
Desembocadura río Aconcagua	39,6	5,8	-100	57,7

Tabla 15: Porcentajes de inhibición para las cuatro variables respuesta analizadas para el Estero Quilpué.

Puntos de muestreo	Inhibición frondas (%)	Inhibición área (%)	Inhibición peso (%)	Inhibición Clorofila (%)
Control	0	0	0	0
Planta Carozzi	45,3	6,07	-79	-249,2
Puente Quilpué	48,8	5,3	78,6	-136,4
Industrias Knop	45,9	11,6	-107,1	-206,6
Zoológico Quilpué	48,8	4,0	-64,3	-153,3
Colegio Aconcagua	48,5	11,5	-71	-151

7.2.2.5 Correlación de variables respuesta

Las tablas 16 y 17 muestran las correlaciones de Pearson para cada punto final evaluado en ambos esteros. Para el Estero Limache existe una relación lineal negativa entre el peso seco y la clorofila, lo que significa que a medida que el peso seco aumenta, la concentración de clorofila disminuye.

Para el Estero Quilpué se observa una relación lineal negativa entre peso seco y número de fronda y entre clorofila y número de fronda, mientras que para la correlación peso seco-clorofila se observa una relación lineal positiva. No obstante, la correlación más alta no llega a ser significativa.

Tabla 16: Correlación de Pearson entre puntos finales de Estero Limache.

		Peso seco	Clorofila	Número fronda
Clorofila	R	-0,65		
	p	0,14		
Número fronda	R	0,15	0,32	
	p	0,77	0,23	
Área fronda	R	-0,31	-0,22	0,02
	p	0,53	0,76	0,96

*R: coeficiente de correlación de Pearson, p: nivel de significancia.

Tabla 17: Correlación de Pearson entre puntos finales del Estero Quilpué.

		Peso seco	Clorofila	Número fronda
Clorofila	R	0,79		
	p	0,06		
Número fronda	R	-0,60	-0,82	
	p	0,20	0,04	
Área fronda	R	-0,56	-0,43	0,25
	p	0,24	0,38	0,63

*R: coeficiente de correlación de Pearson, p: nivel de significancia.

8 Discusión

8.1 Implementación de bioensayo con Sulfato de Cobre (CuSO₄)

8.1.1 Número de frondas

Se observa claramente que existe toxicidad en función de la concentración de cobre en las plantas.

Al comparar la toxicidad del sulfato de cobre con el estudio realizado por Valenzuela (2013), con el mismo tóxico y a las mismas concentraciones utilizando *Lemna valdiviana*, plantea que entre 0,01 y 1,00 mg/L no se alcanza a inhibir el 50% del crecimiento del número de frondas de las especies. Esto puede deberse a las diferencias experimentales que existan entre ambos estudios y a la sensibilidad de las distintas especies de Lemnas, siendo *Lemna minúscula* más sensible que *Lemna valdiviana* para esta variable respuesta.

Agencias internacionales (OCDE, APHA, EPA) utilizan en sus protocolos comúnmente el número de frondas como indicador principal en la evaluación toxicológica de muestras por ser un punto final sensible a los daños provocados por agentes químicos.

8.1.2 Tamaño de las frondas

En los tres ensayos con Sulfato de Cobre se observó una disminución del crecimiento del área de las frondas al aumentar las concentraciones del tóxico. Aunque se logró obtener resultados, en algunas réplicas resultó difícil medir el área, pues el programa no reconocía las frondas que presentaban clorosis, por lo que esos valores se dejaron en cero pudiendo alterar los valores finales de tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición.

Se obtuvo que el IC₅₀ se encontraba en los 0,05 mg/L al igual que con el número de frondas. Valenzuela (2013) encontró que a la concentración de 1 mg/L y 2 mg/L el crecimiento se detiene a las 24 horas de exposición, lo mismo ocurrió en este análisis a las mismas concentraciones, sin embargo, para los 0,05 mg/L Valenzuela observa un leve crecimiento del

área durante los 7 días, mientras que en este trabajo se observó que al 4° día se producía una inhibición del crecimiento.

Cabe destacar, que, si bien en este estudio resultó ser más sensible la evaluación del punto final del número de frondas, la medición del área resulta ser un parámetro de gran ayuda para estimar el crecimiento diario a lo largo del experimento, pues muestra con certeza su crecimiento exponencial.

