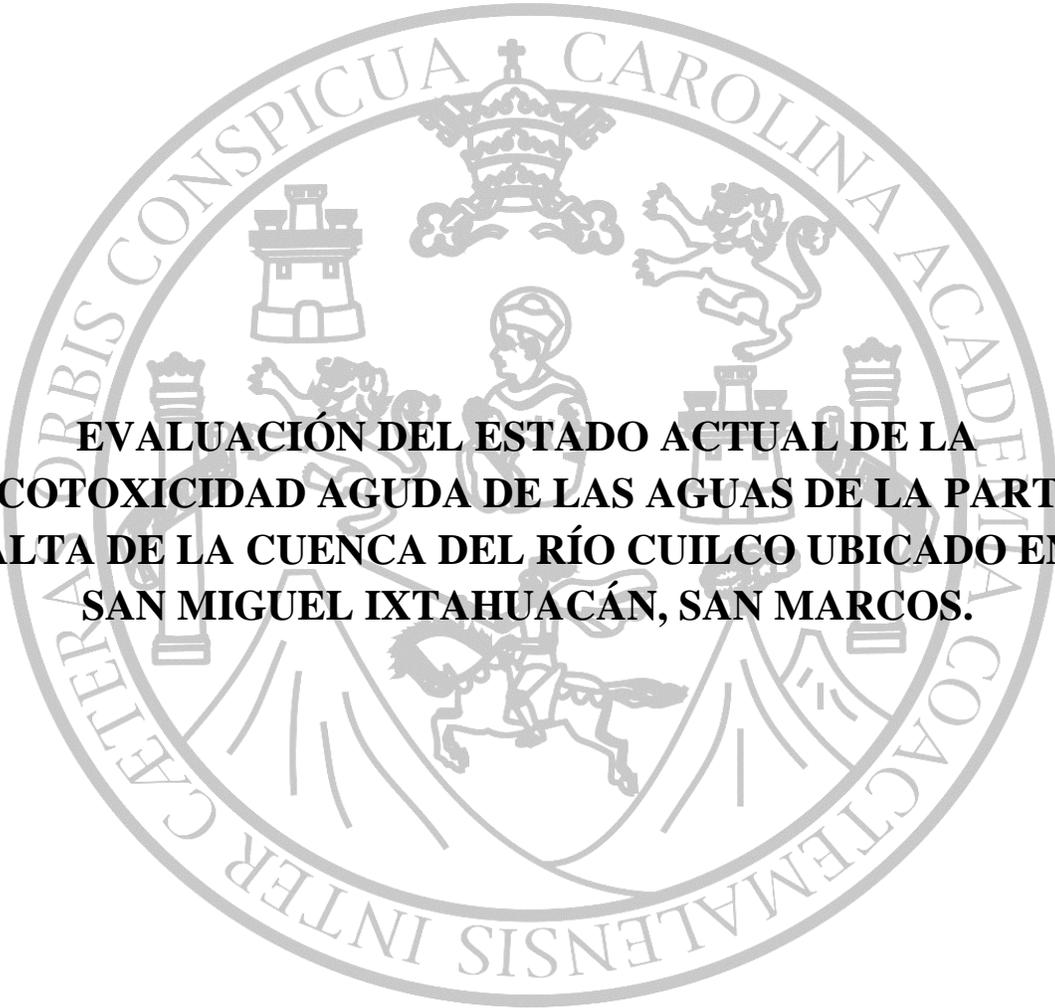


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure of a man on horseback, surrounded by various symbols including a crown, a castle, and a lion. The text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS" is inscribed around the perimeter of the seal.

**EVALUACIÓN DEL ESTADO ACTUAL DE LA
ECOTOXICIDAD AGUDA DE LAS AGUAS DE LA PARTE
ALTA DE LA CUENCA DEL RÍO CUILCO UBICADO EN
SAN MIGUEL IXTAHUACÁN, SAN MARCOS.**

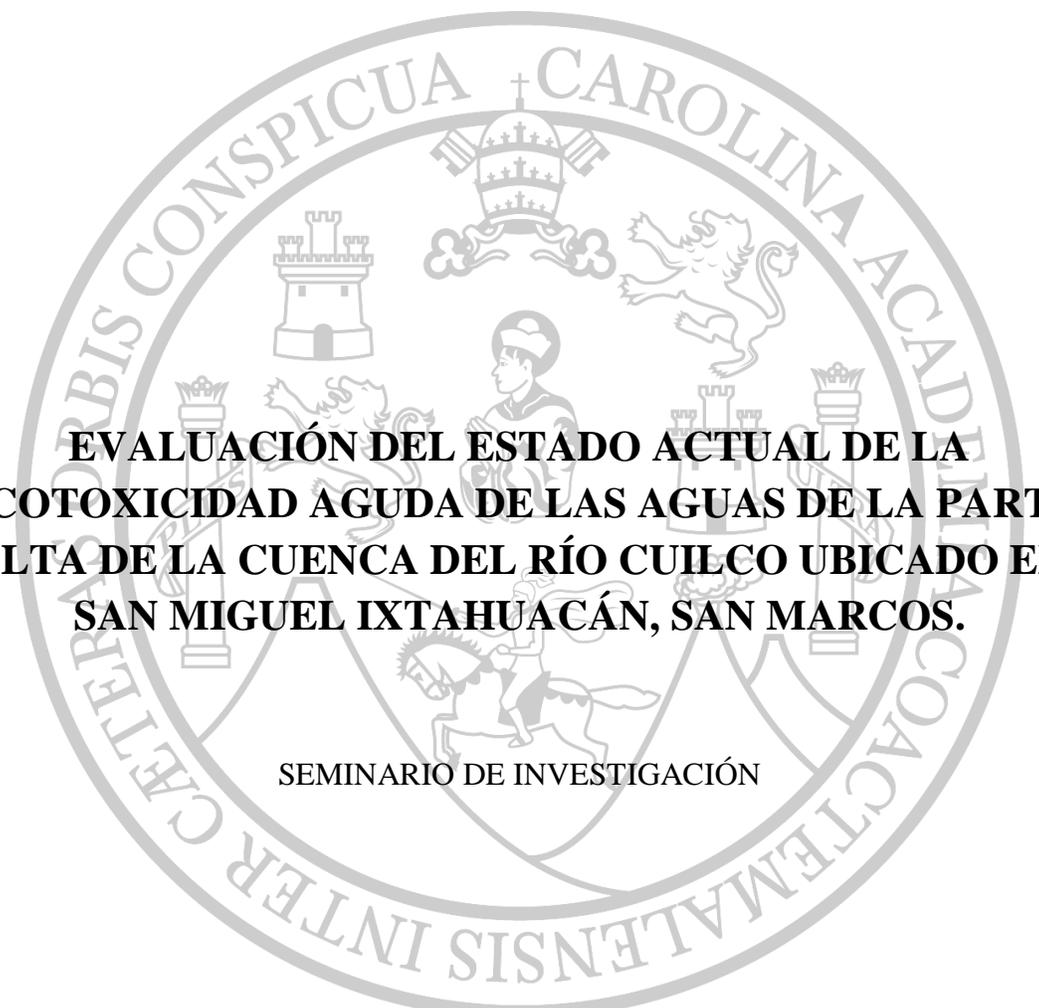
ANDRÉS JOSUÉ GARCÍA BRENNEN

MARÍA ALEJANDRA SANDOVAL LAPARRA

QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure of a man on horseback, surrounded by various symbols including a castle, a lion, and a crown. The Latin motto "ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACAD" is visible at the top, and "CETEMALENSIS INTER" at the bottom.

**EVALUACIÓN DEL ESTADO ACTUAL DE LA
ECOTOXICIDAD AGUDA DE LAS AGUAS DE LA PARTE
ALTA DE LA CUENCA DEL RÍO CUILCO UBICADO EN
SAN MIGUEL IXTAHUACÁN, SAN MARCOS.**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

ANDRÉS JOSUÉ GARCÍA BRENNEN

MARÍA ALEJANDRA SANDOVAL LAPARRA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2014

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

DEDICATORIA

A Dios

Por darnos sabiduría, salud, protección y fuerzas para seguir adelante y no desmayar.

A Nuestros Padres, familia y amigos

Por estar a lado nuestro sirviendo de ejemplo de vida y apoyándonos de manera incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A: Ph.D. Karin Herrera por su incondicional apoyo como asesora de este proyecto; MSc. Blanca Samayoa, por su aporte con la revisiones en esta investigación; Ing. Peter Hughes, Ing. Gustavo Gómez, Ing. José Carlos Quezada y al Departamento de Medio Ambiente, Mina Marlin, Montana Exploradora de Guatemala, S.A. por el financiamiento brindado; Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, por su apoyo técnico.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN	01
II. RESUMEN	02
III. ANTECEDENTES	04
A. Hidrografía	04
B. Río Cuilco	05
C. Estudios limnológicos	05
D. Calidad del agua	05
1. Recursos convencionales	06
2. Recursos no convencionales	06
3. Criterios biológicos para evaluar la calidad del agua	07
E. Ecotoxicidad del agua	07
1. Contaminación del agua	07
2. Ecotoxicología	08
2.1 Ecotoxicidad aguda	09
3. Microbioensayos ecotoxicológicos	09
3.1 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando la bacteria <i>Vibrio fischeri</i>	11
3.1.1 Aplicaciones del microbioensayo ecotoxicológico utilizando la bacteria <i>Vibrio fischeri</i>	12
3.2 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el alga <i>Selenastrum capricornotum</i>	13
3.3 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el protozoo <i>Tetrahymena thermophila</i>	14
3.4 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el microcrustáceo <i>Thamnocephalus platyurus</i>	16
3.5 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el	

rotífero <i>Brachonius calyciflorus</i>	16
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. OBJETIVOS	19
A. General	19
B. Específicos	19
VI. HIPÓTESIS	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
A. Universo	21
B. Muestra	21
C. Tipo de estudio	21
D. Recurso humano	21
1. Investigadores	21
2. Asesora	22
3. Grupo de apoyo	22
E. Materiales	22
1. Equipo de campo	22
2. Equipo de laboratorio	22
3. Reactivos	24
4. Software	24
F. Diseño de investigación	24
1. Muestreo	25
2. Análisis de muestra	26
G. Metodología	27
1. Toxkit utilizando <i>V. fischeri</i>	27
1.1 Procedimiento	27
2. Toxkit utilizando <i>S. capricornotum</i>	28
2.1 Procedimiento	28
3. Toxkit utilizando <i>T. thermophila</i>	29
3.1 Procedimiento	29
4. Toxkit utilizando <i>T. platyurus</i>	30
4.1 Procedimiento	30

5. Toxkit utilizando <i>B. calyciflorus</i>	31
5.1 Procedimiento	31
H. Análisis de datos	32
1. Sistema de clasificación de toxicidad aplicado a una batería de microbiotest	33
VIII. RESULTADOS	34
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
X. CONCLUSIONES	43
XI. RECOMENDACIONES	44
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
XIII. ANEXOS	49

I. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

El agua es esencial para la vida y conservación del ambiente, es un valioso recurso que debe ser protegido y atesorado por todos los habitantes del planeta. La contaminación del vital líquido está definido como cualquier cambio químico, biológico o físico en su calidad, que tenga un efecto nocivo sobre los organismos vivos o que resulte imposible de utilizar para los fines deseados. Los principales contaminantes que puede presentar son: la materia sedimentable, los nutrientes de las plantas, las sustancias químicas, las sustancias orgánicas persistentes y los metales (APA, 2012).

El municipio de San Miguel Ixtahuacán, departamento de San Marcos, se encuentra ubicado a 314 Km de la ciudad capital de Guatemala. Este municipio cuenta con tres ríos importantes: río Cuilco, río Cantzelá y río Tzalá. El río Cuilco que pasa al sudeste de la cabecera Municipal, recorriendo las comunidades de Siete platos, Salitre, la Peña, El Zapote, Tierra Blanca el Zapote, la Lima y el Arenal, en dirección hacia el norte hasta cruzar la frontera con México, siendo utilizado por dichas comunidades para actividades agropecuarias, pesca y uso humano, entre otras. El recorrido del río Cuilco que será objeto de estudio en esta investigación, abarca 800 metros al noreste del casco urbano del municipio de Sipacapa, hasta 800 metros al noroccidente de la aldea Palimonte ubicada en el municipio de San Miguel Ixtahuacán (INSIVUMEH I. d., 2012; SEGEPLAN, 2012).

Con este estudio se clasificó la ecotoxicidad del río Cuilco, en cinco puntos de muestreo. El muestreo se llevó a cabo durante 6 meses del año, a través de una batería compuesta por cinco biotest evaluando: bacterias, algas, rotíferos, microcrustáceos y protozoos, utilizando controles de calidad externos e internos a lo largo de todo el estudio que validen estadísticamente cada uno de los resultados obtenidos. La fase de campo se realizó en el Laboratorio Ambiental de la Mina Marlín, de Montana Exploradora, ubicado en la jurisdicción de la Aldea San José, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos y en el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC.

