



FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

“EFECTO ECOTOXICOLÓGICO DE LA MEZCLA DE AROCLOR 1254 Y PLOMO
EN EL BIOINDICADOR *DAPHNIA MAGNA STRAUSS*, 1820”

Tesis para optar el título profesional de:
INGENIERO(A) AMBIENTAL

Presentado por:
Carlos Nicolás Dellafredad Tesén
Asesor:
José Alberto Iannacone Oliver

Lima – Perú
2019

COPIA DE ACTA DE SUSTENTACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 18 de noviembre de 2019.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dra. Danae Marcela Liviac Muñoz
Integrante: Dra. Susan Mery Medina Canzio
Integrante: Mg. Armando Jesús Edilberto Vélez Azañero

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:
EFECTO ECOTOXICOLÓGICO DE LA MEZCLA DE AROCLOR 1254 Y PLOMO EN EL
BIOINDICADOR *DAPHNIA MAGNA* STRAUSS, 1820

Presentada por el bachiller:

- Carlos Nicolás Dellafredad Tesén

Para optar el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**

Asesorada por:

- Dr. José Alberto Iannacone Oliver

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la bachiller en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

• Integrante 1: Carlos Nicolás Dellafredad Tesén			Nota (escrito): <i>catorce</i>
Aprobado (X)	Aprobado - Muy buena ()	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.


Presidente del Jurado


Miembro del Jurado


Miembro del Jurado


Asesor

T/(51) 610 6400
opción 2
www.cientifica.edu.pe

Campus
Panamericana Sur
km 19 - Lima 42

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico a mis queridos padres, Rafael Dellafredad García y Marleny Tesén Palacios, por otorgarme la vida, por darme la oportunidad y creer en mis fortalezas y competencias, por su constante aliento y cariño concedido, porque son el principal cimiento de mi proyecto de vida.

A mis hermanos Paolo y Rafael, por su insistente motivación y por el gran aprecio que nos tenemos.

AGRADECIMIENTOS

Tengo la dicha de manifestar mi gratitud a todas las personas que constantemente me animaron a alcanzar esta meta.

En primer lugar, al Doctor en Ciencias Biológicas, José Alberto Iannacone Oliver, por su persistente orientación, sugerencias y beneficiosos comentarios para el desarrollo de la tesis.

También, al Departamento de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú. Por ceder el Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) y los equipos necesarios para el éxito de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

COPIA DE ACTA DE SUSTENTACIÓN	1
DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN	7
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	31
ANEXOS	36
EVIDENCIA DEL ENVÍO A REVISTA CIENTÍFICA.....	36
COPIA DE CARTA DE APROBACIÓN ACADÉMICA.....	¡Error! Marcador no definido.
COPIA DE DOCUMENTO DE APROBACIÓN DE COMITÉ DE ÉTICA.....	¡Error! Marcador no definido.
COPIA DE RESOLUCIÓN DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS	37
INSTRUMENTO E INFORMACIÓN DE UTILIDAD USADO EN LA INVESTIGACIÓN.....	38
Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas.....	38

RESUMEN

El protocolo de ensayo con el bioindicador *Daphnia magna* Strauss, 1820 permite determinar el efecto ecotoxicológico individual y de mezcla de diversas sustancias químicas. El parámetro de toxicidad aguda en ecotoxicología con uso más frecuente es la concentración letal media (CL_{50}). Evaluar el efecto ecotoxicológico de la mezcla de aroclor 1254 y del plomo (Pb^{2+}) sobre *D. magna*. Se calculó la CL_{50} siendo aroclor 1254 > Pb^{2+} , y posteriormente la concentración sin efecto ecológico (PNEC) para el efecto individual y de mezcla. Posteriormente, se compararon los valores de PNEC con la Categoría 4 – E2: Ríos del Estándar de Calidad Ambiental Peruano mediante Decreto Supremo No. 004 2017 (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2017). Los valores de CL_{50} se redujeron de manera progresiva con el tiempo de exposición a 48 h para ambos compuestos en forma individual y de mezcla. Se determinó la relación de proporción – sinergia (PS) en proporciones de 1:1, 3:2 y 4:1 (aroclor 1254: Pb^{2+}), generándose mayores valores de PS en 3:2 y 4:1 en comparación a 1:1. Se concluye que la concentración de aroclor 1254 estimada de PNEC es similar al valor de la Categoría 4 – E2 y que la concentración límite para Pb^{2+} no es adecuada y que debe disminuirse para asegurar la conservación del medio acuático. Además el bioindicador *D. magna* permite evaluar adecuadamente la mezcla de aroclor 1254 y Pb^{2+} .

PALABRAS CLAVE: aroclor 1254, bioensayo, *Daphnia magna*, plomo.

ABSTRACT

The test protocol with the *Daphnia magna* Strauss bioindicator, 1820 allows to determine the individual ecotoxicological effect and the mixing of various chemical substances. The parameter of acute toxicity in ecotoxicology with more frequent use is the mean lethal concentration (LC₅₀). To evaluate the ecotoxicological effect of the mixture of arochlor 1254 and lead (Pb²⁺) on *D. magna*. The LC₅₀ was calculated being arochlor 1254>Pb²⁺, and later the concentration without ecological effect (PNEC) for the individual and mixing effect. Subsequently, the PNEC values were compared with Category 4 - E2: Rivers of the Standard of Peruvian Environmental Quality by Supreme Decree No. 004 2017 (Ministry of Environment [MINAM], 2017). The LC₅₀ values were reduced progressively with the exposure time to 48 h for both compounds individually and as a mixture. The ratio - synergy ratio (SP) was determined in proportions of 1:1, 3:2 and 4:1 (arochlor 1254: Pb²⁺), generating higher PS values in 3:2 and 4:1 compared to 1:1. It is concluded that the concentration of arochlor 1254 estimated from PNEC is similar to the value of Category 4 - E2 and that the limit concentration for Pb²⁺ is not adequate and that it should be decreased to ensure the conservation of the aquatic environment. In addition to the bioindicator *D. magna* allows to properly evaluate the mixture of arochlor 1254 and Pb²⁺.

KEY WORDS: arochlor 1254, bioassay, *Daphnia magna*, lead.

Artículo Original / Original Article / Artigo Original

**Efecto ecotoxicológico de la mezcla de Aroclor 1254 y plomo en el
bioindicador *Daphnia magna*¹**

Carlos Nicolás Dellafredad Tesén², José Alberto Iannacone Oliver³

1 Artículo original derivado del proyecto de investigación titulado “Efecto ecotoxicológico de la mezcla de aroclor 1254 y plomo en el bioindicador *Daphnia magna* Strauss, 1820”, fecha de realización entre noviembre 03 del 2018 y abril 28 del año 2019 en Lima, Perú.

2 Bachiller en Ingeniería Ambiental. Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú, Correo electrónico: cdellafredad24@gmail.com, ORCID: 0000-0003-0359-3596.

3 Biólogo, Doctor en Ciencias Biológicas, Docente-Investigador, Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú. Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú, joseiannaconeoliver@gmail.com, ORCID: 0000-0003-3699-4732.

Autor para correspondencia, José Alberto Iannacone Oliver, E-mail: joseiannaconeoliver@gmail.com

RESUMEN

El protocolo de ensayo con el bioindicador *Daphnia magna* Strauss, 1820 permite determinar el efecto ecotoxicológico individual y de mezcla de diversas sustancias químicas. El parámetro de toxicidad aguda en ecotoxicología con uso más frecuente es la concentración letal media (CL_{50}). Evaluar el efecto ecotoxicológico de la mezcla de aroclor 1254 y del plomo (Pb^{2+}) sobre *D. magna*. Se calculó la CL_{50} siendo aroclor 1254 > Pb^{2+} , y posteriormente la concentración sin efecto ecológico (PNEC) para el efecto individual y de mezcla, Posteriormente, se compararon los valores de PNEC con la Categoría 4 – E2: Ríos del Estándar de Calidad Ambiental Peruano mediante Decreto Supremo No. 004 2017 (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2017). Los valores de CL_{50} se redujeron de manera progresiva con el tiempo de exposición a 48 h para ambos compuestos en forma individual y de mezcla. Se determinó la relación de proporción – sinergia (PS) en proporciones de 1:1, 3:2 y 4:1 (aroclor 1254: Pb^{2+}), generándose mayores valores de PS en 3:2 y 4:1 en comparación a 1:1. Se concluye que la concentración de aroclor 1254 estimada de PNEC es similar al valor de la Categoría 4 – E2 y que la concentración límite para Pb^{2+} no es adecuada y que debe disminuirse para asegurar la conservación del medio acuático. Además el bioindicador *D. magna* permite evaluar adecuadamente la mezcla de aroclor 1254 y Pb^{2+} .