8.2 Caracterización física y química de las aguas superficiales.

En general, los valores de los parámetros físicos y químicos fueron mayores en las aguas del Estero Limache. Con respecto al pH, este promedió 8,1, mientras que para el Estero Quilpué fue de 7,9. Estos valores muestran que existe cierto grado de alcalinidad en las aguas, debido

Valores similares se encontraron en la zona sur de Chile, en los ríos Cautín e Imperial en la región de La Araucanía los cuales tienden a ser rangos neutros para aguas de ríos de tipo rítrón (Rivera et al. 2004).

Este valor demuestra que los Esteros de Limache y de Quilpué tienden a ser más alcalinos, debido a las características geológicas del sector, asociados a altos contenidos de carbonato de calcio.

Respecto a la temperatura, ésta fue similar en ambos cuerpos de agua, siendo mayor en el Estero Limache. Esto sería coherente con los valores encontrados de oxígeno disuelto, pues a mayor temperatura el valor de oxígeno disuelto disminuye.

La conductividad eléctrica en cambio, varió significativamente entre ambos esteros, el promedio para el Estero Limache fue de 1135,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ mientras que para el Estero Quilpué fue de 741,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esto difiere de los valores encontrados por Dieterich (2018) en su estudio realizado en Mayo sobre el estero Limache, siendo mucho menores a los expuestos en este trabajo. Esto podría deberse al aumento de la temperatura en época primaveral y por los

aportes de la planta de tratamiento y de la actividad agrícola por la aplicación de fertilizantes (Córdova, 2009)

Los sólidos suspendidos totales en el estero Quilpué fueron menores y más uniformes que los encontrados en el estero Limache; lo cual puede deberse al grado de explotación y uso de los esteros.

En cuanto a los nitratos, los valores fueron similares entre ambos esteros, a excepción del punto del Zoológico de Quilpué y la Desembocadura del río Aconcagua, en donde ambos valores estuvieron bajo los 10 mg/L.

Los valores para los fosfatos estuvieron bajos en los dos esteros, a excepción del punto Lo Gamboa en el Estero Limache, el cual fue mayor con 20 mg/L, esto se puede explicar, por el uso de suelo que existe en el sector y por escorrentía de las aguas las cuales provienen de la agricultura o ganadería.

En tanto para el cobre, se encontraron mayores concentraciones en el Estero Limache, promediando 310 µg/L, mientras que para el Estero Quilpué fue de 160 µg/L. Este último valor es similar al encontrado por Becerra & Reyes (2016) en las mismas estaciones de muestreo.

Las variaciones encontradas en el Estero Limache pueden estar relacionadas con las diferentes actividades que se realizan en las cercanías del Estero. El punto con mayor concentración de Cobre fue la ex industria CCU, en el cual se observó la presencia de desechos electrónicos muy cerca de las aguas, los que podrían estar aportando dicho metal. También cabe destacar, la presencia de actividades agrícolas, las cuales utilizan plaguicidas en sus cultivos los que contienen cobre en sus ingredientes activos (Servicio Agrícola y Ganadero, SAG), pudiendo así, llegar a los cuerpos de agua.

Según la norma NCh 1333.of78 sobre Requisitos de calidad del agua para diferentes usos, se puede afirmar que, en ciertos puntos el agua no es apta para riego, pues el valor máximo de cobre es de 0,20 mg/L y en el Estero Limache se encontraron concentraciones por sobre este valor en todos los puntos de muestreo. Para el caso del Estero Quilpué, este presenta aguas

aptas para el riego en los sectores de Industrias Knop (0,16 mg/L), Puente Quilpué (0,11 mg/L) y el Zoológico (0,07 mg/L).

El valor óptimo de pH para aguas de riego es de 5,5 a 9,0, por lo que ambos esteros estarían aptos según este parámetro.

Para el uso recreativo de las aguas, los esteros se encuentran aptos ya que los valores de pH van desde 6.5 a 8.3, mientras que la temperatura máxima permitida es de 30°C.

Con respecto a la calidad de las aguas para la vida acuática, el valor mínimo de oxígeno disuelto es de 5 mg/L y el rango de pH óptimo es de 6.0 a 9.0, por lo que el Estero Limache no estaría en condiciones de albergar vida acuática por sus niveles de oxígeno disuelto.