II. RESUMEN

Literalmente vivimos en un mundo de agua. Todos los organismos vivos dependen de forma absoluta del agua. Un valioso recurso que debe ser protegido y atesorado por todos los habitantes del planeta. Este trabajo no pretende ser un análisis exhaustivo de las diferentes metodologías utilizadas para el control de los niveles de ecotoxicidad aguda en aguas, si no que busca crear una línea base para establecer la forma más efectiva de buscar la reducción del impacto que tienen algunas actividades antropogénicas que se llevan a cabo en el municipio de San Miguel Ixtahuacán, aledañas al río Cuilco. En el pasado se consideraba que los estudios químicos, físicos y microbiológicos del agua eran suficientes para determinar la calidad del agua del ambiente, actualmente se han realizado estudios que han revelado que el uso complementario de microbioensayos es una herramienta útil para la evaluación *in situ* de la salud de las aguas de lagos, ríos, mares, aguas tratadas, entre otras.

Se trabajó con cinco bioensayos, recomendados por diferentes instituciones nacionales e internacionales, cumpliendo con las normas COGUANOR y también con normas internacionales (APA, AFA, EPA, por mencionar algunas). La batería de bioensayos compuesta para esta investigación evaluó diferentes cadenas tróficas en el ecosistema, utilizando bacterias, algas, protozoos y microcrustáceos, en los cuales se evaluaron las clases de ecotoxicidad y la diferencia entre la época seca y la época lluviosa, para tal fin, se realizaron tres muestreos en época seca y tres muestreos en época lluviosa, determinando el punto con mayor actividad ecotoxicológica y la diferencia entre cada uno de los bioensayos en época seca y época lluviosa.

Los resultados cuantitativos y estadísticos más relevantes indican que existen cambios multifactoriales, primeramente diremos que existe una diferencia significativa ($P < 0.01$) entre la época seca y la época lluviosa. Los muestreos realizados en época lluviosa alcanzan los niveles ecotoxicológicos clase II y III más significativos en los muestreos 3 y 5, durante la época seca los niveles ecotoxicológicos se mantienen estables con clasificación I y II, experimentalmente se sabe que el punto con mayor nivel de riesgo ecotoxicológico es el RC4, con un resultado clase III del 33%. Al mismo tiempo, se valora

el hecho que los bioensayos son útiles cuando se forman baterías para análisis ecotoxicológico del agua, pues un solo bioensayo no daría un panorama global de la tendencia de los datos.

La comparación entre puntos de muestreo en época seca y lluviosa, han demostrado no tener diferencias estadísticas ($P > 0.01$), es decir que no existe diferencia entre puntos de muestreo.

Las recomendaciones de esta investigación van orientadas al seguimiento de los monitoreos del agua de la cuenca del río Cuilco, a través de la batería propuesta y al mismo tiempo evaluar de forma individual las sustancias tóxicas que puedan estar presentes en las aguas del río Cuilco, para controlar y aplicar mecanismos para la disminución del impacto de los mismos en dichas aguas.

III. ANTECEDENTES

El municipio de San Miguel Ixtahuacán, se encuentra ubicado al lado Nororiente de la cabecera Departamental de San Marcos y con una longitud de 2,050 metros sobre el nivel del mar, cuenta con clima frío y cálido. Entre las principales actividades económicas se encuentran el comercio y la producción de maíz, frijol, papa y café. Aunque ha habido protestas de parte de los habitantes del municipio, en su territorio se realiza la explotación minera de oro y plata de manera industrial. Colinda de la manera siguiente: ORIENTE: con el territorio del municipio de Santa Bárbara del Departamento de Huehuetenango, al NORTE: con el municipio de San Gaspar Ixchil del departamento de Huehuetenango, al PONIENTE: con los municipios de Concepción Tutuapa y Tejutla ambos del departamento de San Marcos, y al SUR: con los Municipios de Comitancillo y Sipacapa del departamento de San Marcos. San Miguel Ixtahuacán cuenta con 20 Aldeas y 39 caseríos actualmente. Las coordenadas de localización del centro urbano son: latitud 15° 16' 19" N; longitud, 91° 44' 56" O con una altitud de 2,050 msnm y una superficie de 184 km². Su fundación fue el 08 de agosto de 1828, el Nombre de IXTAHUACÁN proviene de la lengua Mam (EX TAWIL A' KAN), que A' KAN traducido al idioma español o castellano significa Laguna de Culebras, así pues que ya traducida la frase al castellano significa "Se fue el dueño del Agua de las Culebras". De acuerdo al Diagnostico Rural Participativo del municipio de San Miguel Ixtahuacán realizado en el año 2009, reporta una población de 37,388 habitantes (estos datos no reflejan exactamente la realidad ya que hay dos poblaciones que no han querido aportar datos acerca de su población las cuales son Aldea La Florida que cuenta con aproximadamente 1600 habitantes y la otra es el Caserío Cantzela que cuenta con aproximadamente 550 habitantes), mayoritariamente indígena perteneciente a la etnia Mam representando un 97.9% y un 2.1% no indígena (Pérez, 2011).

A. Hidrografía

El territorio de San Miguel Ixtahuacán es atravesado por la Sierra de los Cuchumatanes, entre sus ríos están: río Cuilco, que pasa al sudeste de la cabecera Municipal, recorriendo las comunidades de Siete platos, Salitre, la Peña, El Zapote, Tierra Blanca el Zapote, la

Lima y el Arenal; río Cantzéla, que pasa al norte de la cabecera Municipal recorriendo las comunidades de Chisnan, Ixcail, Satla, Cabecera Municipal, Sholtanan, Legual, Tzalé, las Maravillas y Cantzéla para luego desembocar en el río Cuilco y río Tzalá, que divide en parte al Municipio de San Miguel Ixtahuacán y Sipacapa, recorriendo las comunidades de Cabajchún, Chininguitz, Agel, Exial linda Vista y Mina Marlin (Pérez, 2011).

B. Río Cuilco

Nace en la Sierra Madre bajo el nombre de río Blanco, éste se une al río Las Manzanas y río San Isidro, formando el río Cuilco, que recorre los departamentos de Huehuetenango y San Marcos hacia el Golfo de México donde se ubica su vertiente. Posee una extensión de 1602.70 km², elevación de 1109 msnm, latitud 15° 24' 16'', longitud 91° 57' 15'' y caudal medio de 19.17 m³/s, ver mapa en anexo 1 (INSIVUMEH, 2005).

C. Estudios limnológicos

Hasta la fecha únicamente se encuentran datos a nivel general, como: ubicación, variaciones en los caudales, periodos de retorno, caudal en época seca, caudal en época lluviosa.

D. Calidad del agua

La investigación de la calidad del agua está orientada a la determinación del impacto que las actividades humanas tienen sobre las propiedades de la misma. Es por eso que los parámetros que se evalúan son aquellos que indican el estado actual y las tendencias futuras que caben esperarse del cuerpo de agua. La disponibilidad del agua es de suma importancia para el desarrollo de cualquier población. Sin embargo, la cantidad de los recursos disponibles cambia, dependiendo del clima y de las posibilidades de obtener cantidades adicionales de agua. La calidad del agua es la condición general que permite que el agua se emplee para usos concretos, está determinada por la hidrología, la fisicoquímica y la biología de la masa de agua a que se refiera. Las características hidrológicas son

importantes ya que indican el origen, cantidad del agua y tiempo de permanencia, entre otros datos. Estas condiciones tienen relevancia, ya que según los tipos de sustratos por los que viaja el agua, ésta contendrá diferentes sales en función de la composición y la solubilidad de los materiales de dicho sustrato. Así, las aguas que discurren por zonas calizas (rocas muy solubles) se cargarán fácilmente de carbonatos, entre otras sales. En el otro extremo, los cursos de agua que discurren sobre sustratos cristalinos, como los granitos, se cargarán muy poco de sales y aparecerá en cantidad apreciable la sílice. Los recursos disponibles deben dividirse entre numerosos usuarios, además de tener en cuenta las necesidades del medio ambiente. Los recursos hídricos son parte del ciclo natural del agua y al considerar el origen del agua, podemos hablar de recursos de agua convencionales y no convencionales (Margalef, 1983; Roldán Pérez, 1992; Fair, 1993; Fernández Cirelli, 2003).

1. Recursos convencionales

Son aquellos recursos hídricos que se obtienen de aguas superficiales o de aguas subterráneas. El uso de unas u otras depende de muchos factores, inicialmente de la disponibilidad de cada recurso. Normalmente las aguas superficiales ofrecen cantidades mayores de agua a corto plazo, mientras que las subterráneas son un recurso más constante (Fernández Cirelli, 2003).

2. Recursos no convencionales

Son aquellos recursos hídricos que se obtienen como por ejemplo: el agua de lluvia, desalinización del agua de mar o el tratamiento del agua residual. Otras soluciones son las aguas de escorrentía y el agua procedente del rocío o escarcha (Fernández Cirelli, 2003).

3. Criterios biológicos para evaluar la calidad del agua

El uso de técnicas de bioindicación, basados en la identificación y estructuración de las comunidades de microorganismos que habitan los diferentes sistemas acuáticos son una eficaz herramienta para evaluar la calidad de los cuerpos de agua. La calidad del agua se refiere a su aptitud para uso benéfico como consumo humano, animal, agroindustria, riego de cultivos y recreación. Desde el punto de vista biológico/ecológico la calidad del agua tiene una connotación un poco diferente a la requerida para usos domésticos, agrícolas e industriales (Ramírez A., 1998).

Las aguas superficiales están expuestas a una amplia gama de factores que pueden alterar su calidad biológica y ocasionar cambios simples o complejos y con diferentes niveles de intensidad. Esta alteración se puede originar en eventos naturales o en actividades antropogénicas, como el uso doméstico del agua y la consiguiente producción de aguas residuales, de la industria, minería y agricultura. Entre los criterios para evaluar la calidad biológica del agua tenemos: pH, oxígeno disuelto (OD), amoníaco (NH_4^+), cadmio, plomo y sólidos disueltos (Enderlein, E., & Williams, 1997).

E. Ecotoxicidad del agua

1. Contaminación del agua

El control de la contaminación del agua ha alcanzado gran importancia en los países desarrollados y en varios países en desarrollo, las políticas exitosas para prevenir, controlar y reducir las sustancias peligrosas, nutrientes y otros contaminantes del agua provenientes de fuentes puntuales tienen como elementos claves la prevención de la contaminación en la fuente, el principio preventivo y la concesión de licencias para descargar aguas residuales, otorgadas por las autoridades competentes. La incorporación de materias extrañas al agua como microorganismos, productos químicos, residuos industriales, aguas residuales y de otros tipos, deterioran su calidad y la hacen menos eficaz para los usos pretendidos.

Entre los principales contaminantes del agua tenemos: Orgánicos; aguas residuales, heces humanas y animales, sólidos en suspensión, compuestos de fósforo, de nitrógeno, bacterias y virus. Inorgánicos; lixiviados, actividades mineras, carreteras, filtraciones de vertederos de escombros (Fair, 1993; Enderlein, E., & Williams, 1997; Fernández Cirelli, 2003).

2. Ecotoxicología

Es una rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos de contaminantes sintéticos o naturales en los ecosistemas. Rosal y Boltes de la Universidad de Alcalá y en colaboración con Fernández-Piñas, de la Universidad Autónoma de Madrid, se dedican en particular a estudiar la toxicidad acuática, han evaluado cuatro especies de microorganismos acuáticos: una cianobacteria, una bacteria marina, un alga y un micro-crustáceo. Los investigadores trabajaron con ciertos compuestos provenientes de aguas residuales, donde demostraron que la toxicidad de un compuesto aislado no es muy significativa ambientalmente, pero en mezclas complejas con otras sustancias, aunque se encuentren en concentraciones bajas, el efecto sobre los microorganismos utilizados puede ser mucho más nocivo (Parra, 2010).

Históricamente, la utilización de métodos biológicos para la detección de sustancias nocivas o peligrosas se registra por primera vez a principios del siglo XX. En 1940 se introdujo el uso de bioensayos con peces y durante los años cincuenta se inician las pruebas con invertebrados y algas. El concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica, el cual ha sido adaptado y aplicado al diagnóstico ambiental, considerándose como un complemento a la caracterización físico-química convencional. Las pruebas de toxicidad constituyen una herramienta eficaz para la predicción de niveles de concentración de compuestos tóxicos, en los que mediante la analítica clásica no se logra obtener efectos observables, extendiéndose estas evaluaciones al ámbito de poblaciones, comunidades o ecosistemas para la identificación de elementos biológicos en riesgo (Castillo, 2004).

En la actualidad, se reconoce que la caracterización y medición de los tóxicos o componentes de los residuos peligrosos por separado no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de los residuos como posibles

transformaciones en el ambiente pueden modificar su efecto nocivo. De ahí, que el uso de ensayos biológicos esté siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de estos contaminantes (Castillo, 2004).