PALABRAS CLAVE: aroclor 1254, bioensayo, *Daphnia magna*, plomo.

Ecotoxicological effect of the mixture of Arochlor 1254 and lead in the bioindicator *Daphnia magna*

ABSTRACT

The test protocol with the *Daphnia magna* Strauss bioindicator, 1820 allows to determine the individual ecotoxicological effect and the mixing of various chemical substances. The parameter of acute toxicity in ecotoxicology with more frequent use is the mean lethal concentration (LC₅₀). To evaluate the ecotoxicological effect of the mixture of arochlor 1254 and lead (Pb²⁺) on *D. magna*. The LC₅₀ was calculated being arochlor 1254 > Pb²⁺, and later the concentration without ecological effect (PNEC) for the individual and mixing effect. Subsequently, the PNEC values were compared with Category 4 - E2: Rivers of the Standard of Peruvian Environmental Quality (Supreme Decree No. 004 2017-MINAM). The LC₅₀ values were reduced progressively with the exposure time to 48 h for both compounds individually and as a mixture. The ratio - synergy ratio (SP) was determined in proportions of 1:1, 3:2 and 4:1 (arochlor 1254: Pb²⁺), generating higher PS values in 3:2 and 4:1 compared to 1:1. It is concluded that the concentration of arochlor 1254 estimated from PNEC is similar to the value of Category 4 - E2 and that the limit concentration for Pb²⁺ is not adequate and that it should be decreased to ensure the conservation of the aquatic environment. In addition to the bioindicator *D. magna* allows to properly evaluate the mixture of arochlor 1254 and Pb²⁺.

KEY WORDS: arochlor 1254, bioassay, *Daphnia magna*, lead

Efeito ecotoxicológico da mistura de aroclor 1254 e chumbo no bioindicador *Daphnia magna*

RESUMO

O protocolo de ensaio com bioindicador *Daphnia magna* Strauss, 1820 para determinar o efeito individual e mistura ecotoxicológica vários produtos químicos. O parâmetro de toxicidade aguda em ecotoxicologia com uso mais frequente é a concentração letal média (CL₅₀). Avaliar o efeito da mistura ecotoxicológica aroclor 1254 e chumbo (Pb²⁺) em *D. magna*. LC₅₀ foi calculada como sendo aroclor 1254 > Pb²⁺, em seguida, a concentração sem efeitos ecológicos adversos (PNEC) para o efeito individual e mistura. Subsequentemente, os valores PNEC comparado com Categoria 4 - E2: Rios Padrão de Qualidade Ambiental Peruana mediante Decreto Supremo No. 004 2017 (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2017). Os valores de LC₅₀ foram reduzidos progressivamente com o tempo de exposição para 48 h para ambos os compostos individualmente e como uma mistura. Proporção determinada proporção - sinergia (PS) em proporções de 1:1, 3:2 e 4:1 (aroclor 1254: Pb²⁺), a gerao de valores mais elevados de PS em 3:2 e 4:1 em comparação com 1:1. A concentração de aroclor 1254 estimada PNEC é semelhante ao valor de categoria 4 - E2 e o limite de concentração Pb²⁺ é inadequada e deveria ser diminuído para garantir a conservação do ambiente aquático. Mais o bioindicador *D. magna* permite avaliar adequadamente a mistura de aroclor 1254 e Pb²⁺.

PALAVRAS-CHAVE: aroclor 1254, bioensaio, *Daphnia magna*, chumbo.

INTRODUCCIÓN

Aroclor 1254 es parte de los 209 congéneres del grupo de bifenilos policlorados, es un compuesto complejo formado por hidrógeno, carbono y cloro al 54%, lo que lo hace que no sea degradado fácilmente. Su permanencia en el suelo se rige por el porcentaje de materia orgánica y de arcilla. En el aire, su permanencia se rige por la temperatura y la humedad. Se encuentra en las industrias en forma de acetato de polivinilo, resina acrílica y lubricante de alta presión. Este compuesto ocasiona diferentes tipos de afecciones como cáncer a la piel, en el sistema reproductivo humano, en el sistema nervioso e inclusive efecto teratogénico (Sokol, Bush, Wood & Janan–Parwar, 1992).

En cuanto al metal pesado, plomo (Pb^{2+}), se usa en la elaboración de pigmentos como el cromato de Pb^{2+} , en producción de peróxido de nitrógeno, cerillas, explosivos, fusibles, compuestos deflagrantes y tinturas. En el Perú, existen varios casos de contaminación por Pb^{2+} en los habitantes que se encuentran contiguos a industrias extractivas del Pb^{2+} y en relaves mineros, desarrollando afección al sistema reumatológico, cardiovascular, reproductivos, hematológico, neurológico, renal, gastrointestinal y óseo (Burger & Pose, 2010).

Aroclor 1254 y Pb^{2+} son considerados como disruptores endocrinos (EDC), generando un gran impacto sobre los organismos acuáticos al obstaculizar la síntesis, secreción, transporte, asociación, acción o eliminación de hormonas, responsables de la homeostasis, reproducción y desarrollo de seres vivos. Asimismo, el Pb^{2+} presenta un efecto adicional de estrés oxidativo en especies acuáticas (Gaete, Guerra, Carvajal, Murkaker, & Lobos, 2014).

La importancia del uso de mezclas concede seguridad en la evaluación de la calidad de agua, por la variedad de químicos orgánicos e inorgánicos que

pueden incluir tales mezclas. La estimación por bioensayos de los efectos de las mezclas resulta fundamental, debido a que través de estos estudios se establecen los estándares de calidad para la protección de la vida acuática (Iannacone, Alvarino, & Mamani, 2010).

El uso del bioindicador *D. magna*, genera información precisa del riesgo ecológico en el ambiente acuático, por características como uniformidad genética al ser partenogénica, ciclo de vida reducido, producción masiva de crías, facilidad de cultivo, importancia en la biota zooplanctónica, alta sensibilidad a la alteración ambiental y numerosos estudios de distintos compuestos químicos (Zárate & Sierra, 2009).

En el Perú, se ha encontrado en el río Cañete, Lima, Perú la presencia de aroclor 1254 y de Pb^{2+} , por lo que pudiera existir una interacción entre ambos compuestos (Autoridad Nacional del Agua [ANA], 2014). A la fecha no se tienen trabajos que evalúen el efecto ecotoxicológico de la mezcla de aroclor 1254 y del Pb^{2+} sobre bioindicadores acuáticos, y entre ellos, sobre el microcrustáceo *D. magna*. Por lo que se requiere evaluar el riesgo ambiental del aroclor 1254 y del Pb^{2+} , a través de la concentración sin efecto ecológico (PNEC) para pronosticar la correspondencia entre estos contaminantes y sus impactos ecológicos.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto ecotoxicológico de la mezcla de aroclor 1254 y Pb^{2+} en el bioindicador *D. magna* y determinar si existe un efecto sinérgico de tres mezclas binarias de aroclor 1254 y Pb^{2+} (1:1, 3:2 y 4:1) sobre este modelo biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioindicador

Daphnia magna

Los neonatos fueron obtenidos a partir de hembras adultas de *D. magna* procedentes del acuario “Rokasd” ubicado en el distrito de Cercado de Lima, Lima, Perú, y fueron transportados en recipientes de plástico con capacidad de 5 L al Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú. La aclimatización de las hembras partenogénicas se realizó a una temperatura de 19 ± 2 °C, a un pH de $7,0 \pm 1$ y un fotoperiodo de 16 h luz: 8 h de oscuridad, en 5 contenedores de vidrio con las mismas dimensiones de 15 cm de largo, 30 cm de ancho y 15 cm de alto. El oxígeno disuelto (OD) presentó una concentración sobre $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Iannacone, Alvariño & Paredes, 2009). Los individuos se alimentaron diariamente con 2 mL de una mezcla de hojuelas de peces Tetramin® con *Spirulina* Turpin ex Gomont, 1892 y levadura en polvo en una proporción de 2:2:1, los cuales se disolvieron en 500 mL de agua embotellada de la marca “Cielo®”. Para la realización del ensayo de toxicidad aguda se usó neonatos menores a 24 h de nacidos. El ensayo tuvo una duración total de 48 h de exposición, realizando observaciones a las 24 y 48 h. A cada recipiente de vidrio con capacidad de 100 mL, se adicionó 50 mL por cada concentración de aroclor 1254 y Pb^{2+} y sus respectivas mezclas, en cada recipiente se inoculó 10 neonatos *D. magna*. Como criterio de mortalidad se evaluó la falta de movilidad o la falta de ritmo cardíaco a 15 s de análisis a los individuos a través del microscopio estereoscopio. Previamente a cada análisis

se realizó una oscilación breve al recipiente con el objeto de estimular la acción motora de los individuos expuestos de *D. magna*.