La Universidad Católica del Norte (2012) en el río Maipo (Región Metropolitana), obtuvo resultados similares con respecto al Estero Quilpué a excepción del Cobre, el cual fue mayor en el río Maipo. Con relación al Estero Limache, existen diferencias en la conductividad eléctrica, cobre y oxígeno disuelto.

8.3 Número de frondas.

Los valores para el Estero Limache indican diferencias significativas para el número de frondas con respecto al control. Para el sector de la planta de tratamiento de agua hubo una estimulación del crecimiento, siendo esta mayor que en el control. Al contrario, en el sector de Lo Gamboa hubo una disminución del crecimiento, con un 63% de inhibición.

Estas diferencias entre puntos cercanos estarían en relación a los diferentes usos de los suelos cercanos al estero, ya que se pudo apreciar, que en las cercanías del estero Limache se realizan diferentes actividades antrópicas como agricultura, tratamiento de aguas y también es utilizado como basural para desechos de vestuario y electrónicos.

Para el Estero Quilpué, los valores fueron similares entre los puntos estudiados, encontrándose entre 45% y 48% el porcentaje de inhibición del número de frondas, siendo los más bajos la planta Carozzi e industrias Knop.

Al comparar ambos esteros, no se observa relación entre las variables respuesta y las características físico químicas, no obstante, la variable número de frondas en el estero Limache, es sensible a la variación de condiciones ambientales.

Se aprecia que las concentraciones de cobre por si solas no afectan de forma negativa al crecimiento del número de frondas. La concentración de cobre en la planta de tratamiento fue de 0,208 mg/L, mientras que para la planta Carozzi fue de 0,242 mg/L, sin embargo, en el primer punto hubo un crecimiento considerable mientras que para el segundo hubo una disminución, lo que evidencia la presencia de agentes tóxicos y mezclas complejas de éstos, los que pueden generar efectos antagónicos, contrarrestando los efectos tóxicos del Cobre.

Daud *et al.* (2018), en su estudio con *Lemna minor*, encontró que a una concentración de 0,6 mg/L de Cobre, al sexto día de exposición las plantas eran capaces de reducir hasta el 91% de Cobre en aguas producto de su capacidad para bioacumular dicho metal, esto avala que a una concentración de 0,4 mg/L encontrado en la ex industria CCU las plantas hayan tenido un crecimiento en el número de frondas.

8.4 Tamaño de las frondas.

8.4.1 Área de las frondas.

Este parámetro no fue tan sensible ya que no se encontraron diferencias significativas en el área de la fronda entre el control y los puntos estudiados en ambos esteros.

Para el estero Limache, al igual que con el número de frondas, el sector donde hubo una mayor tasa de crecimiento de área fue en la planta de tratamiento de aguas, lo que indicaría que, en ese sector, existen componentes que permiten un buen desarrollo de *Lemna minúscula*.

El punto donde hubo un mayor aumento del área fue en Lo Gamboa, si bien este sector fue el que tuvo menor crecimiento del número de frondas, estos resultados rescatan lo propuesto por diferentes autores (Sasmaz *et al.* (2015))(Radic *et al.* (2010)) que indican que la especie *Lemna sp.*, es apta para la fitorremediación de aguas por su capacidad de bioacumulación de

agentes químicos, en este sentido para este punto, no aumentaron en cantidad, sino más bien, aumentaron en su superficie.

En el estero Quilpué los valores fueron similares, teniendo un porcentaje de inhibición promedio de 7,7%, lo que significaría que las aguas del estero Quilpué no contienen agentes químicos que afecten esta variable respuesta como si ocurre en el estero Limache y no presentarían un riesgo para la biota del sector a pesar de tener altos niveles de Cobre. Becerra & Reyes (2016) llegaron a la misma conclusión en su análisis, proponiendo que las aguas del estero Quilpué son aptas para el mantenimiento de la vida acuática y que presentan agentes químicos biodisponibles en concentraciones que generen toxicidad.