2.1 Ecotoxicidad aguda

Es el efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo, usualmente de pocos días. Esta toxicidad es suficientemente alta como para producir una respuesta rápida en los organismos (24 a 96 horas) y no implica necesariamente la muerte del organismo utilizado (Metcalf & Eddy, 1995).

3. Microbioensayos ecotoxicológicos

A pesar del incremento en la preocupación respecto al impacto de las descargas peligrosas hacia ambientes acuáticos y terrestres ha desencadenado acciones preventivas y correctivas, aun no se ha realizado un mapeo sobre el grado de contaminación de las aguas en muchas ciudades importantes del mundo. Las legislaciones ambientales, a la fecha, han sido utilizadas para cuantificar el grado de toxicidad de los efluentes industriales, aguas residuales y sólidos contaminantes, así como para establecer límites para su descarga y determinar en que medida son tóxicos para la biota propia del lugar (Persoone, 2003).

El medio acuático frecuentemente recibe las consecuencias de las actividades antrópicas, entre ellas la actividad industrial. En los efluentes se encuentran una serie de sustancias contaminantes, tanto orgánicas como inorgánicas que en los análisis convencionales de laboratorio posibilitan tener un primer acercamiento al posible impacto que produce un tóxico aislado o una mezcla de ellos, máxime cuando se considera una batería de bioensayos con organismos con un nicho ecológico particular, en los ambientes dulceacuículas (Castro, 2002).

Desafortunadamente, esta metodología se ve limitada por los siguientes factores: los costos y dificultades técnicas de analizar cada sustancia química individual que pueda estar presente en la muestra, y la dificultad de calcular o valorar los peligros y riesgos de la contaminación ambiental a partir de un conjunto de datos químicos.

En los bioensayos se utilizan especies experimentales selectas. Estas son representantes de comunidades biológicas de los ambientes considerados y se utilizan en la actualidad para determinar efectos tóxicos y genotóxicos (Persoone G., 2000).

Tomando en cuenta la especificidad de la toxicidad respecto de las especies y de los químicos se revela la necesidad de un enfoque con una batería de ensayos con especies de distintos niveles tróficos (productores, consumidores y descomponedores) que generalmente se acepta e implementa en la actualidad, quedando demostrado que la utilización de bioensayos es una excelente herramienta para determinar el grado de nocividad de algún producto. Permite también estimar el riesgo potencial para el ambiente de una manera mucho más aproximada que si solamente se hicieran los análisis físicos y químicos tradicionales (Persoone G., 2000; Prospero, 2007).

Entre los organismos que se utilizan o se han utilizado para efectuar bioensayos (tradicionales) se pueden mencionar, varias especies de: bacterias, algas azul-verdosas, levaduras, hongos, protistas flagelados y ciliados, algas microscópicas, plantas vasculares, celenterados, nemátodos, rotíferos, lombrices de tierra, moluscos, crustáceos, insectos, erizos de mar, peces, ranas y, mamíferos (ratones, ratas, cobayos, conejos y otros) (Kleiser, 1991).

Debe quedar claro que un balance entre análisis químicos, biológicos, toxicológicos y microbiológicos es siempre la mejor estrategia para generar la base de información más amplia sobre peligros ambientales (Persoone G., 2000).

Entre las principales características con las que debe contar un microbioensayo, se puede mencionar: que sea económico o rentable, que no requiera de trabajo intensivo, con

potencial de procesar un alto número de muestras, los cultivos de organismos deben ser fáciles de mantener o no requerir mantenimiento del todo, que utilice poco espacio dentro del laboratorio, bajo costo de consumibles (p.ej., recipientes para los bioensayos), que requiera poco volumen de muestra (Blaise, 2006).

Para procesar los resultados de los efectos observados y obtener los datos numéricos de las determinaciones de toxicidad aguda mencionadas anteriormente, existen paquetes de cálculos estadísticos para computadora (p.ej., Dunnett, Spearman-Kärber, Probit y otros) y métodos manuales de interpolación gráfica (Persoone G., 2000).

Los Toxkits son utilizados en más de 40 países alrededor del mundo, incluyendo México, Argentina, Chile, Colombia y Guatemala en América Latina. A continuación se presentan algunos detalles sobre la biología y ecología de los organismos, aspectos metodológicos de los Toxkits y las especies utilizadas (EPA, 2002).

3.1 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando la bacteria *Vibrio fischeri*

Durante los últimos quince años se ha utilizado el bioensayo de toxicidad con la bacteria denominada *Vibrio fischeri*, este bioensayo se encuentra validado y estandarizado a nivel internacional. En Guatemala se encuentra avalado por la Comisión Guatemalteca de Normas -COGUANOR- “Calidad del agua: Determinación del efecto inhibitorio de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3: Método utilizando bacterias liofilizadas” (NTG/ISO 11348-3 de fecha 05 de noviembre de 2010). Este método utiliza una cepa liofilizada de la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*), los tóxicos interfieren en el sistema enzimático de la bacteria causando una reducción en la producción de la luz. La toxicidad se determina por la concentración inhibitoria que produce una disminución de la luz de un 50% a un tiempo determinado (IC₅₀, 15 min.) (COGUANOR, 2010).

Los microbioensayos ecotoxicológicos que utilizan bacterias luminiscentes como *V. fischeri* pueden ser utilizados para analizar aguas residuales, agua entubada, agua de

lagos o ríos, efluentes industriales, productos farmacéuticos y cosméticos, pesticidas, químicos industriales orgánicos e inorgánicos, así como suelos y sedimentos. Sus usos incluyen monitoreo de calidad del agua, pruebas de suelo, estudios de impacto ambiental y evaluaciones de riesgo. También se puede utilizar para estudiar la toxicidad de una combinación de sustancias (Castro, 2002; Solano, 2005).

Los ensayos de toxicidad aguda utilizando bacterias han adquirido esta gran importancia en los últimos años, no solo por las características mencionadas anteriormente, sino también debido a la correlación existente entre los resultados obtenidos a través de estos ensayos y los bioensayos convencionales de amplia utilización. Así, para muchos compuestos y muestras, los datos de toxicidad obtenidos con este tipo de ensayos corresponden bien con las toxicidades agudas obtenidas con los ensayos de toxicidad estándar; por tanto, la toxicidad en *V. fischeri* puede aplicarse para predecir toxicidad para otros organismos acuáticos. De hecho, este ensayo ha mostrado mayor sensibilidad y correlación con los resultados obtenidos en peces y en *Daphnia*, desde 1984 es una de las pruebas recomendadas por la EPA (Environmental Protection Agency), junto con pruebas en dafnidos, en la evaluación de la toxicidad aguda de muestras de agua (Solano, 2005).

3.1.1 Aplicaciones del microbioensayo ecotoxicológico utilizando la bacteria *V. fischeri*

Se pueden mencionar las siguientes: apoyo en el monitoreo de efluentes de plantas de tratamiento de aguas, en cuanto a la actividad residual de fungicidas, desinfectantes, detergentes, ceras, etc.; Monitoreo de aguas superficiales para la identificación de fuentes de contaminación con tóxicos orgánicos e inorgánicos en los que se estime el efecto de tipo aditivo, sinérgico o de dominancia de sustancias en suspensión; Monitoreo de agua para consumo humano y detectar residuos de cloro o presencia de toxinas; Ensayos en sedimentos, para determinación de remanentes de hidrocarburos, pesticidas, antibióticos en suelos y lodos marinos; monitoreo y seguimiento de suelos contaminados en procesos de remediación, en minas, drenajes ácidos naturales; Monitoreo de biocidas en aguas industriales que pueden ser de carácter físico, químico y biológico. Entre sus ventajas

podemos mencionar que provee de una respuesta rápida, así como detección de un amplio rango de contaminantes, se puede utilizar en el laboratorio o en el campo de investigación, es preciso y exacto con alto nivel de sensibilidad. (Solano, 2005; Sarmiento, 2011).

3.2 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el alga *Selenastrum capricornutum*

El 11 de mayo de 2010 en Guatemala se aprobó la norma COGUANOR NTG/ISO 8692, denominada: Calidad del agua “Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con algas verdes unicelulares”. Esta norma especifica un método para la determinación de la inhibición del crecimiento de las algas verdes unicelulares por los efectos de las sustancias y mezclas contenidas en el agua o en el agua residual. El método es aplicable a sustancias fácilmente solubles en agua. Con este método también pueden determinarse los efectos inhibidores de materiales orgánicos e inorgánicos poco solubles, compuestos volátiles, metales pesados y aguas residuales, aplicando las modificaciones descritas en las Normas ISO 14442 e ISO 5667-16 (COGUANOR, 2010).

La determinación del efecto tóxico de muestras contaminadas en productores primarios (plantas), suele llevarse a cabo mediante un bioensayo con microalgas para medir la estimulación o inhibición del crecimiento de esas algas a las 24, 48 y 72 hr. La estimulación del crecimiento más allá del crecimiento normal en los controles, indica entonces un potencial de eutroficación de la muestra analizada, que es una forma indirecta de contaminación por los aspectos básicos de la eutroficación de aguas naturales por explosiones poblacionales de algas y sus consecuencias (Persoone, 2003).

El alga unicelular denominada *Selenastrum capricornutum*, la cual ha demostrado no ser un alga tóxica, ha sido utilizada como un control negativo (= no tóxica) en ensayos para la detección de toxinas de cianobacterias (algas verdeazules), mediante microbioensayos ecotoxicológicos (Persoone, 2003).

Entre las metodologías estándar para ensayos ecotoxicológicos con algas utilizando, entre otras, la especie en cuestión, se pueden mencionar los siguientes: En el Standard Methods Parte 8000: Toxicidad, apartado 8111: Bioestimulación (productividad de las algas), donde se establece que los ensayos de algas constará de tres fases: selección y medición de los factores o condiciones adecuadas durante el ensayo, presentación y evaluación estadística de las mediciones y la interpretación de los resultados. Establecido por diversas secciones: principios generales, la planificación y la evaluación de los ensayos de algas, equipo, manejo, inóculo, entre otros (Eaton 2005).

Método E1218-90: "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae"; donde establece que las pruebas con algas proporcionan información sobre la toxicidad que provoca cierta sustancia a la biota acuática, dichos resultados se puede utilizar para comparar toxicidades de diferentes sustancias para las algas y estudiar los efectos de diversos factores ambientales relacionados (ASTM, 2004).

Algal Growth Inhibition Test (Draft ISO Standard ISO/DIS 10253.2). La cual especifica un método para la determinación de la inhibición del crecimiento de algas verdes unicelulares por sustancias y mezclas de los contenidos en el agua o por las aguas residuales donde compuestos volátiles, metales pesados y aguas residuales pueden ensayarse (ISO, 2012).

Método 201. Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (2006). Donde se establece que el propósito de este ensayo es determinar los efectos de una sustancia sobre el crecimiento de agua dulce de microalgas, donde se exponen por un periodo de 72 horas a determinada sustancia. Esta guía se aplica a sustancias solubles en agua (OECD, 2002).

3.3 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el protozoo *Tetrahymena thermophila*

En el filo *Ciliophora* se han descrito unas 12,000 especies de ciliados, son muy comunes en comunidades bentónicas y planctónicas de aguas saladas, dulces y salobres, así como de

suelos encharcados. Ciliados como *Tetrahymena* y *Colpidium* se han utilizado como modelos de laboratorio en experimentos para evaluar los efectos de distintas sustancias químicas sobre los protistas. Son indicadores de la calidad del agua y también se han usado para depurar el agua de plantas de tratamiento de residuos (Brusca, 2005).

Como un grupo constitutivo de la cadena alimenticia, juegan un rol importante en los ecosistemas como purificadores y recicladores de la materia en los ambientes acuáticos naturales y en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Su alimentación a base de bacterias y detritos resulta en una mayor transparencia en el agua (Pelczar, 1994).

Avances recientes en la valoración de toxicidad ambiental se ha enfocado en pruebas a microescala, técnicas más rápidas e indicadores más sensibles de la calidad del agua. El potencial de evaluación de la calidad del agua en base a los ciliados ha sido reconocida desde hace un tiempo, ya que representan un nivel trófico olvidado en la mayoría de los test de toxicidad. Son más sensibles a una amplia gama de sustancias tóxicas en los ambientes naturales (Eaton, 2005).

El género *Tetrahymena* ha provocado extensos y diversos estudios, actualmente es recomendado por la Agencia Ambiental Federal Alemana para análisis de riesgo ambiental. El uso de esta metodología está siendo desarrollada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico -OCDE- (Lu, 2001).

Tetrahymena thermophila se ha utilizado en la evaluación de más de 2.000 compuestos potencialmente tóxicos para el ser humano originados por diferentes procesos industriales. Al ser un microorganismo sin pared celular en estado vegetativo, su sensibilidad frente a agentes xenobióticos es mayor que cualquier microorganismo eucariota con pared celular. El ensayo utilizando protozoos, se basa en las mediciones de densidad óptica del recambio de nutrientes por la biomasa ciliada. La inhibición del crecimiento del cultivo bajo toxicidad es apreciada como turbidez de la suspensión de nutrientes (por tanto mayor densidad óptica comparada con el control). Se determina el promedio de la inhibición de crecimiento después de 24 horas (IC_{24h}) (Gutiérrez, 2002).