Sustancias Químicas

El aroclor 1254 ($C_{12}H_5Cl_5$, $PM= 326,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) fue obtenido de SUPELCO®, 99,5% (Química Services SRL, Lima, Perú) CAS [Chemical Abstract Service Number] = 11097-69-1. Presenta una toxicidad aguda oral en ratas de $DL_{50}= 1010 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Respecto al punto de ebullición y presión de vapor no se encuentran datos disponibles.

Se hizo una disolución para el efecto individual de aroclor 1254 y para la mezcla en proporción 1:1, con el disolvente diclorometano (CH_2Cl_2 , $84,93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), obtenido por EMSURE® ACS, 99,8% (Implementos y Reactivos EIRL, Lima, Perú) CAS [Chemical Abstract Service Number] = 75-09-2. El diclorometano presenta una toxicidad aguda oral en ratas de $DL_{50}= 1600 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, un punto de ebullición de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ y una presión de vapor de 475 hPa a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Este disolvente tiene una CL_{50} para *D. magna* de $0,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y para la disolución se usó una concentración inicial $<0,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En base a una proporción de 1:1 de aroclor 1254 y de diclorometano, sobre 400 mL de agua embotellada. En cuanto a aroclor 1254, para el efecto individual de aroclor 1254 y la mezcla en proporción 1:1, se tuvo una concentración inicial de $0,16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para las proporciones 3:2 y 4:1, $0,48$ y $0,64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

El Nitrato de plomo ($Pb(NO_3)_2$, $PM= 331,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) fue adquirido de EMSURE® ACS, 99,5% (Merck Peruana S.A., Lima, Perú) CAS [Chemical Abstract Service Number] = 10099-74-8. Presenta una toxicidad aguda oral en ratas de $DL_{50}= 500,1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, un punto de ebullición $> 500^\circ\text{C}$, y respecto a la presión de vapor no se encuentran datos disponibles. Para el ensayo definitivo se trabajó con un

promedio de la CL_{50-24h} en *D. magna* de $3,42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en cual se obtuvo a partir de diferentes ensayos encontrados en la literatura (Altindag, Borga, Yigit, & Baykan, 2008; Zárata & Sierra, 2009; Okamoto, Yamamuro, & Tatarazako, 2014) En cuanto al Pb^{2+} , para el efecto individual de Pb^{2+} y para las mezclas en proporción 1:1, 4:1, se empleó $8,74 \text{ mg}$ de nitrato de plomo, mientras que para la mezcla en proporción 3:2, se usó $17,49 \text{ mg}$ de nitrato de plomo, para pesar se utilizó una balanza AND modelo gr-2000, y se disolvió en 400 mL agua embotellada. Estos cálculos se hicieron a través de una relación entre el peso molecular del nitrato de plomo ($331,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y Pb^{2+} ($207,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Para los ensayos de toxicidad se aplicó un factor de solución de $0,5$ para aroclor 1254 y Pb^{2+} ; en cuanto a las disoluciones y el control se usó agua embotellada con las siguientes características físico químicas: $\text{pH} = 7,37 \pm 0,01$; $\text{CE} = 0,66 \pm 2$ % del margen de medición ($\text{dS}\cdot\text{cm}^{-3}$), temperatura = $23,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y sólidos disueltos totales (TDS) = 25 ± 2 % del margen de medición ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), medidas puntuales con el instrumento de medición digital HandyLab 680.

Diseño Experimental

Para *D. magna* se empleó aroclor 1254 en las siguientes 5 concentraciones $0,01$; $0,02$; $0,04$; $0,08$; $0,16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un control. Se usó Pb^{2+} en base al nitrato de plomo en las siguientes 6 concentraciones: $0,42$; $0,85$; $1,71$; $3,42$; $6,84$ y $13,68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un control. Adicionalmente, se realizaron mezclas binarias en referencia a aroclor 1254, en proporción 1 (aroclor 1254):1 (Pb^{2+}), $0,01 + 0,855$; $0,02 + 1,71$; $0,04 + 3,42$; $0,08 + 6,84$; $0,16 + 13,68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un control, en proporción 3 (aroclor 1254): 2 (Pb^{2+}), $0,03 + 1,71$; $0,06 + 3,42$; $0,12 + 6,84$; $0,24 + 13,68$; $0,48 + 27,36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un control, en proporción 4 (aroclor 1254): 1 (Pb^{2+}), $0,04 + 0,85$; $0,08 +$

1,71; 0,16 + 3,42; 0,32 + 6,84; 0,64 + 13,68 mg·L⁻¹ y un control (Gaete y Chávez, 2007). Se tomó como criterio para la validez del bioensayo que la mortalidad en el control no excediera el 10 %. Los ensayos fueron ejecutados en un diseño de bloque completamente aleatorio (DBCA) de 5 (aroclor 1254) – 6 (Pb²⁺) (concentraciones) x 4 (repeticiones) (Iannacone, Alvariño & Paredes, 2009).

Tratamiento de datos

Las CL_{50s}, CL_{50-inferior} y CL_{50-superior} se determinaron por medio del programa computarizado Excel Probit versión 2016 proporcionada por Alpha (2017). Se usó el estadístico Chi-cuadrado con el fin de verificar el modelo de regresión. Se manejó el programa estadístico SPSS, versión 22 para Windows XP, para definir los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de 0,05. Se determinó a través de un análisis de varianza (ANOVA) de doble vía con un análisis complementario de Tukey, los porcentajes de mortalidad, temperatura y pH que fueron significativamente distintos a las del control. Se determinaron los valores de NOEC (Concentración de efecto no observado) y LOEC (Mínima concentración de observación de efecto). Para estimar la homogeneidad de varianzas se usó el estadístico de Levene, y para contrastar la normalidad de los diferentes datos se utilizó la prueba de Shapiro – Wilk (S-W). En el caso de que el ANOVA no cumpliera los requisitos de homogeneidad de varianzas y normalidad, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis (K-W).

Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA)

Se evaluó el riesgo ambiental del aroclor 1254 y Pb²⁺ sobre la biota del medio acuático, usando a la especie *D. magna*, a través de la estimación del PNEC

para cada valor individual y de mezcla (Tomaila & Iannacone, 2017), mediante la siguiente fórmula: $CL_{50-48h} / \text{Factor de seguridad}$.

Según OECD (2011), se consideró un factor de seguridad de 1000, debido a que solo se contó con un solo nivel trófico en el medio acuático al que pertenece *D. magna*. Los PNEC obtenidos para el efecto letal a las 48 h de aroclor 1254 y Pb^{2+} en forma individual y en mezcla fueron comparados con la Categoría 4: Conservación del ambiente acuático del Estándar de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, Subcategoría E2: Ríos (costa y sierra, selva); para bifenilos policlorados ($0,000014 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Pb^{2+} ($0,0025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Decreto Supremo No. 004 2017 (MINAM, 2017).

Proporción – Sinergia (PS)

Se tomó el modelo proporción – sinergia de Hewlett y Plackett (1959), a través de la siguiente fórmula para la aditividad, sinergia o antagonismo para aroclor 1254 y Pb^{2+} .

$$PS = \frac{CL_{50-48h} \text{ del químico actuando individualmente}}{CL_{50-48h} \text{ de la mezcla}}$$

Donde $PS = 1$ indica aditividad, $PS > 1$ muestra sinergia y $PS < 1$ señala el antagonismo

RESULTADOS

El promedio global de temperatura en los ensayos con aroclor 1254, Pb^{2+} y la mezcla de ambos en todas las proporciones fue de $23,16 \pm 0,22$ °C. Además, se observó para las seis diferentes concentraciones de aroclor 1254 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) que los valores de pH durante 48 h de exposición presentaron un promedio de $7,32 \pm 0,06$. A continuación, en la tabla N°1 se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos como pH medidos durante las 24 h y 48 h de

exposición al Pb^{2+} y en proporción 1:1 (aroclor 1254 + Pb^{2+}) sobre *D. magna*. De la tabla N° 1, indicamos que existe una disminución en el pH en la exposición a 48 h de Pb^{2+} y de la mezcla en proporción 1:1 (aroclor 1254 + Pb^{2+}) al incrementar la concentración.