8.4.2 Peso seco.

Los valores de peso seco fueron mayores que el control en todos los puntos del Estero Limache, siendo la desembocadura del río Aconcagua el mayor y Lo Gamboa el menor, lo cual puede deberse al grado de degradación que tenían las plantas en este último punto, generando así menos biomasa. Esta variación podría evidenciar que al contener más biomasa existe mayor cantidad de nutrientes los que enmascaran los efectos de los agentes físicos.

En el Estero Quilpué se encontraron valores similares con respecto al control en los puntos del zoológico y del puente Quilpué.

No obstante, en diversos estudios con metales pesados, los autores expresan que, en concentraciones altas de metales la biomasa seca disminuye, sin embargo, esto no ocurre. Esto puede significar que la presencia de agentes químicos como el cobre en las aguas no produce un daño en el peso seco de las Lemnas.

Junto con esto, se observa que la evaluación de este punto final no es significativa por lo que no puede ser medido por esta variable.

8.5 Contenido de clorofila

Según los análisis realizados, los valores de clorofila total fueron similares entre ambos esteros, esto representa que su actividad fotosintética no se ve alterada por los diferentes tipos de aguas, siendo relativamente mayores en el Estero Limache.

Los porcentajes de inhibición en el Estero Limache son bajos (15% en promedio) a excepción del punto de la Desembocadura del río Aconcagua, en donde hubo un 57% de inhibición. En el puente Limache se encontró una estimulación de clorofila.

En cambio, en el Estero Quilpué, contrario a lo esperado, hubo una estimulación de clorofila, presentando valores mayores con respecto al control en todos los puntos analizados, siendo la planta Carozzi en de mayor estimulación. Valenzuela (2013) tuvo resultados similares en concentraciones equivalentes de cobre.

Esta variable no es sensible a cambios en las características ambientales de los esteros lo que indicaría que no existen agentes químicos que puedan estar generando estrés oxidativo que pudiera dañar la clorofila.

No hubo correlación, esto podría estar asociado a que el cobre este en baja disponibilidad considerando que las aguas presentaron un pH alcalino. Al contener una mayor cantidad de pH, la toxicidad de los metales es menor, además, la materia orgánica absorbe estos agentes químicos.

Esto difiere de lo propuesto por Soto *et al.* (2011), el cual plantea que uno de los mecanismos de acción del cobre es inhibir la formación de pigmentos fotosintéticos, lo que significaría una menor cantidad de clorofila, por lo que en este estudio no se demuestra una relación entre las concentraciones de cobre y la cantidad de clorofila total ya que las especies no presentan un estrés tóxico ni daño al aparato fotosintético.

9 Conclusiones

Se logró implementar el bioensayo con *Lemna minúscula* mediante el uso del tóxico de referencia obteniéndose un IC50 para número de frondas y tamaño de frondas. Esto permite disponer de una metodología de bioensayo para la implementación de norma secundaria del río Aconcagua actualmente en trámite y en la cual es Estero Limache está considerada como área de vigilancia.

Respecto a las características fisicoquímicas, se concluye que las aguas del presente estudio presentan características similares a excepción del cobre y la conductividad eléctrica, los que fueron más altos en el Estero Limache.

Se logró evidenciar que el Estero Limache presenta algunos sectores tóxicos, en donde la variable respuesta más sensible fue el número de frondas, en tanto para el Estero Quilpué se aprecia que no existe toxicidad ya que el aumento del número de frondas fue similar en todos los puntos analizados.

Las variables de biomasa, área de frondas y contenido de clorofila total no muestran una clara variación respuesta en ambos esteros.

No se encontró correlación entre las variables respuesta y los parámetros fisicoquímicos, lo que confirma la importancia de incorporar variaciones de efectos en estudios de calidad de agua.

10 Bibliografía

Aranda de la Fuente, J., Valencia, J. & Gaete H., (2014). Valoración del Ecosistema Estero Limache, Región de Valparaíso (Chile central), mediante la aplicación del índice de funcionalidad fluvial. Anales Museo de Historia Natural de Valparaíso, 27.

Arroyave, M., (2004). La lenteja de agua (*Lemna minor L.*): Una planta acuática promisoría. Escuela de Ingeniería de Antioquia, 1, 33-38.

Barceló, J. & Pochenrieder, Ch., (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. Suelo y Planta. 2, 345-361.