3.4 Microbioensayo ecotoxicológico utilizando el Micro-crustáceo *Thamnocephalus platyurus*

Según la norma ISO 14380:2011 “Water quality: Determination of the acute toxicity to *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca)”, especifica el método para la utilización de *Thamnocephalus platyurus* después de 24 horas de exposición. Este método es aplicable a: Substancias químicas solubles o que pueden mantenerse estables en suspensión o dispersión bajo las condiciones utilizadas en el test, efluentes industriales o aguas residuales, tratadas o no tratadas (decantadas, filtradas o centrifugadas), aguas frescas, extractos acuosos y toxinas de algas verde-azules (ISO, 2011).

Thamnocephalus platyurus pertenecen a la clase *Branchiopoda*, son pequeños crustáceos y mayormente habitan en agua dulce. Se denominan branquiópodos pues tiene apéndices corporales que son “pies de branquias” actuando como órganos de intercambio gaseoso, filtros de alimento y locomoción (McLaughlin, 2005).

Thamnocephalus platyurus es una alternativa de la muy conocida *Daphnia magna* (pulga de agua) para determinar la toxicidad en muestras de agua. Según un estudio comparativo realizado por la Oregon State University Workshop en donde se ensayaron ambas metodologías, demostrando que: No se obtuvieron falsos positivos entre ambos bioensayos se requirió menor tiempo para la eclosión de los quistes de *Thamnocephalus* frente a los de *Daphnia* y se demostró que *T. platyurus* requiere menos repeticiones por ensayo para lograr los mismos resultados que *D. magna* (Törökné, 2004).

3.5 Microbioensayo utilizando el rotíferos *Brachionus calyciflorus*

El método utilizado se adhiere al método estándar de la American Society for Testing and Materials (ASTM por sus siglas en inglés) E 1440-91: “Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*”, esta guía describe el procedimiento para obtener datos de laboratorio, concernientes a la toxicidad aguda de químicos en efluentes acuosos liberado en aguas frescas, estuarias o marinas. Estos procedimientos conllevan a la

estimación de la toxicidad, incluyendo la concentración esperada para determinar la mortalidad del 50% de los rotíferos en efecto porcentual (EP₅₀) en 24 horas (ASTM, 2004).

Según el Standar Methods del 2005, indica que los rotíferos fueron seleccionados debido a la existencia de protocolos y bases de datos de las respuestas de los mismos ante tóxicos y la viabilidad de los quistes, demostrando que los quistes eclosionan sincronizadamente ocasionando con esto uniformidad en los microorganismos.

Los rotíferos son microorganismos acuáticos comunes y abundantes clasificados como consumidores. Se han descrito unas 1800 especies y se encuentran en aguas marinas, estuarios, dulces, suelos, sedimentos y musgos, la mayor parte residen en agua dulce y forman parte del zooplancton (Ruppert, 1996).

El objetivo primordial de la ecotoxicología acuática es determinar los efectos de compuestos tóxicos en organismos que juegan un rol importante en las comunidades acuáticas. Este es el caso de los rotíferos, ya que éstos se alimentan, mediante filtración de plancton y bacterias. Ejercen una presión de búsqueda de alimento, excediendo, a veces, a los microcrustáceos que conforman el zooplancton de mayor tamaño, influyendo de esta manera en la cantidad y tipo de especies de algas (microalgas) del ambiente acuático, con lo que pueden contribuir a la calidad general del agua (Ruppert, 1996; Persoone G., 2000).

Los rotíferos del género *Brachionus* son particularmente útiles para toxicología ambiental por su rápida reproducción, corto tiempo de generación, sensibilidad y disponibilidad comercial como huevos durmientes. La especie planctónica *Brachionus calyciflorus* se encuentra en hábitats lénticos en todos los continentes y es un componente ecológicamente significativo de muchos cuerpos de aguas naturales. Por lo tanto, los resultados de ensayos ecotoxicológicos pueden ser comparados con mucha relevancia ecológica (Persoone, 2003).

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las actividades humanas provocan graves presiones sobre el recurso acuático, el crecimiento poblacional y el desarrollo económico inducen el uso de recursos naturales que generan desechos sólidos, líquidos, orgánicos e inorgánicos que son arrastrados hacia las cuencas de los ríos. Tales desechos provocan cambios fisicoquímicos en las aguas de los ríos. Algunos de estos, podrían ser tóxicos para la microfauna y microflora acuática y podrían afectar toda la cadena trófica. Por tal motivo, la evaluación de la toxicidad por medio de microbioensayos es de vital importancia para comprender los efectos de la degradación de la vida acuática y como se afecta la calidad del agua (APA, 2012).

Se cree actualmente que la calidad del agua se limita únicamente a estudios físicos, químicos y microbiológicos. En la búsqueda de la reducción del impacto de los cambios climáticos y de las actividades antropogénicas, se han realizado estudios que han revelado que el uso complementario de microbioensayos es una herramienta útil para la evaluación *in situ* de la salud de las aguas. La información sobre la evaluación de la calidad del agua del río Cuilco utilizando microbioensayos es muy escasa, sino inexistente. Por esta razón, este estudio ayudará a generar información, innovar conocimiento, direccionar esfuerzos para contribuir a la generación de recomendaciones para disminuir o controlar la contaminación y vigilar las actividades antropogénicas involucradas en el área de estudio.

La ecotoxicología, a pesar que es una disciplina relativamente moderna, ha adquirido una gran importancia en los últimos años, ayudando a la evaluación del impacto causado sobre la dinámica de las poblaciones en un ecosistema determinado que se encuentra expuesta a una serie de contaminantes de una manera pasiva y sin conocimiento sobre el riesgo. El pueblo de San Miguel Ixtahuacán, San Marcos, principalmente las comunidades aledañas a la parte alta de la cuenca del río Cuilco, necesitan conocer el estado actual de la ecotoxicidad de la salud de las aguas en los cinco puntos de interés establecidos, para evaluar el impacto de las actividades antropogénicas, tanto en la actualidad como en el futuro y de esta forma proteger y participar activamente en la conservación de tan valioso recurso.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Evaluar el estado actual de la ecotoxicidad aguda de las aguas del río Cuilco ubicado en San Miguel Ixtahuacán, San Marcos, en cinco puntos de interés establecidos a lo largo de 14 Km de recorrido, entre época lluviosa y seca, utilizando cinco bioensayos.

B. ESPECÍFICOS

1. Determinar si existe diferencia en la ecotoxicidad aguda entre los cinco puntos de interés determinados en el recorrido establecido a lo largo del río Cuilco.
2. Establecer si existe diferencia en los resultados de ecotoxicidad aguda entre muestreos de la parte alta de la cuenca del río Cuilco en los cinco puntos establecidos en épocas lluviosa y seca.
3. Establecer el punto con mayor ecotoxicidad aguda de los cinco puntos establecidos en la parte alta de la cuenca del río Cuilco evaluados con los bioensayos utilizados.

VI. HIPOTESIS

La ecotoxicidad evaluada a través de cinco bioensayos, no representa diferencia significativa en cinco puntos del río Cuilco en época seca y lluviosa.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO

La parte alta de la cuenca del río Cuilco vertiente del Golfo de México, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos.

B. MUESTRA

Se realizó un total de 6 muestreos en los cinco puntos delimitados a conveniencia (tabla No.1) tomando una muestra por punto. Tres muestreos se realizaron en época seca y tres en época lluviosa, tomando 1 litro de agua superficial en cada ocasión.

Tabla No. 1 Puntos de muestreo en la parte alta del río Cuilco (Mapa, anexo 1).

ID Estación	NORTE	ESTE	ALTURA GPS
RC 1	1684801.9	647805.7	1669.4
RC 2	1686458.8	643864.8	1621.3
RC 3	1687494.3	643073.9	1607.6
RC 4	1688460.9	642620.5	1592.9
RC 5	1688822.6	655512.9	1588.6

Fuente: Sistema WGS 1984 UTM Zona 15 Norte, World View 2, Digital Globe.

C. TIPO DE ESTUDIO

Experimental de corte transversal de dos puntos.

D. RECURSO HUMANO

1. Investigadores

- Br. Andrés Josué García Brennen
- Br. María Alejandra Sandoval Laparra

2. Asesora

- Dra. Karin Herrera

3. Grupo de Apoyo

- Ing. José Carlos Quezada
- Tec. Amílcar Bámaca

E. MATERIALES

1. Equipo de campo

- Antena receptora GPS PathfinderProXT Receiver
- Lector de datos TrimbleRecon
- Equipo multiparámetro TROLL 9500, InSitu Inc.
- Recipientes QualityAssurance certificados Trace Clean de 1lt. de capacidad
- Boletas de campo
- Hielera
- Ice packs
- Guantes
- Marcadores
- Baterías alcalinas

2. Equipo de laboratorio

- Microscopio
- Estereoscopio
- Microtox® 500 Analyzer, Beckman Instruments, Inc.
- Espectrofómetro UV-VIS HACH DR 5000
- Aireador BubblerInSitu Inc.

- Bomba de vacío
- Sistema de filtración Whatman
- Filtros Whatman de microfibras de 0.45 μm
- Agitador tipo vortex de laboratorio 100 - 3000 rpm, ThermoScientific
- Refrigeradora General Electric doble puerta 8 pie
- Incubadora bacteriológica con luz y control digital de temperatura
- Mini-Incubadora de Merck Cultura M
- Incubadora para algas con luz inferior
- Centrífuga ThermoScientific
- Balones aforados de 25, 100 y 1000ml de capacidad
- Beakers de 50, 100 y 250ml de capacidad
- Kitazato
- Pipeta de 1ml
- Pipeta de 10ml
- Pipeta 100 μl
- Pipetas plásticas
- Jeringas de 100 μl
- Pissetas
- Puntas plásticas azules, blancas y amarillas
- Gradillas
- Pinzas
- Frascos ámbar 1lt de capacidad
- Embudo de plástico
- Guantes
- Marcadores indelebles
- Computadora
- Baterías alcalinas
- Mayordomo
- Jabón de manos

3. Reactivos

- Agua destilada
- Cloro
- Dicromato de potasio
- Alcohol al 70%
- Toxkits: MICROTOX®, ALGATOXKIT F™, PROTOXKIT F™, ROTOXKIT F™, THAMNOTOXKIT F™

4. Software

- Arcmap ver. 9.3.0, ESRI
- Imágenes satelitales World View 2, Digital Globe
- Microtox Omni™ Basic Test ver. 3.0
- Microsoft Office 2010
- Epidat 4
- Statgraphics Centurion XV ES 2.06

F. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Estudio de diseño experimental de corte transversal de dos puntos ya que se realizó una determinación en época seca y otra en época lluviosa, se recolectó una muestra por cada punto de muestreo, por mes.

El análisis estadístico se realizó con dos valoraciones, la primera, se utilizó un diseño de Cuadrado Latino, a través de un análisis de varianza (ANOVA) para valorar la diferencia entre la época seca y la época lluviosa, analizando el comportamiento de los diferentes biotest. La segunda, se hace con la clasificación de niveles de la ecotoxicidad que define Persoone, G. et al, que va de la Clase I a la clase V, de menor a mayor riesgo de nivel de toxicidad.

Se utilizó para el análisis el Cuadrado Latino (anexo 4), ya que nos permite agrupar datos y reducir el error experimental al introducir el doble bloqueo (factores y réplicas) y proporciona una comparación más precisa entre los factores: porcentaje de inhibición (*Vibrio fischeri*, *Selenastrum capricornotum* y *Tetrahymena thermophila*) y el porcentaje de efecto (*Thamnocephalus platyurus* y *Brachorius calyciflorus*), llevándose a cabo tres réplicas en época seca (mes 1 = marzo, mes 2 = abril y mes 6 = agosto) y tres réplicas en época lluviosa (mes 3 = mayo, mes 4 = junio y mes 5 = julio), en cada uno de los cinco puntos seleccionados para el muestreo, una vez por mes.

Como control para cada biotest realizado, se utilizó hipoclorito de sodio al 5% v/v para *Vibrio fischeri* (Microtox®) y Standard Fresh Water para los demás biotest (ver anexo 2), el control fue tratado como todas las demás muestras que se analizaron, validando los resultados de cada una de las corridas realizadas.

Se compararon los puntos de muestreo con los bioensayos utilizados como una batería, en donde el único objetivo es la observación del comportamiento en conjunto y no como una unidad, pues un solo resultado de un bioensayo, no daría un panorama global de los puntos de interés que se analizaron en el estudio, al igual que los muestreos comparados con los biotest, observando la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados entre cada uno de los muestreos y las épocas seca y lluviosa, que marcaron los indicadores de cambios en la ecotoxicidad de las muestras de agua analizadas. Ambas asociaciones se llevaron a cabo con el único interés de sustentar teóricamente la congruencia de los datos obtenidos.