Tabla N° 1

Valores de pH a las 24 h y 48 h durante la exposición de Pb^{2+} y en proporción 1:1 (aroclor 1254 + Pb^{2+}) sobre *Daphnia magna*.

Concentración Pb^{2+} ($mg \cdot L^{-1}$)	Promedio de pH		Concentración (aroclor 1254 + Pb^{2+}) ($mg \cdot L^{-1}$) 1:1	Promedio de pH	
	24 h (\pm D.E)	48 h (\pm D.E)		24 h (\pm D.E)	48 h (\pm D.E)
0,00	7,35 (\pm 0,02)a	7,39 (\pm 0,02)d	0,00	7,38 (\pm 0,05)a	7,24 (\pm 0,02)b
0,42	7,39 (\pm 0,13)a	7,22 (\pm 0,02)c	0,01 + 0,85	7,34 (\pm 0,03)a	7,17 (\pm 0,05)b
0,85	7,37 (\pm 0,02)a	7,20 (\pm 0,07)c	0,02 + 1,71	7,32 (\pm 0,04)a	7,14 (\pm 0,04)b
1,71	7,34 (\pm 0,09)a	7,17 (\pm 0,04)c	0,04 + 3,42	7,30 (\pm 0,05)a	6,91 (\pm 0,04)a
3,42	7,33 (\pm 0,05)a	7,05 (\pm 0,04)b	0,08 + 6,84	7,29 (\pm 0,03)a	6,85 (\pm 0,05)a
6,84	7,30 (\pm 0,02)a	6,89 (\pm 0,03)b	0,16 + 13,68	7,33 (\pm 0,06)a	6,83 (\pm 0,06)a
13,68	7,34 (\pm 0,04)a	6,83 (\pm 0,06)a	F	1,46	19,89*
K-W	5,28	63,58*	Sig.	0,24	0,00
Sig.	0,50	0,00	Estadístico de Levene	0,34	0,53
Estadístico de Levene	3,17	1,24	Sig.	0,87	0,74
Sig.	0,02	0,32	S-W	0,97	0,89
S-W	0,93	0,95	Sig.	0,74	0,01
Sig.	0,10	0,23			

D.E.: Desviación Estándar. F=Estadístico de Fisher del Anova. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de pH son estadísticamente iguales ($p \geq 0,05$). *: Se utilizó el valor de Kruskal – Wallis porque no cumplía uno de los dos parámetros de homogeneidad de varianzas y de normalidad para usar el ANOVA mediante el estadístico F. *: Se utilizó el valor de F porque la homogeneidad de las varianzas y la normalidad (S-W) son mayores a 0,05.

Además, podemos notar en la tabla N°2, los resultados de pH medidos durante la exposición de la mezcla en proporción 3:2 (aroclor 1254: Pb^{2+}) y en proporción 4:1 (aroclor 1254: Pb^{2+}) desde las 24 h hasta las 48 h sobre *D. magna*. De la tabla N° 2, señalamos que existe una disminución en el pH a 48 h de exposición de la mezcla en proporción 3:2 (aroclor 1254: Pb^{2+}) y en proporción 4:1 (aroclor 1254: Pb^{2+}) al aumentar la concentración.

Tabla N°2

Valores de pH a las 24 h y 48 h durante la exposición a la mezcla en proporción 3:2 (aroclor 1254: Pb²⁺) y en proporción 4:1 (aroclor 1254: Pb²⁺) sobre *Daphnia magna*.

Concentración (aroclor 1254 + Pb ²⁺) (mg·L ⁻¹) 3:2	Promedio de pH		Concentración (aroclor 1254 + Pb ²⁺) (mg·L ⁻¹) 4:1	Promedio de pH	
	24 h (± D.E)	48 h (± D.E)		24 h (± D.E)	48 h (± D.E)
0,00	7,40 (± 0,05)d	7,30 (± 0,08)d	0,00	7,39 (± 0,04)b	7,22 (± 0,02)c
0,03 + 1,71	7,35 (± 0,02)cd	7,11 (± 0,03)c	0,04 + 0,85	7,36 (± 0,03)ab	7,18 (± 0,07)c
0,06 + 3,42	7,33 (± 0,03)bcd	6,83 (± 0,03)b	0,08 + 1,71	7,34 (± 0,03)ab	7,12 (± 0,04)c
0,12 + 6,84	7,23 (± 0,03)bc	6,73 (± 0,04)b	0,16 + 3,42	7,32 (± 0,04)ab	6,88 (± 0,04)b
0,24 + 13,68	7,20 (± 0,04)b	6,60 (± 0,05)a	0,32 + 6,84	7,27 (± 0,03)a	6,77 (± 0,09)ab
0,48 + 27,36	7,02 (± 0,11)a	6,52 (± 0,02)a	0,64 + 13,68	7,30 (± 0,05)ab	6,69 (± 0,05)a
K-W	20,54	22,25	K-W	4,11*	20,50
Sig.	0,00	0,00	Sig.	0,01	0,00
Estadístico de Levene	8,20	2,39	Estadístico de Levene	0,38	0,85
Sig.	0,00	0,07	Sig.	0,85	0,52
S-W	0,92	0,91	S-W	0,95	0,89
Sig.	0,07	0,04	Sig.	0,37	0,02

D.E.: Desviación Estándar. K-W: Prueba de Kruskal –Wallis. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de pH son estadísticamente iguales ($p \geq 0,05$). *: Se utilizó el valor de Kruskal – Wallis porque no cumplía uno de los dos parámetros de homogeneidad de varianzas y de normalidad para usar el ANOVA mediante el estadístico F.

Adicionalmente, se determinó el efecto ecotoxicológico agudo del aroclor 1254 en *D. magna* a 24 y 48 h de exposición (Tabla N°3). Se verificó un incremento notable en el porcentaje de mortalidad de *D. magna* con respecto al control desde la concentración 0,01 mg·L⁻¹ hasta 0,16 mg·L⁻¹. La CL₅₀ a 48 h de exposición fue 1,87 veces más tóxico que la CL₅₀ a 24 h de exposición.

Tabla N°3

Efecto individual de aroclor 1254 sobre *Daphnia magna* expuesta a 48 h de exposición.

<i>Daphnia magna</i>		
Efecto individual aroclor 1254		
Concentración (mg·L ⁻¹)	(% M)	
	24 h (± D.E.)	48 h (± D.E.)
0,0	0,00 (± 0,00)a	0,0 (± 0,00)a
0,01	32,50 (± 1,25)b	42,50 (± 1,25)b
0,02	42,50 (± 1,25)bc	60,00 (± 0,00)c
0,04	50,00 (± 0,00)c	65,00 (± 1,44)c
0,08	70,00 (± 2,04)d	75,00 (± 1,44)d
0,16	80,00 (± 2,04)d	97,50 (± 1,25)e
CL ₅₀	0,030	0,016
CL ₅₀ -inferior	0,014	0,009
CL ₅₀ -superior	0,063	0,029
PNEC	0,00003	0,000016
NOEC	< 0,01	< 0,01
LOEC	0,01	0,01
K-W	106,25*	22,17
Sig.	0,00	0,00
Estadístico de Levene	1,64	10,40
Sig.	0,20	0,00
S-W	0,92	0,89
Sig.	0,08	0,01

% M: % mortalidad. D.E: Desviación Estándar. CL₅₀: Concentración Letal donde el 50% de los individuos expuestos mueren. CL₅₀-inferior: Límite inferior de la CL₅₀. CL₅₀-superior: Límite superior de la CL₅₀. PNEC: concentración sin efecto ecológico. NOEC: Concentración de efecto no observado. LOEC: Mínima concentración de observación de efecto. K-W: Prueba de Kruskal –Wallis. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p \geq 0,05$). *: Se utilizó el valor de F porque la homogeneidad de las varianzas y la normalidad (S-W) son mayores a 0,05.