Barrera, M., (2015). Uso de biomarcadores enzimáticos en organismos acuáticos (*Lemna Valdiviana*) para evaluar la toxicidad de efluentes de pisciculturas en sistemas fluviales (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Becerra, D., Reyes, H. (2016). Evaluación del estado ecológico y toxicidad del Estero Quilpué, (comuna de Quilpué, V región de Valparaíso), utilizando índices de calidad y bioensayos con *Lactuca sativa L* (tesis de pregrado). Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Bifani, P., (1980). Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible (pág 31). Madrid. España. CIFCA

Canales-Gutiérrez, A., (2010). Evaluación de la biomasa y manejo de *Lemna gibba* (lenteja de agua) en la bahía interior del lago Titicaca, Puno. Ecología Aplicada, 9(2), 91-99.

Castillo, A., Suárez, J. & Mosquera J. (2016). Naturaleza y Sociedad: Relaciones y tendencias desde un enfoque eurocéntrico. Luna Azul, 44, 348-371.

Castillo, G. (Eds). (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Morelos. México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Centro Nacional del Medio Ambiente. (2008). Análisis de la composición fisicoquímica de los sedimentos fluviales y su relación con la disponibilidad de metales en agua: Cuenca del río Aconcagua.

Comisión Nacional del Medio Ambiente. (2009). Estrategia de Conservación de la Biodiversidad de la Región de los Ríos.

Convenio sobre la Diversidad Biológica. <https://www.cbd.int/>

Córdova, S., Gaete, H., Aránguiz, F. & Figueroa R. (2009). Evaluación de la calidad de las aguas del estero Limache (Chile central), mediante bioindicadores y bioensayos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 37(2), 199-209.

Daubs. E., (1965). A monograph of Lemnaceae. University of Illinois, Illinois, Estados Unidos, págs. 30, 53, 76, 78)

Decreto N°1/1992. Establece Reglamento para el Control de la Contaminación Acuática. Diario Oficial de la República de Chile, Santiago de Chile. 17 de noviembre de 1992.

Decreto N°38/2013. Aprueba Reglamento para la Dictación de Normas de Calidad Ambiental y de Emisión. Diario Oficial de la República de Chile, Santiago de Chile. 22 de julio de 2013.

Dirección General de Aguas. (2004). Diagnóstico y Clasificación de los Cursos y Cuerpos de Agua según Objetivos de Calidad: Cuenca del río Aconcagua. Valparaíso, 160 pp.

Dirección General de Aguas. (2012). Desarrollo metodológico e informe con antecedentes para la realización de los análisis de Impacto Económico y Social de las Normas Secundarias de Calidad de Aguas de las Cuencas Cachapoal, Maipo y Elqui.

Escobar, J. (2002). La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. División de Recursos Naturales e Infraestructura. Comisión Económica para América y el Caribe (CEPAL).

Gaete, H., Aránguiz, F. y Cienfuegos, G. (2007). Metales pesados y toxicidad de aguas del río Aconcagua en Chile. *Química Nova*, 30(4), 885-891.

Hansmann, E., (1973). Pigment analysis: Handbook of phycolological methods. Culture method and growth measurement. Cambridge University Press, Inglaterra. pp. 359-368.

Hidalgo, E., (2015). Toxicidad de la mezcla binaria de los plaguicidas metomilo y rotenona en la "lenteja de agua" *Lemna minor* (tesis de pregrado). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

Inskeep, W. & Bloom, P., (1985), Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone, *Plant Physiol.* 77, 483-485

Kaeslin, E., Redmond, I., Dudley, N. (2013). La fauna silvestre en un clima cambiante. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 167, Roma, Italia.

Landolt, E. & Schmidt-Mumm, U., (2009). *Lemnaceae*: Flora de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 54 pp.

Ley N° 19.300/1994. Ley sobre Bases Generales del Medio Ambiente. Diario Oficial de la República de Chile. Santiago de Chile. 09 de marzo de 1994.

Lodoño-Franco, L., Lodoño-Muñoz, P. & Muñoz-García, F., (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 14(2), 145-153.

Luévano, J. (2016). Propuesta metodológica para reducir la concentración de nutrientes (Fosfatos, Amonio y nitratos) en bioensayos a la intemperie con la especie *Lemna sp.* Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Altamira. Ciudad de México, México.