1. Muestreo

Se seleccionaron los puntos de muestreo en una gira de reconocimiento a la cuenca del río Cuilco en la parte alta, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos, en la cual se delimitaron cinco puntos en base a fuentes de contaminación y afluentes (ver mapa, anexo 1).

Se realizaron seis muestreos por conveniencia, tres muestreos en época seca (marzo, abril, agosto) y tres en época lluviosa (mayo, junio y julio).

En los puntos seleccionados para el muestreo se realizaron procedimientos internacionalmente aceptados para la toma de muestra. Se recolectó 1L de agua en recipientes QualityAssurance con certificación Trace Clean, libres de cualquier tipo de contaminante. En cada punto se midieron los parámetros *in situ* principales: pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad.

El recipiente que fue utilizado para el muestreo permaneció cerrado, hasta el momento de analizar la muestra y se dejó un espacio de aire para facilitar la agitación de la misma, la cual permaneció en refrigeración.

2. Análisis de muestras

Todas las muestras se filtraron previo al análisis de la batería de microbiotest con un filtro Whatman de microfibra de 0.45 µm con el propósito de eliminar partículas y biota que pudieran interferir en los resultados. A cada muestra se le realizó un ensayo de toxicidad aguda, cuyo resultado se evaluó con los porcentajes de efecto (EP) los cuales le asignaron un puntaje para clasificarlas por su jerarquía de toxicidad (Sistema de clasificación, anexo 3).

Las muestras se analizaron con cinco toxkits diferentes:

- a) Microtox®
- b) Algaltokit F™
- c) Protoxkit F™
- d) Thamnotoxkit F™
- e) Rotoxkit F™

G. METODOLOGÍA

1. Toxkit utilizando *Vibrio fischeri*

El Toxkit contiene todos los materiales, incluye a la bacteria de la especie *Vibrio fischeri*, inmovilizada.

1.1 Procedimiento (Microtox® anexo 2)

- a) Se enciende el equipo.
- b) Se espera a que estabilice la temperatura a 2°C, proceso que lleva aproximadamente 5 minutos.
- c) Se prepara la bacteria.
- d) Se sirven las muestras de acuerdo al procedimiento indicado por el software (MicrotoxOmni™ Basic Test ver. 3.0).
 - i. Se usa el software MicrotoxOmni™ Basic Test ver. 3.0
 - ii. Se designa un nombre y número a las muestras en una carpeta que automáticamente se abre al iniciar el software.
 - iii. Se coloca en el equipo las cubetas de reacción y las cubetas de incubación, de tal manera que se tengan parejas de cubetas.
 - iv. Se esperan 10 minutos y después se agregan solamente en la primer cubeta 1000 µl de la solución “diluent” que será utilizada como control.
 - v. En el resto de las cubetas de reacción se colocan 1000 µl de muestra y 20 µl de solución denominada “isotonic”.
 - vi. Se incuban por 5 minutos y después se agrega a las cubetas de incubación 20 µl del stock de *Vibrio fischeri*, y realizar la primera lectura.
 - vii. Se agregan 900 µl de la solución que se encuentra en la cubeta de reacción a la cubeta de incubación y se esperan 15 minutos para realizar la segunda lectura, obteniendo los resultados finales.
- e) Posteriormente, el software generará una gráfica con datos obtenidos de las mismas y se puede exportar en formato Excel, Word o PDF. Dichos resultados se

analizarán con el EP para clasificar el grado de toxicidad de las muestras. Se observa si hubo una inhibición o aumento en la producción de luz (Eaton, 2005; ISO 11348-3, 2007).

2. Toxkit utilizando *Selenastrum capricornotum*

El Toxkit contiene todos los materiales, incluye el alga unicelular de la especie *Selenastrum capricornotum*, inmovilizada.

2.1 Procedimiento (Algaltokit FTM anexo 2)

a) Preparación del medio alga.

- i. Se transfieren 800 ml de agua destilada en un balón aforado de 1000 ml de capacidad.
- ii. Posteriormente se agregan 10 ml de los viales etiquetados como “Nutrient Stock A” y 1 ml de los viales etiquetados como “Nutrient Stock B, C y D”, se afora a un litro y ya está listo para su uso.

b) Preparación de la microalga *Selenastrum capricornotum*.

- i. Se toma un tubo de la refrigeradora con la cepa de *Selenastrum capricornotum*.
- ii. Se descarta el medio de preservación en el que vienen embebidas.
- iii. Se agregan 5 ml del “Matrix Dissolving Medium”.
- iv. Se agita con vortex y se centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm.
- v. Se descarta el sobrenadante.
- vi. Se centrifuga nuevamente con 10 ml de agua destilada por 10 minutos a 3000 rpm.
- vii. Se descarta el sobrenadante.
- viii. Se agregan 10 ml de medio alga.
- ix. Se agita por 1 minuto aproximadamente o hasta que se disuelvan completamente.

- x. Con esta suspensión de algas se prepara el inóculo de algas, a través de la medición de la densidad óptica (OD) de la misma a 670 nm de longitud de onda, se realizan cálculos pertinentes para lograr una concentración de 1×10^6 células/ml.
- c) Se prepara el control y las muestras (tres repeticiones de cada uno), agregando a las celdas de contención 25 ml de muestra + 2 ml de medio alga + 1 ml de inóculo de algas.
- d) Se efectúa la primera lectura (t_0).
- e) Se incuban las celdas de 21-25°C con luz inferior a 3000-4000 lux, se realiza una segunda lectura a las 24 hrs, otra a las 48 hrs y la última a las 72 hrs.
- f) Se evalúa el EP para clasificar la toxicidad (anexo 3) validándose el resultado y obteniéndose la toxicidad correspondiente (Eaton, 2005; ISO 8692, 2012).

3. Toxkit utilizando *Tetrahymena thermophila*

El Toxkit contiene todo lo necesario para llevar a cabo el ensayo. Incluye el ciliado *Tetrahymena thermophila*.

3.1 Procedimiento (Protoxkit F™ anexo 2)

- a) Preparación del inóculo de ciliados.
 - i. Se toma el vial con el ciliado, se homogeniza su contenido y se transfieren 50 µl de esta suspensión a una celdilla de 1.5 ml.
 - ii. Se agrega 1 ml de agua destilada.
 - iii. Se mide la OD a 440 nm y se realizan los cálculos necesarios para llegar a una concentración de 0.040 de absorbancia (o lo más cercana a ésta).
- b) Preparar la suspensión de *E. coli* (alimento del ciliado).
 - i. Se toma del congelador un vial con bacterias liofilizadas y un vial de medio de reconstitución.
 - ii. Se atemperan los viales.
 - iii. Se reconstituyen las bacterias liofilizadas con 1 ml del medio de reconstitución y se homogenizan.

- c) Preparación del control y muestras.
- i. Se agregan 2 ml de agua destilada a las celdas control y 2 ml de muestra a las demás celdas.
 - ii. Se transfieren 40 μ l de bacterias a las celdas y se homogenizan constantemente para evitar la sedimentación de las mismas.
- d) Se miden a 440nm las celdas T=0 y luego se incuban a 30°C por 24 horas.
- e) Se miden a 440nm las celdas T=24 y se reportan los resultados.
- f) Para que la prueba sea válida la OD debe disminuir en un 60% como mínimo. Los resultados obtenidos se analizarán con el EP para clasificar la toxicidad correspondiente al método (anexo 3) (Eaton, 2005).

4. Toxkit utilizando *Thamnocephalus platyurus*

El Toxkit contiene los materiales necesarios para realizar las pruebas de toxicidad con los quistes del microcrustáceo *Thamnocephalus platyurus*.

4.1 Procedimiento (Thamnotoxkit FTM anexo 2)

- a) Preparación del “Standard Freshwater”.
- i. Se agregan 800 ml de agua destilada dentro de un balón aforado de 1000 ml de capacidad.
 - ii. Se agregan un vial de la solución etiquetada como “número 1” (NaHCO₃), dos viales de las soluciones “número 2” (CaSO₄), un vial “número 3” (MgSO₄) y un vial “número 4” (KCl).
 - iii. Se afora a la marca de 1000 ml con agua destilada.
 - iv. Se homogeniza y se airea aproximadamente por 15 minutos.
- b) Eclosión de quistes de *Thamnocephalus platyurus*
- i. Se realiza una dilución 1:8 de “Standard Freshwater” con agua destilada.
 - ii. Se prehidratan los quistes con la adición de 1 ml de la dilución de “Standard Freshwater” al vial con los quistes, se agita en intervalos regulares durante 30 minutos.

- iii. Se sirven 10 ml de “Standard Freshwater” diluida en una caja de petry transferir los quistes, se incuban a 25°C por 20-22 hrs con iluminación de 3000-4000 lux.
- c) Se sirve 1 ml de “Standard Freshwater” diluida a los pozos control y 1 ml de cada muestra a los demás pozos, hasta completar 4 repeticiones de cada uno.
- d) Se transfiere con una pipeta de plástico desechable 10 larvas recién eclosionadas a cada pozo con la ayuda de un estereoscopio, con cuidado de utilizar una pipeta diferente cuando se cambia de muestra.
- e) Terminado este proceso se cubre la placa multipozo con papel Parafilm™ y se incuba a 25°C en oscuridad por 24 hrs.
- f) Se realiza la determinación de la mortalidad en base al conteo de vivos/muertos para analizar los resultados con el EP y se clasifica la toxicidad de las muestras del test (ISO 14380, 2011).

5. Toxkit utilizando *Brachionus calyciflorus*

El Toxkit contiene todo lo necesario para realizar los test de toxicidad, se utiliza el rotífero *Brachionus calyciflorus* en forma de quistes.

5.1 Procedimiento (Rotokit F™ anexo 2)

- a) Preparación del “Standard Freshwater”.
 - i. Se agregan 800 ml de agua destilada dentro de un balón aforado de 1000 ml de capacidad.
 - ii. Se agregan un vial de la solución etiquetada como “número 1” (NaHCO₃), dos viales de las soluciones “número 2” (CaSO₄), un vial “número 3” (MgSO₄) y un vial “número 4” (KCl).
 - iii. Se afora a la marca de 1000 ml con agua destilada.
 - iv. Se homogeniza y se airea aproximadamente por 15 minutos.
- b) Eclosión de quistes de *Brachionus calyciflorus*.

- i. Se sirven 10 ml de “Standard Freshwater” sin diluir en una caja de petri y se transfieren los quistes y se incuban a 25°C por 20-22 hrs con iluminación de 3000-4000 lux.
- c) Se sirven 300 µl de “Standard Freshwater” sin diluir a los pozos control y 300 µl de cada muestra a los demás pozos, hasta completar 6 repeticiones de cada muestra.
- g) Se transfiere con pipeta de plástico desechable 5 rotíferos eclosionados a cada pozo con la ayuda de un estereoscopio, con cuidado de utilizar una pipeta diferente cuando se cambia de muestra.
- h) Terminado este proceso se cubre la placa multipozo con papel Parafilm™ y se incuba a 25°C en oscuridad por 24 hrs.
- i) Se realiza la determinación de la mortalidad en base al conteo de vivos/muertos para analizar los resultados en base al EP y se determina la clasificación de toxicidad de las muestra (ISO 20666, 2008).

H. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados generales se presentan en una tabla donde se indican los valores del porcentaje de inhibición, porcentaje de efecto y la clasificación toxicológica respectiva de cada una de las muestras procesadas en los seis meses de muestreo. Las gráficas presentadas señalan las comparaciones entre las clasificaciones de toxicidad que se obtuvieron en el estudio y cada uno de los biotest en épocas seca y lluviosa, así mismo los puntos de muestreo y los muestreos que se realizaron. El Cuadrado Latino es el diseño y el análisis estadístico es ANOVA de doble entrada, con un nivel de significancia de 0.01 (anexo 4).

Los resultados presentados se realizaron en el programa Microsoft Excel 2010, el análisis estadístico ANOVA se ejecutó en el programa Epidat 4 con la aplicación de Statgraphics Centurion XV ES 2.06.

Para determinar la clasificación de la toxicidad entre los puntos de muestreo analizados en este estudio, se utilizó el sistema de clasificación diseñado por Persoone, G. *et al.* (anexo 3) en donde se categorizó dicha toxicidad como Clase I, II, III, IV o V, en base a los

porcentajes de efecto y de inhibición. Así mismo, se compararon los resultados de cada punto de muestreo para determinar el punto que presentó mayor ecotoxicidad aguda de la parte alta de la cuenca del río Cuilco.

1. Sistema de clasificación de toxicidad aplicado una batería de microbiotest (anexo 3)

En un estudio realizado por Persoone, G. et al., este sistema de clasificación está diseñado para aplicarse en muestras no diluidas como las que se utilizaron en esta investigación.

Clase I. No tóxico: no existe ningún nivel de toxicidad en los toxkits analizados.

Clase II. Levemente tóxico: solamente un toxkit manifiesta un porcentaje de efecto del 50 % lo cual representa que solo el 20% está en un nivel de riesgo.

Clase III. Nivel bajo de riesgo toxico: cuando más de un toxkit reporta un EP del 50% pero no llega a representar el 100% de un nivel de riesgo.