Se definió el efecto ecotoxicológico agudo del Pb²⁺ en *D. magna* a 24 y 48 h de exposición (Tabla N°4), se observa un aumento en el porcentaje de mortalidad de *D. magna* con respecto al control desde la concentración 0,4275 mg·L⁻¹ hasta 13,68 mg·L⁻¹. La CL₅₀ a 48 h de exposición fue de 5,95 veces más tóxica que la CL₅₀ a 24 h de exposición.

Tabla N°4

Efecto individual de Pb²⁺ sobre *Daphnia magna* a 48 h de exposición.

Concentración (mg·L ⁻¹)	<i>Daphnia magna</i>	
	Efecto individual Pb ²⁺ (% M)	
	24 h (± D.E.)	48 h (± D.E.)
0,0	0,00 (± 0,00)a	0,00 (± 0,00)a
0,42	10,00 (± 0,00)ab	30,00 (± 0,00)b
0,85	15,00 (± 1,44)bc	37,50 (± 1,25)cd
1,71	25,00 (± 1,44)cd	45,00 (± 1,44)de
3,42	35,00 (± 1,44)de	52,50 (± 1,25)e
6,84	42,50 (± 1,25)ef	75,00 (± 1,44)f
13,68	52,50 (± 1,25)e	85,00 (± 1,44)f
CL ₅₀	10,66	1,79
CL ₅₀ -inferior	4,39	0,85
CL ₅₀ -superior	25,85	3,76
PNEC	0,010661	0,001795
NOEC	0,42	< 0,42
LOEC	0,85	0,42
K-W	25,76	25,96
Sig.	0,00	0,00
Estadístico de Levene	11,50	11,50
Sig.	0,00	0,00
S-W	0,92	0,93
Sig.	0,05	0,06

% M: % mortalidad. D.E: Desviación Estándar. CL₅₀: Concentración Letal donde el 50% de los individuos expuestos mueren. CL₅₀-inferior: Limite inferior de la CL₅₀. CL₅₀-superior: Limite superior de la CL₅₀. PNEC: concentración sin efecto ecológico. NOEC: Concentración de efecto no observado. LOEC: Mínima concentración de observación de efecto. K-W: Prueba de Kruskal –Wallis. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales (p ≥ 0,05).

Se halló el efecto ecotoxicológico agudo de la mezcla de aroclor 1254 y Pb²⁺, en base a ambos, en proporción 1:1 en *D. magna* a 24 y 48 h de exposición (Tabla N°5). Se verificó un incremento notable en el porcentaje de mortalidad de *D. magna* con respecto al control desde la concentración 0,01 + 0,850 mg·L⁻¹ hasta 0,16 + 13,68 mg·L⁻¹, evaluadas. La CL₅₀ de aroclor 1254 a 48 h de exposición fue 1,36 veces más tóxico que la CL₅₀ a 24 h de exposición. También, La CL₅₀ de Pb²⁺ a 48 h de exposición fue 1,39 veces más tóxico que la CL₅₀ a 24 h de exposición.

Tabla N°5

Efecto de la mezcla en proporción 1:1 de aroclor 1254 y Pb²⁺ sobre *Daphnia magna* expuesto a 48 h. Los valores de CL₅₀, PNEC, NOEC y LOEC, se determinaron en base a aroclor 1254 y a Pb²⁺.

<i>Daphnia magna</i>		
Concentración (aroclor 1254 + Pb ²⁺) (mg·L ⁻¹)	Efecto mezcla 1:1 aroclor 1254 y Pb ²⁺ (% M)	
	24 h (± D.E.)	48 h (± D.E.)
0,0	0,00 (± 0,00)a	0,00 (± 0,00)a
0,01 + 0,85	47,50 (± 2,39)b	55,00 (± 2,50)b
0,02 + 1,71	52,50 (± 1,25)bc	60,00 (± 2,04)b
0,04 + 3,42	67,50 (± 2,39)cd	80,00 (± 2,04)c
0,08 + 6,84	82,50 (± 1,25)de	92,50 (± 1,25)cd
0,16 + 13,68	95,00 (± 2,50)e	97,50 (± 1,25)d
CL ₅₀ (en base a aroclor 1254)	0,015	0,011
CL ₅₀ -inferior (en base a aroclor 1254)	0,008	0,006
CL ₅₀ -superior (en base a aroclor 1254)	0,028	0,020
PNEC (en base a aroclor 1254)	0,000015	0,000011
NOEC (en base a aroclor 1254)	< 0,01	< 0,01
LOEC (en base a aroclor 1254)	0,01	0,01
CL ₅₀ (en base a Pb ²⁺)	1,27	0,91
CL ₅₀ -inferior (en base a Pb ²⁺)	0,67	0,49
CL ₅₀ -superior (en base a Pb ²⁺)	2,40	1,67
PNEC (en base a Pb ²⁺)	0,0011	0,00091
NOEC (en base a Pb ²⁺)	0,85	0,85
LOEC (en base a Pb ²⁺)	< 0,85	< 0,85
K-W	21,13	21,22
Sig.	0,00	0,00
Estadístico de Levene	3,17	1,39
Sig.	0,03	0,27
S-W	0,89	0,84
Sig.	0,01	0,00

% M: % mortalidad. D.E: Desviación Estándar. CL₅₀: Concentración Letal donde el 50% de los individuos expuestos mueren. CL₅₀-inferior: Límite inferior de la CL₅₀. CL₅₀-superior: Límite superior de la CL₅₀. PNEC: concentración sin efecto ecológico. NOEC: Concentración de efecto no observado. LOEC: Mínima concentración de observación de efecto. K-W: Prueba de Kruskal –Wallis. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales (p≥ 0,05).

Se evaluó el efecto ecotoxicológico agudo de la mezcla de aroclor 1254 y Pb²⁺, en base a ambos, proporción 3:2 en *D. magna* a 24 y 48 h de exposición (Tabla N°6). Se verificó un incremento notable en el porcentaje de mortalidad de *D. magna* con respecto al control desde la concentración 0,03 + 1,71 mg·L⁻¹ hasta 0,48 + 27,36 mg·L⁻¹. La CL₅₀ a 48 h de exposición de aroclor 1254 fue 1,50 veces

más tóxico que la CL₅₀ a 24 h de exposición. Incluso, la CL₅₀ a 48 h de Pb²⁺ fue 1,51 veces más tóxica que la CL₅₀ a 24 h de exposición.

Tabla N°6

Efecto de la mezcla en proporción 3:2 de aroclor 1254 y Pb²⁺ sobre *D. magna* expuesto a 48 h. Los valores de CL₅₀, PNEC, NOEC y LOEC, se determinaron en base a aroclor 1254 y a Pb²⁺.

<i>Daphnia magna</i>		
Concentración (aroclor 1254 + Pb ²⁺) (mg·L ⁻¹)	Efecto mezcla 3:2 aroclor 1254 y Pb ²⁺ (% M)	
	24 h (± D.E.)	48 h (± D.E.)
0,0	0,00 (± 0,00)a	0,00 (± 0,00)a
0,03 + 1,71	65,00 (± 1,44)b	77,50 (± 1,25)b
0,06 + 3,42	75,00 (± 1,44)c	87,50 (± 1,25)c
0,12 + 6,84	87,50 (± 1,25)d	95,00 (± 1,44)cd
0,24 + 13,68	90,00 (± 0,00)d	97,50 (± 1,25)d
0,48 + 27,36	100,00 (± 0,00)e	100,00 (± 0,00)d
CL ₅₀ (en base a aroclor 1254)	0,012	0,008
CL ₅₀ -inferior (en base a aroclor 1254)	0,005	0,003
CL ₅₀ -superior (en base a aroclor 1254)	0,032	0,021
PNEC (en base a aroclor 1254)	0,000012	0,000008
NOEC (en base a aroclor 1254)	< 0,03	< 0,03
LOEC (en base a aroclor 1254)	0,03	0,03
CL ₅₀ (en base a Pb ²⁺)	0,71	0,47
CL ₅₀ -inferior (en base a Pb ²⁺)	0,27	0,19
CL ₅₀ -superior (en base a Pb ²⁺)	1,82	1,17
PNEC (en base a Pb ²⁺)	0,00071	0,00047
NOEC (en base a Pb ²⁺)	< 1,71	< 1,71
LOEC (en base a Pb ²⁺)	1,71	1,71
K-W	22,16	20,36
Sig.	0,00	0,00
Estadístico de Levene	25,00	5,93
Sig.	0,00	0,00
S-W	0,74	0,63
Sig.	0,00	0,00

% M: % mortalidad. D.E: Desviación Estándar. CL₅₀: Concentración Letal donde el 50% de los individuos expuestos mueren. CL₅₀-inferior: Límite inferior de la CL₅₀. CL₅₀-superior: Límite superior de la CL₅₀. PNEC: concentración sin efecto ecológico. NOEC: Concentración de efecto no observado. LOEC: Mínima concentración de observación de efecto. K-W: Prueba de Kruskal –Wallis. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales (p≥ 0,05).