Márquez, F, Introducción a la Toxicología Ambiental. Universidad de Concepción. Obtenido de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tysa/images/libros/Libro%20Introduc%20a%20la%20Toxicologia%20Ambtal.pdf>.

Ministerio de Agricultura. (2016). Diagnóstico para desarrollar plan de riego en Cuenca de Aconcagua: informe final. Santiago de Chile. 314 pp. Obtenido de: https://www.cnr.gob.cl/DivisionDeEstudios/Documents/10_IF%20PGR%20Cuenca%20Aconcagua.pdf

Ministerio de Medio Ambiente. (2018). Guía de apoyo docente en biodiversidad. Santiago de Chile. 123 pp. Obtenido de: http://portal.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2018/08/Guia-biodiversidad-docentes_web.pdf

Ministerio de Medio Ambiente. Registro de Áreas Protegidas. Obtenido de la página del Ministerio de Medio Ambiente: <http://areasprotegidas.mma.gob.cl/preguntas-frecuentes/>.

Muñoz, E. & Velis, A., (2017). Actualización Plan Regulador Comunal de Quilpué- Región de Valparaíso: Etapa 4: Proyecto. Obtenido de: https://www.quilpue.cl/uploads/pagina_20160113002122_1.3.%20Informe%20Riesgo%20y%20Proteccio%CC%81n%20Ambiental_PRCQ.pdf

NCh 1333/1987. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. Instituto Nacional de Normalización. Santiago de Chile, 15 pp.

Nurcan. G., Can. O. & Böcük. H., (2016). Toxicity assessment of boron (B) by *Lemna minor L.* and *Lemna gibba L.* and their posible use as model plants for ecological risk assessment of aquatic ecosystems with boro pollution. *Chemosphere*, 157, 1-9

Park, J., Brown, M., Depuydt, S., Kim, J., Won, D. (2017). Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three *Lemna* species exposed to four herbicides. *Enviromental Pollution*. 220, 818-827.

Radic. S., Stipanicev. D., Cvjetko. P, Marijanovic. M., Sirac. S., Pevalek. B, Pavlica. M., (2010), Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters, *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 74. 182-187

Rivera. N., Encina. F, Pedreros-Muñoz. A. & Mejías. P., (2004). La calidad de las aguas en los Ríos Cautín e Imperial, IX Región-Chile. *Información tecnológica*, 15(5), 98-101.

Sasmaz, M., Arslan, E., Obek, E., Sasmaz., A. (2015). The potential of *Lemna gibba L.* and *Lemna minor L.* to remove Cu, Pb, Zn, and As in gallery wáter in a minig area in Keban, Turkey. *Journal of Enviromental Management*. 163, 246-253.

SEREMI Región de Valparaíso. Anteproyecto Norma Secundaria de Calidad Ambiental, NSCA, para la protección de las aguas continentales en la cuenca del río Aconcagua. Obtenido de la página de Planes y normas del Ministerio del Medio Ambiente: http://planesynormas.mma.gob.cl/archivos/2017/proyectos/PAC_Los_Andes_27.07.17.pdf

Soto, P., Gaete, H., Hidalgo, M. (2011). Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, and growth rate in the freshwater Green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 39(2), 280-285.

Souza, T., Carraro, A., Teixeira, A., Welmer, R., Fernandes A. (2018). Kinetics of arsenic absorption by the species *Eichhornia crassipes* and *Lemna valdiviana* under optimized conditions. *Chemosphere*. 209, 866-874.

Su, S., Zhou, Y., Qin, J., Yao, W., Ma, Z. (2010). Optimization of the Method for Chlorophyll Extraction in Aquatic Plants. *Journal of Freshwater Ecology*. 25(4), 531-538.

Tejeda-Cruz, C. (2014). Conservación de la Biodiversidad y Comunidades Locales: Conflictos en Áreas Naturales Protegidas de la Selva Lac Andona, Chiapas, México, *Canadian Journal of Latin American and Caribbean Studies*. 34(68), 57-88.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2012). Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp.

Valenzuela, J., (2013). Calibración y estimación de la sensibilidad toxicológica de *Lemna valdiviana* Phil (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante Dicromato de Potasio y Sulfato de Cobre como tóxicos de referencia (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.