Clase IV. Nivel alto de riesgo toxico: cuando en un toxkit el EP es del 100 %.

Clase V. Nivel muy alto de riesgo toxico: cuando el EP es del 100% en todos los toxkit que se utilizan (Persoone, 2003).

VIII. RESULTADOS

Para determinar si existe diferencia en la ecotoxicidad aguda de la parte alta del río Cuilco entre los cinco puntos de interés establecidos, se observan los datos de la batería de biotests obtenidos a lo largo del estudio (tabla 2), en negrillas se resaltan los datos de mayor relevancia para la clasificación toxicológica para determinado punto, estableciendo que el segundo muestreo fue el que presentó menor ecotoxicidad (los cinco puntos presentaron toxicidad clase I) y el quinto muestreo, establecido como el más tóxico, debido a que tres de los cinco puntos tuvieron una toxicidad de clase III.

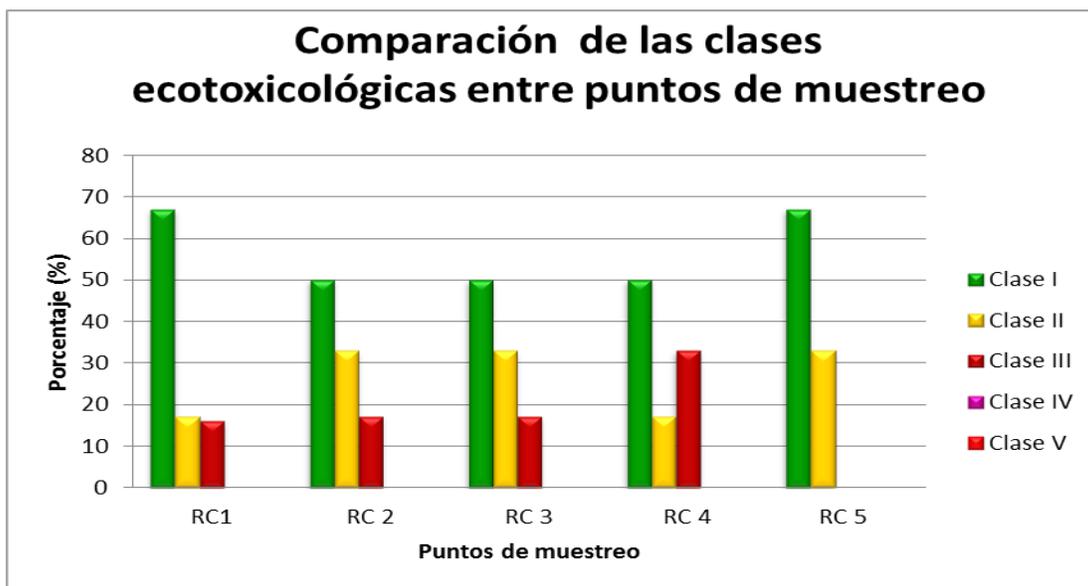
Tabla 2. Resultados de la batería de los cinco microbioensayos utilizados y su respectiva clasificación basados en la clasificación de Persoone, G. *et al.*

Mes	Punto de muestreo	% Inhibición			% de efecto (EP)		Clasificación Toxicológica
		<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Selenastrum capricornotum</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Brachorius calyciflorus</i>	
1	RC 1	-75.33	-26.11	-0.88	5	3.3	CLASE I
	RC 2	-75.64	-25.32	-7.56	0	20.0	CLASE I
	RC 3	-76.46	50.68	-7.40	17.5	6.7	CLASE II
	RC 4	-81.24	-29.08	-7.17	12.5	10.0	CLASE I
	RC 5	-81.21	-5.21	-3.03	5	10.0	CLASE I
	CONTROL	89.69	0	0	0	3.3	
2	RC 1	-88.69	-12.61	-24.46	0	16.7	CLASE I
	RC 2	-85.43	1.56	-26.70	5	20.0	CLASE I
	RC 3	-80.19	14.04	-31.25	2.5	23.3	CLASE I
	RC 4	-76.5	4.34	-27.52	0	13.3	CLASE I
	RC 5	-70.85	-11.52	-9.47	0	30.0	CLASE I
	CONTROL	50.64	0	0	0	3.3	
3	RC 1	-46.1	56.45	53.19	0	33.3	CLASE III
	RC 2	-51.3	62.58	33.46	0	23.3	CLASE II
	RC 3	-64.59	65.72	47.27	0	20.0	CLASE III
	RC 4	-62.75	61.21	59.10	2.5	40.0	CLASE II
	RC 5	-57.85	46.08	53.34	2.5	40.0	CLASE II
	CONTROL	60.07	0	0	10	0.0	
4	RC 1	-75.26	26.17	17.57	7.5	16.7	CLASE I
	RC 2	-89.46	18.28	52.80	5	20.0	CLASE II
	RC 3	-82.81	19.68	31.31	2.5	6.7	CLASE I
	RC 4	-86.77	20.49	36.30	0	20.0	CLASE I
	RC 5	-89.39	13.17	33.15	7.5	16.7	CLASE I
	CONTROL	85.11	0	0	0	6.7	
5	RC 1	-60.28	37.76	50.38	5	43.3	CLASE II
	RC 2	-42.67	52.75	69.00	17.5	46.7	CLASE III
	RC 3	-75.56	28.60	58.89	5	50.0	CLASE III
	RC 4	-47.05	38.35	69.25	7.5	50.0	CLASE III
	RC 5	-54.59	28.11	66.05	5	46.7	CLASE II
	CONTROL	95.5	0	0	5	13.3	
6	RC 1	-48.63	17.81	43.56	7.5	20.0	CLASE I
	RC 2	-70.59	17.99	31.95	12.5	43.3	CLASE I
	RC 3	-66.07	12.48	19.65	10	33.3	CLASE I
	RC 4	-75.21	21.37	29.24	17.5	50.0	CLASE II
	RC 5	-84.47	9.19	42.30	12.5	20.0	CLASE I
	CONTROL	86.31	0	0	5	16.7	

Puntos de muestreo: RC 1 = Río Cuilco 1, RC 2 = Río Cuilco 2, RC 3 = Río Cuilco, RC 4 = Río Cuilco 4, RC 5 = Río Cuilco 5.

Fuente: Datos experimentales.

Gráfica 1. Comparación de las clases ecotoxicológicas entre puntos de muestreo.

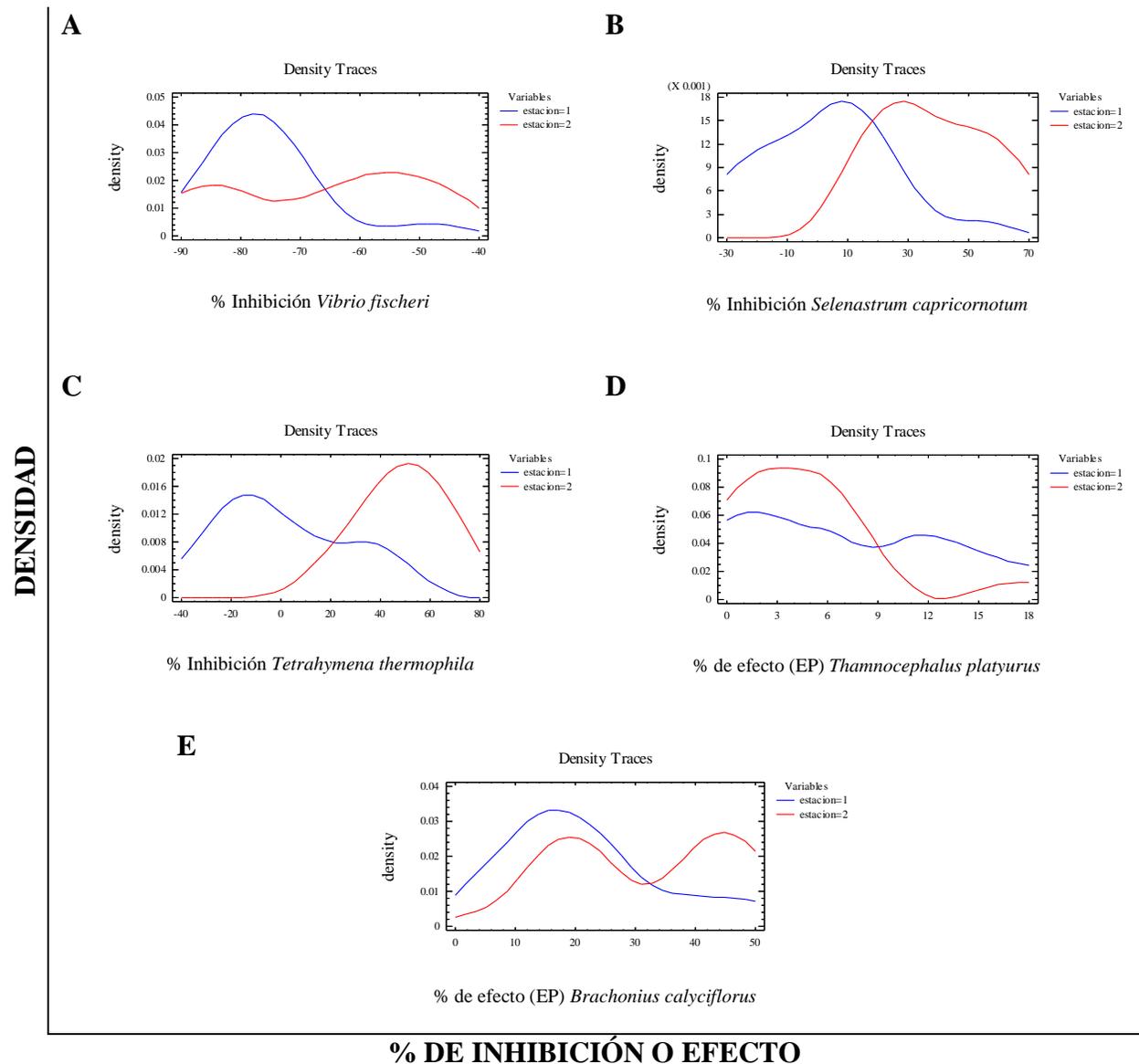


Puntos de muestreo: RC 1 = Río Cuilco 1, RC 2 = Río Cuilco 2, RC 3 = Río Cuilco, RC 4 = Río Cuilco 4, RC 5 = Río Cuilco 5.

Fuente: Datos experimentales.

En la gráfica 1, se observa que el punto RC 4 presenta el 33% de ecotoxicidad clase III (nivel bajo de riesgo tóxico, anexo 3), estableciendo este punto con el mayor riesgo ecotoxicológico de los cinco puntos evaluados.

Gráfica 2. Comparación de biotests y su comportamiento en diferente estación

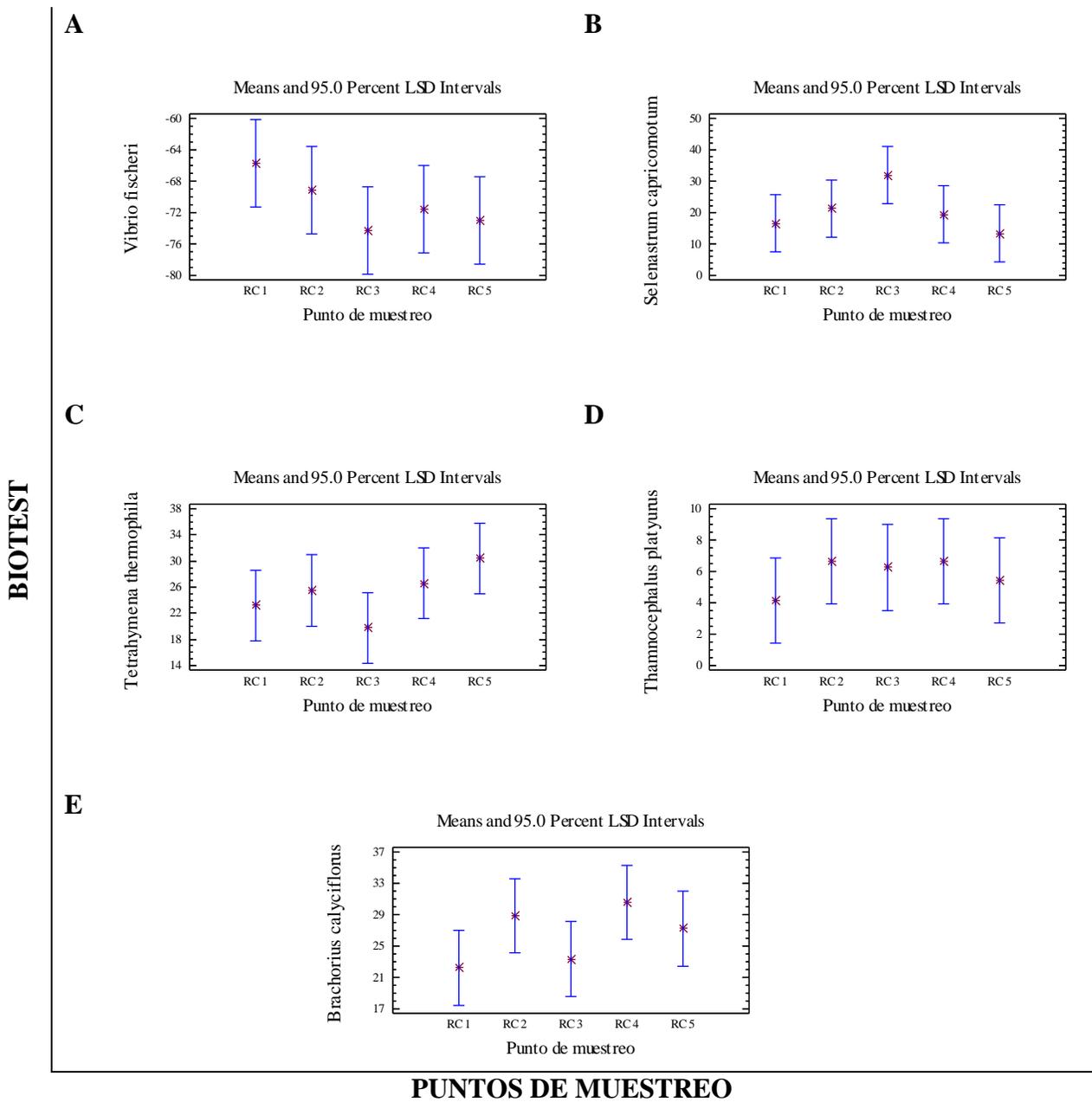


Estación 1 = época seca, Estación 2 = época lluviosa.