Para esta última mezcla de aroclor 1254 y Pb^{2+} , en base a ambos, se evidenció un efecto ecotoxicológico en las cinco concentraciones presentando un aumento en el porcentaje de mortalidad con respecto al control desde la concentración $0,04 + 0,850 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta la mezcla evaluada $0,64 + 13,68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La CL_{50} de aroclor 1254 a 48 h de exposición fue 1,33 veces más tóxica que la CL_{50} a 24 h de exposición. En adición, la CL_{50} a 48 h de Pb^{2+} fue 1,38 veces más tóxica que la CL_{50} a 24 h de exposición (tabla N°7).

Tabla N°7

Efecto de la mezcla en proporción 4:1 de aroclor 1254 y Pb²⁺ sobre *D. magna* expuesto a 48 h. Los valores de CL₅₀, PNEC, NOEC y LOEC, se determinaron en base a aroclor 1254 y a Pb²⁺.

<i>Daphnia magna</i>		
Concentración (aroclor 1254 + Pb ²⁺) (mg·L ⁻¹)	Efecto mezcla 4:1 aroclor 1254 y Pb ²⁺ (% M)	
	24 h (± D.E.)	48 h (± D.E.)
0,0	0,00 (± 0,00)a	0,00 (± 0,00)a
0,04 + 0,85	85,00 (± 1,44)b	90,00 (± 0,00)b
0,08 + 1,71	90,00 (± 0,00)bc	95,00 (± 1,44)bc
0,16 + 3,42	95,00 (± 2,50)bc	97,50(± 1,25)c
0,32 + 6,84	100,00 (± 0,00)c	100,00 (± 0,00)c
0,64 + 13,68	100,00 (± 0,00)c	100,00 (± 0,00)c
CL ₅₀ (en base a aroclor 1254)	0,004	0,003
CL ₅₀ -inferior (en base a aroclor 1254)	0,001	0,001
CL ₅₀ -superior (en base a aroclor 1254)	0,014	0,012
PNEC (en base a aroclor 1254)	0,000004	0,000003
NOEC (en base a aroclor 1254)	< 0,04	< 0,04
LOEC (en base a aroclor 1254)	0,04	0,04
CL ₅₀ (en base a Pb ²⁺)	0,083	0,060
CL ₅₀ -inferior (en base a Pb ²⁺)	0,02	0,015
CL ₅₀ -superior (en base a Pb ²⁺)	0,29	0,246
PNEC (en base a Pb ²⁺)	0,000083	0,00006
NOEC (en base a Pb ²⁺)	< 0,85	< 0,85
LOEC (en base a Pb ²⁺)	0,85	0,85
K-W	19,67	18,69
Sig.	0,00	0,00
Estadístico de Levene	10,60	20,20
Sig.	0,00	0,00
S-W	0,59	0,53
Sig.	0,00	0,00

% M: % mortalidad. D.E: Desviación Estándar. CL₅₀: Concentración Letal donde el 50% de los individuos expuestos mueren. CL₅₀-inferior: Límite inferior de la CL₅₀. CL₅₀-superior: Límite superior de la CL₅₀. PNEC: concentración sin efecto ecológico. NOEC: Concentración de efecto no observado. LOEC: Mínima concentración de observación de efecto. K-W: Prueba de Kruskal –Wallis. Estadístico de Levene: Prueba para evaluar la homogeneidad de varianzas. S-W: Prueba de Shapiro - Wilks para evaluar la normalidad. Letras minúsculas iguales en una misma columna muestran que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales (p≥ 0,05).

La estimación a las 48 h para PNEC fue de 0,000016 mg·L⁻¹ para el ensayo de efecto individual de aroclor 1254 con *D. magna*. Este valor fue similar al valor de la subcategorías E2: Ríos (0,000014 mg·L⁻¹), y por ende en base al PNEC se constata que el valor de calidad ambiental en la normatividad es adecuado, y conserva y protege a la vida acuática.

El valor obtenido a las 48 h para PNEC fue de 0,0017 mg·L⁻¹ para el ensayo de efecto individual del Pb²⁺ con *D. magna*. Este valor es ligeramente menor a los valores de las subcategorías E2: Ríos (costa y sierra, selva) (0,0025 mg·L⁻¹). Por lo tanto, genera riesgo ambiental al ser menor al valor de calidad ambiental para el Pb²⁺ y no protege al sistema acuático.

Por otro lado, la toxicidad de la mezcla aroclor 1254 - Pb²⁺ incrementa al aumentar la proporción de aroclor 1254, en relación al tipo de interacción de la mezcla de ambos compuestos, según el modelo de PS. Para ambos compuestos todos los cocientes fueron superiores a uno y en relación al aroclor 1254 se puede mencionar que la proporción 3:2 y 4:1 generaron un mayor valor en el efecto de sinergia que la proporción 1:1 en 1,37 y 3,67 veces, respectivamente. En cuanto al Pb²⁺ las proporciones 3:2 y 4:1 produjeron un incremento en la sinergia que la proporción 1:1 en 1,92 y 15,14 veces, respectivamente (tabla N°8).

Tabla N°8

Valores de CL_{50- 48 h} (mg·L⁻¹) y PS (Proporción – Sinergia) para determinar el tipo de interacción entre compuestos (aroclor 1254 y Pb²⁺).

Mezcla	CL _{50- 48 h} (mg·L ⁻¹) en base a aroclor 1254	CL _{50- 48 h} (mg·L ⁻¹) en base a Pb ²⁺	PS		Interacción
			aroclor 1254	Pb ²⁺	
1:1	0,011	0,91	1,45	1,97	Sinergia
3:2	0,008	0,47	2,00	3,80	Sinergia
4:1	0,003	0,060	5,33	29,83	Sinergia

Dónde: PS = 1 indica aditividad, PS > 1 muestra sinergia y PS < 1 orienta el antagonismo.

DISCUSIÓN

El uso de bioindicadores es una metodología apropiada para la evaluación de calidad de los cuerpos de agua dulce. Estos organismos de prueba se emplean para diagnosticar el riesgo al que se encuentran expuestos en el ecosistema acuático. Los efectos que pueden generarse abarcan desde agudos a crónicos,

deletéreos o no deletéreos, en diferentes niveles de organización desde molecular hasta poblacional, comunitario y ecosistémico (Iannacone, Alvariño & Mamani, 2010).

Para aroclor 1254 se obtuvo una CL_{50} de 0,030 y 0,016 $mg \cdot L^{-1}$, a las 24 y 48 h, respectivamente. En el estudio de Maki y Johnson (1975) se usó aroclor 1254 sobre *D. magna* y se obtuvo una $CL_{50-14d} = 0,024 mg \cdot L^{-1}$. Posiblemente, estos resultados no coinciden con los obtenidos en este trabajo por el tipo de compuesto soluble empleado que fue acetona. En la actualidad las diluciones con compuestos semi volátiles se realizan con el solvente orgánico diclorometano.