Fuente: Datos experimentales.

Gráfica 2A, 2D y 2E, se observa que no existe diferencia en el comportamiento de dichos biotest, ya que no se ven afectados por la época seca o lluviosa ($p=0.105739$, $p=0.29056$ y $p=0.0722065$, respectivamente). **Gráfica 2B y 2C**, se presenta el cambio en el comportamiento del biotest empleado en cuanto al porcentaje de inhibición y su relación con la época seca o lluviosa ($p=0.0000813747$ y $p=0.000480879$, respectivamente), en donde *Tetrahymena thermophila* (2C) es más sensible frente a los cambios de época. Ver anexo 4 tablas ANOVA doble entrada.

Gráfica 3. Comparación entre puntos de muestreo en el Río Cuilco y los bioensayos utilizados.

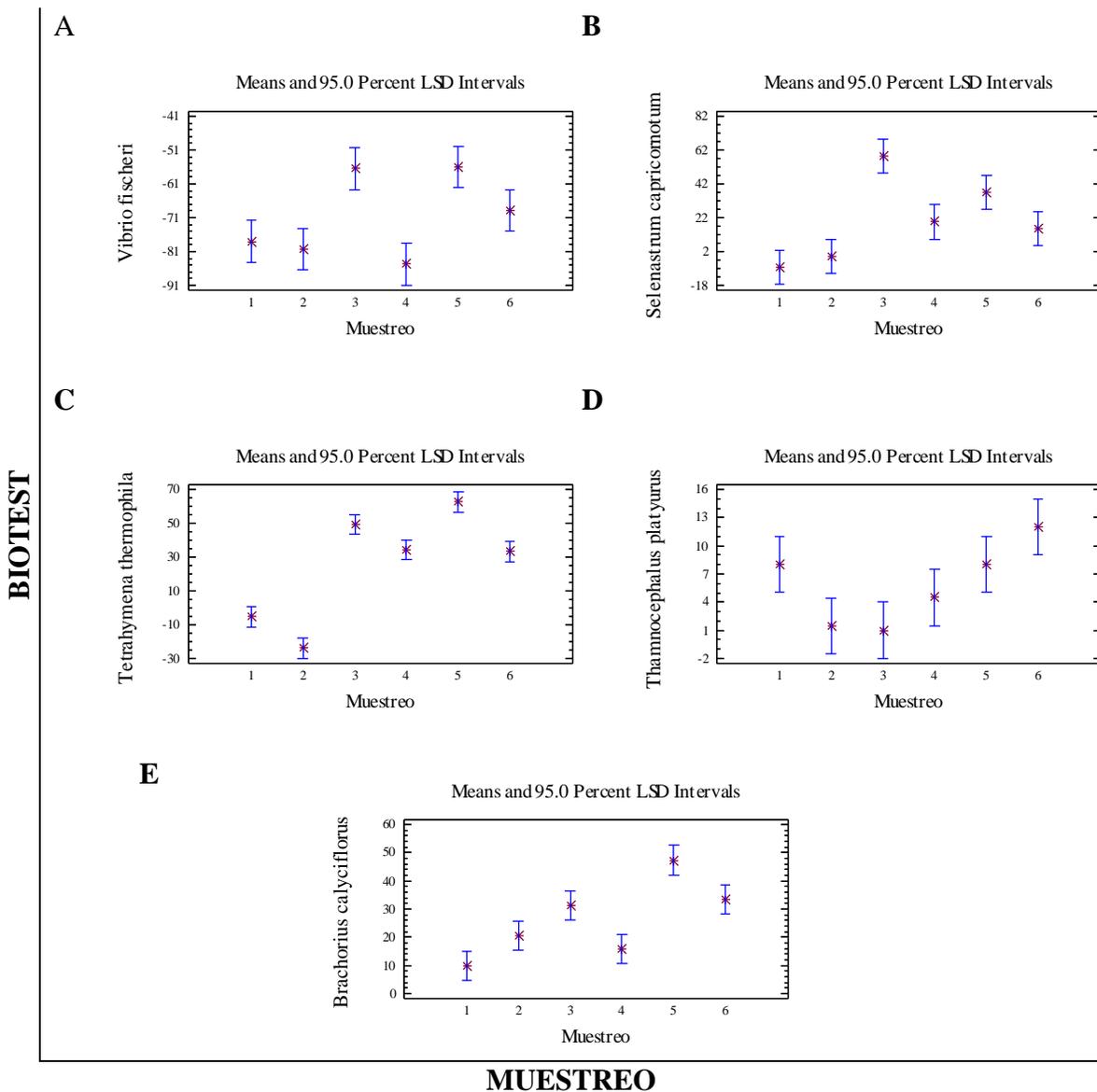


Puntos de muestreo: RC 1 = Río Cuilco 1, RC 2 = Río Cuilco 2, RC 3 = Río Cuilco, RC 4 = Río Cuilco 4, RC 5 = Río Cuilco 5.

Fuente: datos experimentales.

Las gráficas **3A** ($p=0.5319$), **3B** ($p=0.3117$), **3C** ($p=0.3590$), **3D** ($p=0.8532$) y **3E** ($p=0.3304$) no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los puntos de muestreo y los biotest utilizados. Ver anexo 4 tablas ANOVA doble entrada.

Gráfica 4. Comparación entre muestreos realizados y los biotest utilizados.



Muestreos: 1, 2 y 6 = Época seca; 3, 4 y 5 = Época lluviosa.
Fuente: datos experimentales

Gráfica 4A, se observa que existe diferencia significativa para *V. fischeri* ($p=0.0001$) donde el muestreo 4 con el 3 y 5 quienes marcan la mayor diferencia. **Gráfica 4B**, existe diferencia significativa para *S. capricornotum* ($p=0.0000$) se observa que el muestreo 1 con el 3 marcan la mayor diferencia. **Gráfica 4C**, existe diferencia significativa para *T. thermophila* ($p=0.0000$) donde el muestreo 2 con el 5 marcan la mayor diferencia. **Gráfica 4D**, existe diferencia significativa para *T. platyurus* ($p=0.0067$) donde el muestreo 3 con

el 6 marcan la mayor diferencia. **Gráfica 4E**, existe diferencia significativa para *B. calyciflorus* ($p=0.0000$) donde el muestreo 1 con el 5 marcan la mayor diferencia. Ver anexo 4 tablas ANOVA doble entrada.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Hace unos 30 años se consideraba a la contaminación ambiental un proceso inevitable e irreversible del desarrollo de una comunidad. Con el avance de la ciencia y tecnología se ha demostrado que los efectos de la contaminación influyen notablemente en la salud humana así como en el ecosistema, sin embargo gracias al progreso de la investigación se han desarrollado diversos métodos para el monitoreo de la evolución, mejoramiento y tratamiento de estos efectos. Actualmente, el uso de diversos biotest utilizando una gama de microorganismos como: bacterias, algas, microcrustáceos, rotíferos y protozoos tienen aplicación ecológica, una metodología de muy reciente aparición en Guatemala, y su uso se ha destinado a la evaluación de ríos, lagos, suelos, aire, entre otros nichos ecológicos aledaños a ciudades, industrias y cultivos.

Los estudios limnológicos del río Cuilco son escasos y las metodologías utilizadas son muy nuevas en Guatemala, por lo que no hay una línea base para extrapolar los resultados de este estudio.

En la tabla No. 2, se indica la clasificación del grado de la toxicidad aguda, la cual reveló que los muestreos 3 y 5 son los que presentan mayor grado de toxicidad en nivel II y III para ambos casos (época seca muestreos 1, 2 y 6; época lluviosa muestreos 3, 4 y 5), por lo que el inicio y final del invierno representaron mayores cambios para ese ecosistema, permitiendo deducir que el cambio de la temperatura de las aguas y del ambiente tienen alguna influencia sobre la toxicidad del agua, así como el cambio de los sólidos disueltos en el agua debido al arrastre de diferentes partículas y contaminantes, el aumento del caudal de los ríos y diversos cambios químicos, por lo que no es de sorprenderse que esta sea la época que presente mayor nivel de ecotoxicidad aguda (Albert, 2008; Persoone, 2003).

En la gráfica 1, se observa que el punto RC4 es el que presentó el mayor grado de ecotoxicidad aguda, con el 33% de sus resultados clasificados con un nivel de toxicidad clase III (barra color rojo), el 17% clase II (barra color amarillo) y el 50% no presentó

toxicidad (barra color verde), el resultado de este punto de muestreo está sujeto a la influencia de la actividad agrícola, actividad industrial de la mina Marlin y demás actividades antropológicas, ya que este punto es aledaño a la comunidad de Siete Platos y vertiente del río Quivichil de San Miguel Ixtahuacán, entre otros factores que se tendrían que evaluar de forma individual para determinar el grado de impacto ecotoxicológico.

Por otra parte, según la gráfica 1, el punto RC5 es el que presentó menor grado de ecotoxicidad con el 67% clase I (barra color verde) y el 33% de clase II (barra color amarilla), apreciando con esto que la corriente del río es capaz de llevar a cabo procesos de autopurificación natural, ya que los contaminantes no llegan a niveles críticos como para impedir dicho proceso biológico (Albert, 2008).

La diferencia ecotoxicológica aguda en los cinco puntos de muestreo en la época lluviosa y seca, utilizando los cinco bioensayos, es apreciada en las gráficas 2 a 4, de donde se realizó el análisis ANOVA para determinar las diferencias estadísticamente significativas.

La gráfica 2A reveló que no hay diferencia significativa ($P=0.105739$) del bioensayo que utiliza la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri* entre época seca y lluviosa, con base a dicho resultado se puede inferir que los cambios en el estado de las aguas no fueron drásticos como para afectar a las bacterias propias del lugar, así como para estimular la sobreproducción (hormesis) o disminuirla de manera drástica (COGUANOR, 2010; Persoone, 2003).

Existe diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0000813747$), del ensayo con *Selenastrum capricornotum* (gráfica 2B), comprobando que esta alga se comporta de diferente manera en época seca y en época lluviosa, dichos resultados podrían indicar que las aguas del río Cuilco en época lluviosa arrastran diferentes contaminantes orgánicos e inorgánicos producto de la agricultura, ganadería y demás actividades antropológicas que influyen en la proliferación de microorganismos (COGUANOR, 2010; Persoone, 2003).

Los ensayos realizados por la técnica de espectrofotometría con el protozoo *Tetrahymena thermophila* (gráfica 2C), indicaron que existe una diferencia estadística significativa ($P = 0.0000480879$) entre épocas lluviosa y seca, lo que establece que el aumento de sólidos en suspensión, la disminución de oxígeno disuelto y los nutrientes disponibles disminuyen la capacidad de alimentación y reproducción de los protozoos (Gutiérrez 2002; Persoone, 2003).

Para los casos de *Thamnocephalus platyurus* y *Brachorius calyciflorus* son metodologías basadas en el porcentaje de efecto (mortalidad) de las aguas directamente sobre dichos microorganismos (gráficas 2E y 2D), donde no se observa una diferencia estadísticamente significativa para dichos biotest ($P = 0.29056$ y $P = 0.0722065$, respectivamente) por lo que se infiere de los cambios entre épocas seca y lluviosa no afectan directamente el estado de estos microorganismos muy importantes en los sistemas acuáticos (ISO, 2008; ISO, 2011; Persoone, 2003).

Los resultados reflejados en las gráficas 3A ($P = 0.5319$), 3B ($P = 0.3117$), 3C ($P = 0.3590$), 3D ($P = 0.8532$) y 3E ($P = 0.3304$), indicaron que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los puntos de muestreo y la batería de los cinco biotest utilizados, lo cual demuestra que las aguas del río Cuilco, en los puntos de muestreo, no presentan cambios importantes en la ecotoxicidad aguda.

En la gráfica 4, se presenta la evaluación de los muestreos frente a los biotest utilizados, se demostró en la gráfica 4A que existe diferencia significativa ($P = 0.0001$), observando que los muestreos 3 (inicio de la época lluviosa), 4 y 5 (finalización de la época lluviosa) marcan la mayor diferencia en el caso de *V. fischeri* sin que estos resultados representen, estadísticamente hablando, ecotoxicidad aguda para el río Cuilco. La gráfica 4B, con un resultado estadístico significativo ($P = 0.0000$), evaluó los muestreos basados en el biotest de *S. capricornotum*, en donde se observa con gran claridad la diferencia entre el muestreo 1 con el 3, estos resultados indicaron que las épocas seca y lluviosa tuvieron influencia sobre el comportamiento del biotest utilizado.

La gráfica 4C, evalúa el comportamiento de los muestreos con el test de *T. thermophila* en la cual se demostró que existe diferencia significativa ($P = 0.0000$), la cual es más marcada entre el muestreo 2 y 5, época seca y época lluviosa, respectivamente. En el caso del biotest usando *T. platyurus* (gráfica 4D), los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.0067$), señalando que el muestreo 3 (época lluviosa) con el 6 (época seca), son los que mayor diferencia mostraron entre sí. La gráfica 4E, que relaciona los muestreos evaluados con *B. calyciflorus* demostraron también una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0000$) principalmente entre el muestreo 1 con el 5.

Se determinó que cada uno de los biotest utilizados en este estudio presentó variaciones en su comportamiento entre épocas seca y lluviosa, esto puede deberse a que el inicio de la época lluviosa (muestreo 3), arrastra con todos los contaminantes provenientes de la agricultura, ganadería y diversas actividades antropológicas, llegando al pico máximo al final de la época lluviosa (muestreo 5), esto puede deberse a que el final del invierno se remueven los lodos más profundos de la cuenca liberándose gran cantidad de contaminantes que se encuentran atrapados en ellos debido a la capacidad de adsorción de los mismos (COGUANOR, 2010; Gutiérrez, 2002; Persoone, 2003).

Los datos obtenidos a lo largo del estudio, indicaron que estadísticamente no existe riesgo de ecotoxicidad aguda en las aguas de la cuenca del río Cuilco a lo largo de los cinco puntos muestreados, aunque, basados en las publicaciones de Persoone (2003), es necesario mantener el control ecotoxicológico principalmente de las aguas cercanas al punto RC4 ya que presentó un riesgo de ecotoxicidad aguda de nivel III en la mayoría de los muestreos.

X. CONCLUSIONES

1. La época lluviosa es la que tiene mayor impacto en la ecotoxicidad aguda del agua, demostrado que en la época seca existe el nivel de riesgo de ecotoxicidad de clase II y en época lluviosa el nivel de riesgo de ecotoxicidad aumenta a clase III, sin embargo se encuentra dentro de los límites permitidos de aguas naturales, según la evaluación realizada en la parte alta de la cuenca del río Cuilco.
2. En los cinco puntos de muestreo evaluados de la parte alta de la cuenca del río Cuilco, con los biotest utilizados, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.01$) para la ecotoxicidad aguda de sus aguas, se comprueba que la batería de biotest utilizada es una herramienta útil en la evaluación de la ecotoxicidad aguda de aguas naturales.
3. Existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre los muestreos 1, 2, y 6 (época seca) y los muestreos 3, 4, y 5 (época lluviosa) realizados en este estudio, se comprueba que los cambios producidos por las precipitaciones pluviales influyen en el comportamiento de los cinco biotest utilizados.
4. El punto de muestreo identificado como RC4, presentó una clasificación, según Persoone (2013), de nivel de riesgo clase III en un 33% de los datos, siendo importante el monitoreo continuo de este punto para evitar que incremente el nivel de riesgo y pueda influir estadísticamente en los resultados.

XI. RECOMENDACIONES

1. Los estudios limnológicos del río Cuilco son escasos y las metodologías utilizadas para detectar los niveles de ecotoxicidad son muy nuevas en Guatemala, por lo que es necesario seguir experimentado y fortaleciendo las líneas de investigación para que de esta forma se desarrolle un plan de educación ambiental en beneficio de los pobladores y ecosistemas en el área de influencia.
2. Realizar un análisis profundo con la ayuda de la ecotoxicología para determinar por medio de análisis físicos, químicos y bacteriológicos de las aguas del río Cuilco, en especial del punto RC4, detectando el o los tóxicos que presenta y cuantificándolos para desarrollar métodos, regenerar el estado natural del agua y así evitar que se exceda de la capacidad natural de autopurificación del río Cuilco.
3. Aplicar la batería propuesta en este estudio al riachuelo Quivichil para detectar los focos con mayor ecotoxicidad aguda.
4. Realizar análisis ecotoxicológicos, utilizando diferentes bioensayos en las baterías que incluyan: bacterias, algas, protozoos, microcrustáceos, rotíferos y complementando con microorganismos propios de las cadenas tróficas, para que de esta manera se puedan obtener resultados con mayor exactitud.
5. Incrementar en época lluviosa los monitoreos de ecotoxicidad del agua del río Cuilco para determinar nuevos contaminantes y su origen.
6. La aplicación de la ecotoxicología debe seguir en investigación con el apoyo de instituciones tanto públicas como privadas, para crear una línea base de datos, que en el futuro sea comparable con los resultados que se tienen hoy en día, ya que de esta forma

se evaluará la evolución toxicológica que presenta el río Cuilco y tomar las medidas necesarias para impedir el desequilibrio ecológico que esto conlleva.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert, L. (2008). *Curso Básico de Toxicología Ambiental* (2da. Edición ed.). México, D.F.: Limusa, S.A. de C.V.
2. APA, A. P. (2012). Administración Provincial del Agua del Cochi. Recuperado el julio de 2012, de <http://www.guiasenor.com/directorio/empresas/249815/administracion-provincial-del-agua-apa.htm>
3. ASTM American Society for Testing and Materials, A. (2004). ASTM, E1440 - 91 Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer Brachionus. USA.
4. Blaise, C. (2006). Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects. *Environmental Toxicology and Water Quality.*, 6 (2), 145-155.
5. Brusca, R. B. (2005). *Invertebrados*. (2da. edición ed.). Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana, S.A.U.
6. Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (1era ed.). México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
7. Castro, S. E. (2002). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Dirección Nacional de Medio Ambiente/Laboratorio Tecnológico de Uruguay; Centro de Investigaciones del Medio Ambiente/Universidad de la Plata (Argentina); Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (Canadá) , Uruguay.
8. COGUANOR. (2010). Recuperado el 30 de mayo de 2012, de [http://www.coguanor.gob.gt/normas/Cat%C3%A1logo%20de%20Normas%20T%C3%A9cnicas%20Guatemaltecas%20\(2\).pdf](http://www.coguanor.gob.gt/normas/Cat%C3%A1logo%20de%20Normas%20T%C3%A9cnicas%20Guatemaltecas%20(2).pdf)
9. Eaton, A. C. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater* (21th Edition ed.). Washington, D.C., USA: American Public Health Association (APHA), American Water Work Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF).

10. Enderlein, E., R., & Williams, W. P. (1997). *PAHO and UNEP*. Recuperado el 29 de mayo de 2012, de http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/wpcchap2.pdf
11. EPA. (1986). Environmental Protection Agency. En *Gold Book of Quality Criteria for Water* (Vols. 440/5-86-001, págs. 149-280). USA.
12. EPA. (octubre de 2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Recuperado el 12 de septiembre de 2012, de <http://www.dep.state.fl.us/water/wastewater/docs/atx.pdf>
13. Fair, G. y. (1993). *Ingeniería Sanitaria y Aguas Residuales* (Vols. 1,3,4). México: Limusa.
14. Fernández Cirelli, A. (2003). *Calidad de Agua y Contaminación Química. El Agua en Ibero América Aportes para la integración entre los organismos de gestión y los centros de investigación*. CYTED XVII, Chile.
15. Gutierrez, J. (2002). ¿Por qué secuenciar a Tetrahymena? *Actualidad, Sociedad Española de Microbiología*, 33 (15), 4.
16. INSIVUMEH. (2005). Atlas Hidrológico. *Atlas Hidrológico de Guatemala Segunda Edición*. Guatemala, Guatemala, Guatemala, C.A.
17. INSIVUMEH, I. d. (2012). INSIVUMEH. Recuperado el Julio de 2012, de http://www.insivumeh.gob.gt/hidrologia/rios_de_guatemala.htm#PRINCIPALES
RIOS DE GUATEMALA
18. ISO. (2007). ISO 11348-3:2007: Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
19. ISO. (2008). ISO 20666:2008: Water quality -- Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48 h.
20. ISO. (2011). International Organization for Standardization. Recuperado el 11 de junio de 2012, de http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=54613
21. ISO. (2011). ISO 14380:2011: Water quality -- Determination of the acute toxicity to *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca).
22. ISO. (2012). ISO 8692:2012: Water quality -- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.

23. Kleiser, K. P. (1991). *Photobacterium phosphoreum toxicity data index*. Canadá: Canadian Association on Water Pollution Research and Control, Canadian Association of Water Quality.
24. Lu, M. (Agosto de 2001). *Environmental Law Alliance Worldwide (LAW)*. Recuperado el 09 de junio de 2012, de <http://www.elaw.org/>
25. Machorro, R. (1996). *Water Quality at Lago de Izabal, Guatemala: Geochemical Characterization and Assesment of Trophic Status*. University of Texta, El paso, Departmen of Geological Sciences., El paso.
26. Margalef, R. (1983). En *Limnología* (págs. 750-910). Barcelona, España: Ediciones Omega.
27. McLaughlin, P. C. (Agosto de 2005). Common and Scientific Names of Aquatic Invertebrates from the United States and Canada: Crustaceans. American Fisheries Society Publication (31), 545 p.
28. Metcalf & Eddy, I. (1995). Ingeniería de agua residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. (3era. edición ed.). Madrid, España: Mc Graw Hill Interamericana.
29. OECD. (Julio de 2002). OECD: The Organization for Economic Co-operation and Development. Recuperado el 07 de marzo de 2013, de <http://www.oecd.org/>
30. Parra, R. (22 de febrero de 2010). *Universidad de Alcalá*. Recuperado el 30 de mayo de 2012, de http://www2.uah.es/diariodigital/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=3176
31. Pelczar, M. R. (1994). *Microbiología* (4ta. ed.). Mc-Graw Hill Interamericana.
32. Pérez, C. (6 de octubre de 2011). *worldpress.com*. Recuperado el 25 de mayo de 2012, de <http://habloporsanmiguel.wordpress.com/2011/10/06/monografia-de-sanmiguel-ixtahuacan-san-marcos/>
33. Pérez, F. O. (2003). *Contaminación fisicoquímica y bacteriológica del Río Dulce y Lago de Izabal*. Programa Universitario de Investigación de Recursos Naturales y Ambiente - PUIRNA-. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
34. Persoone G., J. C. (2000). New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring. New York: Kluweracademic/Plenumpublishers.

35. Persoone, G. M.-J. (1 de septiembre de 2003). *A Practical and User-Friendly Toxicity Classifying System with Microbiotests for Natural Water and Wastewaters*. Wiley Periodicals, Inc. , 8.
36. Prospero, C. (12 de enero de 2007). *Los Microorganismos y la Evaluación de la Calidad del Agua*. Recuperado el 09 de junio de 2012, de <http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/gestionhidricos/File/Estrucplan.pdf>
37. Ramírez A., V. G. (1998). *Limnología colombiana. Aportes a su conocimiento y estadísticas de análisis*. BP Exploration Company, Ltd. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia: Panamericana Impresos, S.A.
38. Roldán Pérez, G. (1992). *Fundamentos de Limnología Neotropical*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
39. Ruppert, E. B. (1996). *Zoología de los invertebrados* (6ta. edición ed.). México, D.F.: McGraw-Hill interamericana.
40. Sarmiento, M. D. (2011). Toxicity and potencial risk assessment of a river polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt. *Science of the Total Environment*, 409, 4763-4771.
41. SEGEPLAN, S. d. (2012). SEGEPLAN. Recuperado el Julio de 2012, de <http://www.segeplan.gob.gt>
42. Solano, A. (noviembre de 2005). *Movilización de Metales Pesados en Residuos y Suelos Afectados por la Hidrometalurgia del Cinc*. Recuperado el 30 de mayo de 2012, de www.tesisenred.net: <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/11036/Tasm01de16.pdf?sequence=1>
43. Törökné, A. (2004). *Sensitivity evaluation of the Daphtoxkit and Thamnotoxkit microbiotests on blind samples*. *Journal of Applied Toxicology*, 24 (5), 323-326.

ANEXOS