Los bifenilos policlorados como el EDC aroclor 1242 presentan para *D. magna* una $CL_{50-48h} = 0,23 mg \cdot L^{-1}$. Esta molécula genera un estrés sobre los neonatos de este microcrustáceo (< 24 h), al producir la inhibición de muda por la estructura de múltiples anillos, y actuar como un imitador de esteroides al receptor ecdisteroide (Zou & Fingerman, 1997). Estas hormonas abundan en la etapa embrionaria y son críticas para su desarrollo. La privación o inhibición de estas hormonas produce anomalías tardías en el desarrollo debido a que regulan el crecimiento, la maduración y la reproducción. Resultados similares de exposición al EDC fenarimol sobre neonatos de *D. magna* (< 1 h) muestran una disminución de la ecdisoma endógena que retarda la muda, detención parcial del desarrollo y crecimiento inconcluso de antenas y espinas de caparazón (Mu & LeBlanc, 2002). En adición, se menciona que la primera muda de *D. magna*, se genera en los primeros dos días de vida (Brito, 2013). También, la exposición de 0,5 $mg \cdot L^{-1}$ del EDC atrazina, durante el desarrollo embrionario de *Daphnia pulicaria* Forbes, 1893 originó modificación del sexo hacia individuos machos,

actuando en la enzima aromatasa que cataliza la transformación de la testosterona en estradiol (Rodríguez, Medesani, & Fingerman, 2006). El uso del EDC aroclor 1248 sobre el pez *Ameirus nebulosus* Lesueur, 1819, generó disrupción endocrina disminuyendo la respuesta de hormona esteroide, cortisol y hormona tiroidea T₃ (Iwanowicz, Blazer, McCormick, VanVeld, & Ottinger, 2009).

Los valores hallados de CL₅₀ de Pb²⁺ para 48 h de exposición en *D. magna* se acercan al valor encontrado por Zárate y Sierra (2009), quienes emplearon el metal Pb²⁺ a las 24 h sobre *D. magna* con una CL₅₀= 9,49 mg·L⁻¹. Altindag et al. (2008) mostraron que Pb²⁺ a las 24 h sobre la misma especie presentó un valor de CL₅₀= 0,441 mg·L⁻¹. Okamoto et al. (2014) encontró que para el Pb²⁺ sobre *D. magna* presenta un valor de CL₅₀= 0,28 mg·L⁻¹. Otros ensayos manifiestan que la toxicidad del Pb²⁺ para la especie en mención es dispersa y voluble, en un rango desde 0,15 mg·L⁻¹ hasta 4,92 mg·L⁻¹. Los diferentes resultados identificados pueden ser consentidos por la variabilidad genética de cada individuo de *D. magna* y diferencias en la condiciones de cultivo como la preparación de agua dura reconstituida con solución de biotina, vitamina B12, tiamina y selenito de sodio (Baird, Barber, Bradley, Soares, & Calow, 1985).

Nuestros resultados de pH nos indican que los valores disminuyen con el tiempo de exposición, consiguiendo un incremento en la toxicidad aguda. La toxicidad del Pb²⁺ para *D. magna* fue menor en medio alcalino que en condiciones ácidas. Las condiciones del bioensayo como, dureza, alcalinidad, pH, temperatura reduce la disponibilidad del compuesto y como consecuencia la toxicidad en el medio acuático (Tomaila & Iannacone, 2017). Se ha observado que a condiciones bajas de pH, un mayor efecto de toxicidad, y que esta dependía de

la composición físico-química del medio. La CL_{50} hallada para *D. magna* fue de $1,79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, la cual se encuentra dentro del rango mencionado anteriormente y después de 48 h fue suficiente para eliminar el 85 % de la población en la concentración más alta.

En adición, la sinergia ocasionada en todas las proporciones de los dos compuestos evaluados (aroclor 1254 y Pb^{2+}), se puede atribuir al efecto del estrés oxidativo del Pb^{2+} en individuos de *D. magna*, que causan un incremento en las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Kim, Yim, Bae, & Lee, 2016). En el estudio de Kim, Kim, Kim, Won, y Lee, (2018), se evidenció una modulación oxidativa de marcadores de estrés oxidativo en *D. magna* por acción de Pb^{2+} y que se encuentran altamente involucrados en la protección celular. Incluso, el Pb^{2+} es considerado un disruptor endocrino. En la exposición de las larvas de pez cebra, *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822, a $30 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ del Pb^{2+} , generó una disminución notable en los niveles de hormona tiroidea (Miao et al., 2015). También, se encontró que la exposición del Pb^{2+} sobre individuos del pez *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 aumentó la actividad antioxidante SOD, transformando eficientemente el oxígeno (Ochoa & González, 2008).

La toxicidad de las proporciones 3:2 y 4:1 fueron las más altas debido al aumento de aroclor 1254 y del Pb^{2+} , y que estas generaron un mayor valor en el efecto de sinergia que la proporción 1:1 en 1,37 y 3,67 veces, respectivamente. Se halló efecto sinérgico en los tres tipos de mezclas. Este efecto de sinergismo probablemente ocurre porque ambas sustancias generan un efecto de disrupción endocrina en diferentes enzimas de *D. magna*. En la actualidad, no hay datos ecotoxicológicos de mezclas binarias entre un compuesto orgánico (aroclor

1254) y un metal (Pb^{2+}) sobre modelos biológicos. Sin embargo, en un estudio de mezclas del diazinón y atrazina sobre *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894, también consiguieron resultados de sinergismo (Banks, Turner, Wood, & Matthews, 2005). En otro estudio de mezclas binarias se menciona que existe un efecto aditivo entre deltametrina y cobre sobre *D. magna* (< 24 h) (Barata, Baird, Nogueira, Soares, & Riva, 2006).

En la comparación de los valores PNEC para las 48 h de exposición con los ECA Cat 4- E2 ríos (costa y sierra, selva), el ECA para bifenilos policlorados brindaría protección para la conservación del medio acuático, debido a que encontramos valores similares a este en base al PNEC; sin embargo, el ECA para plomo no ofrecería una adecuada conservación para la vida acuática, al estar por encima del PNEC encontrado con *D. magna*. Finalmente, se debe realizar más evaluaciones de compuestos químicos para determinar su comportamiento individual y de mezcla, sobre diferentes modelos biológicos, que nos permitan asegurar la posible conservación del medio dulceacuícola.

CONCLUSIONES

Los resultados de CL_{50-48h} evidencia que el grado de toxicidad de los compuestos evaluados con *D. magna*, en orden descendente fue: aroclor 1254 > Pb^{2+} . Las CL_{50-48h} determinadas para Pb^{2+} a través del método Excel probit se acercaron a las CL_{50-24h} y CL_{50-48h} , hallados en la bibliografía. Además, en todas las proporciones existe una sinergia entre aroclor 1254 y el Pb^{2+} , y que la proporción 3:2 y 4:1 generaron mayores valores de la proporción – sinergia (PS) que la proporción 1:1. Con respecto a los PNEC hallados y su relación con los ECA Cat 4- E2 ríos (costa y sierra, selva), se comprueba que el valor del parámetro bifenilos policlorados es apropiado; sin embargo, la concentración límite del ECA

para Pb^{2+} no es adecuada y este debe disminuir numéricamente para confirmar la conservación del medio acuático.

Conflicto de intereses

Los autores que aparecen en este artículo declaran que no existe ningún potencial conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alpha, R. (2017). Calculating LD₅₀/LC₅₀ using Probit analysis in Excel. [fecha de acceso 17 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://probitanalysis.wordpress.com/2016/07/07/first-blogpost/>
- Altindag, A., Borga, M., Yigit, S., & Baykan, O. (2008). The acute toxicity of lead nitrate in *Daphnia magna* Straus. *Journal of Biotechnology*, 7(23), 4298-4300.
- Autoridad Nacional del Agua [ANA]. (2014). Diagnóstico de la Calidad de los Recursos Hídricos en el Perú 2000- 2012. Disponible en: <http://repositorio.ana.gob.pe/bitstream/handle/ANA/212/ANA0000028.pdf;jsessionid=D1D30520A7773DF5C8E3901F626B537C?sequence=1>
- Baird, J., Barber, I., Bradley, M., Soares, M., & Calow, P. (1985). A Comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21(3), 216-229.
- Banks, K., Turner, P., Wood, S., & Matthews, C. (2005). Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 28-36.
- Barata, C., Baird, D., Nogueira, A., Soares, A., & Riva, M. (2006). Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna*

- Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology*, 78(1), 1-14.
- Brito, P. (2013). Determinación de efectos subletales y crónicos en *Daphnia magna* expuesta a efluente de celulosa kraft (Tesis de pregrado). Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Burger, M., & Pose, D. (2010). Plomo salud y ambiente – Experiencia en Uruguay. Organización Mundial de la Salud. 1-141. Disponible en: http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-salud-y-ambiente&alias=31-plomo-salud-y-ambiente-experiencia-en-uruguay&Itemid=307
- Ministerio del Ambiente. (2017). Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. *Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua y establecen Disposiciones Complementaria*. Lima: MINAM.
- Gaete, H., & Chávez, C. (2007). Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc, y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (*Cladocera, Crustacea*). *Limnetica*, 27(1), 1-10.
- Gaete, H., Guerra, R., Carvajal, D., Mukarker, M., & Lobos, G. (2014). Evaluación de la genotoxicidad de las aguas costeras de Chile central sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*. *Hidrobiológica*, 24 (3), 271-279.
- Hewlett, P., & Plackett, R. (1959). A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs. Non-interactive action. *Biometrics*, 15(4). 591- 610.
- Iannacone, J., Alvariño, L., & Paredes, C. (2009). Evaluación del riesgo ambiental del arseniato de plomo en bioensayos con ocho organismos no destinatario. *Acta Toxicológica Argentina*, 4(1), 73-82.

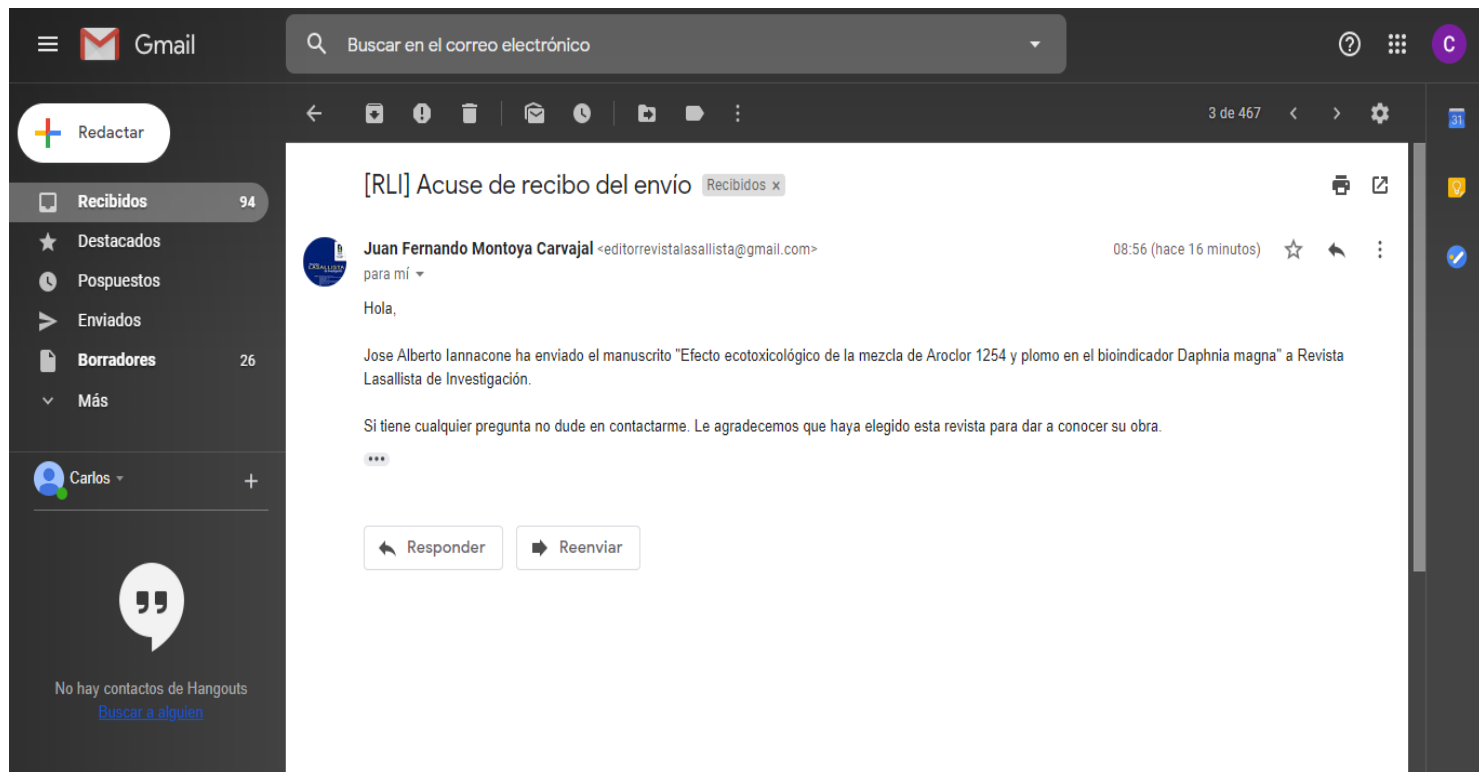
- Iannacone, J., Alvariño, L., & Mamani, N. (2010). Estimación de la toxicidad combinada de mezclas de Furadán 4F y Monofos sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 6(1), 23-29.
- Iwanowicz, L., Blazer, V., McCormick, S., VanVeld, P., & Ottinger, C. (2009). Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Aquatic Toxicology*, 93(1), 70-82.
- Kim, H., Yim, B., Bae, C. & Lee, Y. (2016). Acute toxicity and antioxidant responses in the water flea *Daphnia magna* to xenobiotics (Cadmium, Lead, Mercury, Bisphenol A, and 4-Nonylphenol). *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 9(1), 41-49.
- Kim, H., Kim, J., Kim, P., Won, E. & Lee, Y. (2018). Response of antioxidant enzymes to Cd and Pb exposure in water flea *Daphnia magna*: Differential metal and age - Specific patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 209, 28-36.
- Maki, A., & Johnson, H. (1975). Effects of PCB (Aroclor 1254) and p,p'DDT on Production and Survival of *Daphnia Magna* Strauss. *Environmental Contamination & Toxicology*, 13 (4), 412-416.
- Miao, W., Zhu, B., Xiao, X., Li, Y., Dirbaba, N., Zhou, B., & Wu, H. (2015). Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bioconcentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 161, 117-126.

- Mu, X., & LeBlanc, G. (2002). Environmental antiestrogens alter embryo development in the Crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 287-292.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OECD]. (2011). *Manual for the Assessment of Chemicals. Annex 1 Calculation of PNEC*. Disponible en: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/49188998.pdf>
- Ochoa, D., & González, J. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55, 115-126.
- Okamoto, A., Yamamuro, M., & Tatarazako, N. (2014). Acute toxicity of 50 metals for *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 35(7), 824-830.
- Rodríguez, E., Medesani, D., & Fingerman, M. (2006). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 661-671.
- Sokol, R., Bush, B., Wood, L., & Jahan-Parwar, B. (1992). Production of aqueous PCB solutions for environmental toxicology. *Chemosphere*, 24 (4), 483-495.
- Tomaila, J., & Iannaccone, J. (2018). Toxicidad letal y subletal del arsénico, cadmio, mercurio y plomo sobre el pez *Parachanna innesi* neon tetra (Characidae). *Revista de Toxicología*, 35. 95-105.
- Zárate, A., & Sierra, M. (2008). Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del plomo y plata en los vertimientos de una industria galvánica, mediante ensayos toxicológicos sobre *Daphnia magna* (tesis de pregrado). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia

Zou, E., & Fingerman, M. (1997). Effects of Estrogenic Xenobiotics on Molting of the Water Flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(3), 281-285.

ANEXOS

EVIDENCIA DEL ENVÍO A REVISTA CIENTÍFICA



COPIA DE RESOLUCIÓN DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

CIENTÍFICA
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FORMATO DE SOLICITUD DE JURADO EXAMINADOR DE LA TESIS

Lima, 18 de abril de 2018

Magister
GONZALO FRANCISCO FLORES ROCA
Director Académico de la Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad Científica del Sur
Presente.

De mi consideración:

Es muy grato dirigirme a usted para hacer de su conocimiento que el Proyecto de Tesis titulado: **"EFECTO TOXICOLÓGICO DE LA MEZCLA AROCLOR 1254 Y PLOMO EN EL BIOINDICADOR *Daphnia Magna*"**, cuyo autor es **Carlos Nicolás Dellafreda Tesén**, Bachiller en Ingeniería y Gestión Ambiental, y con el visto bueno del Asesor de Tesis **Dr. José Alberto Iannacone Oliver**, luego de las revisiones y correcciones pertinentes al documento del Proyecto de Tesis, considero que se encuentra apto para ser evaluado; por lo que solicito la designación del Jurado Examinador.

Atentamente.


Mag. Gonzalo Francisco Flores Roca
Director Académico
Carrera de Ingeniería Ambiental

**INSTRUMENTO E INFORMACIÓN DE UTILIDAD USADO EN LA
INVESTIGACIÓN**

Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas

