

UCH - FC  
Q. Ambiental  
R672

**C.3 EVALUACION DE LA TOXICIDAD AGUDA EN RESIDUOS  
INDUSTRIALES SOLIDOS, DESARROLLO DE UN METODO  
ANALITICO DE SCREENING**

Seminario de Título  
Entregado a la  
Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al título de

**QUIMICO AMBIENTAL**



Gonzalo Andrés Rocha Rodríguez

Director Seminario de Título: Dr. Pablo Richter D.

Profesor Patrocinante: Dra. María Cecilia Rojas G.

Diciembre de 2000

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
SEMINARIO DE TITULO



Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la  
Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el  
alumno

Gonzalo Andrés Rocha Rodríguez

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del Seminario de  
Título como requisito para optar al título de Químico Ambiental

**Comisión**

Prof. Patrocinante: Dra. María Cecilia Rojas G.

Dr. Guido Pincheira V.

Dr. Orlando Muñoz M.



A mi familia, especialmente a mi madre.

## INDICE DE MATERIAS



1.- RESUMEN.....	1
2.-INTRODUCCION .....	3
3.- MATERIALES Y METODOS.....	6
3.1.-Bacteria.....	6
3.2.- Instrumento.....	6
3.2.1.-Operación del Instrumento .....	7
3.3.-Reactivos y soluciones.....	7
3.4.-Procedimiento de medida.....	14
3.5.- Procedimiento de preparación y análisis de las muestras .....	15
4.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	18
4.1.- Toxicidad de soluciones estándares de metales evaluadas mediante bioensayo.....	18
4.2.- Análisis de muestras de residuos sólidos industriales.....	22
4.2.1.- Evaluación de la toxicidad.....	22
4.2.2.- Condiciones de lixiviación.....	24
5.-CONCLUSIONES.....	27
6.BIBLIOGRAFIA.....	30

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Generación de RISES en distintas regiones de Chile.

Tabla 2: Bioensayo de toxicidad para soluciones estándar de metales.

Tabla 3: Bioensayo de toxicidad para residuos industriales

Tabla 4: Extracción de metales en residuos sólidos industriales.



## LISTA DE ABREVIATURAS

RISES: Residuos Industriales Sólidos

CENMA: Centro Nacional del Medio Ambiente. (CHILE)

TCLP: *Toxicity Characteristic Leaching Procedure.*

ICP-OES: Espectroscopia de Plasma Acoplado Inductivamente.

IT50: Tiempo medio inhibitorio. Tiempo necesario para inhibir en un 50% el efecto estudiado, en este caso, la emisión de luz por la bacteria *Vibrio fischeri*, a una concentración dada del tóxico

EPA: *Environmental Protection Agency.* (USA)



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema aplicación de método de screening en el análisis de una muestra.
- Figura 2: Reacción de bioluminiscencia.
- Figura 3: Proceso de autoinducción.
- Figura 4: Fotografía del instrumento, Microtox™ modelo 500
- Figura 5: Interruptor en parte posterior del instrumento, Microtox™ modelo 500
- Figura 6: Esquema de la posición de los pozos en la incubadora en Microtox™ modelo 500
- Figura 7: Esquema de la posición de las soluciones de metales.
- Figura 8: Esquema de la posición de los lixiviados de las muestras.
- Figura 9: Bioensayo de luminiscencia para soluciones estándar de metales.
- Figura 10: Bioensayo de luminiscencia para lixiviados de residuos sólidos provenientes de una fundición metalúrgica.

## 1.- RESUMEN

El presente Seminario de Título consistió en realizar un estudio preliminar para determinar la toxicidad aguda por metales que puedan estar presentes en residuos industriales sólidos (RISES). El propósito general es poder utilizar un bioensayo como método de *screening* de metales en los lixiviados de estos residuos, y de esta forma aplicar la identificación y cuantificación de metales (TCLP), solo a las muestras que presenten toxicidad en el bioensayo.

El bioensayo se basa en la medición de la luminiscencia producida por la actividad metabólica de la bacteria marina *Vibrio fischeri* o *Photobacterium phosphoreum*. El instrumento que se utiliza para medir dicha intensidad luminiscente se llama Microtox™.

La bacteria se agrega al lixiviado del residuo y el instrumento registra la variación de la intensidad de luz que se interpreta por un índice, IT50, el cual corresponde al tiempo de exposición que causa la inhibición en un 50% de la emisión de luz. En el ensayo de toxicidad aguda, se mide el decaimiento de la luminiscencia en los primeros 30 minutos de exposición de la bacteria al lixiviado.

Primero se investigó si las concentraciones límites para los metales (As, Ba, Cd, Cr, Pb y Se), consideradas como tóxicas a través del criterio EPA, utilizado para RISES, presentan toxicidad aguda en el bioensayo de luminiscencia. Con este propósito se analizaron soluciones acuosas a distintas concentraciones de estos iones metálicos. Se observó en esta experiencia, una disminución en la intensidad luminiscente de la bacteria con respecto al tiempo, para todos los metales ensayados, efecto que fue más notorio al aumentar la concentración, excepto para el Se(IV) con el que no se observaron diferencias significativas en la disminución de la luminiscencia al aumentar la concentración.

Se encontró que las soluciones de As(V) 4ppm, Ba(II) 76ppm, Cd(II) 0.8ppm, Cr(III) 8ppm y Pb(II) 4ppm, presentan valores de IT50 de 8.5 min., 4.6 min., 8.3 min., 24.2 min. y 5.7 min. respectivamente, lo que indica que estos metales pueden ser detectados por el bioensayo.



Las muestras de residuos sólidos provenientes de una industria metalúrgica, fueron analizadas en forma paralela por el bioensayo y el método TCLP.

Para los lixiviados de las muestras analizadas por el bioensayo, se encontró toxicidad aguda en uno de ellos, con un valor IT50 de 13.7 minutos. Su contenido de metales fue, Pb 2.9ppm, Cu 2.3ppm, Fe 0.1ppm y Zn 2.7ppm. Los lixiviados restantes no presentaron toxicidad aguda y sus contenidos de metales variaron entre 0.01-0.2 ppm de Zn y 0.5-1.6 ppm de Fe.

Los resultados de toxicidad aguda obtenidos por medio del bioensayo aplicado tanto a las soluciones acuosas como en los lixiviados de las muestras, indicarían que el método sirve como indicador preliminar de la presencia de metales. Sin embargo, como el método no es selectivo no nos asegura si la toxicidad aguda se debe a la presencia de un metal o al conjunto de metales presentes en el lixiviado de la muestra.

El método tiene la ventaja de ser rápido y evita la lentitud del análisis completo para la identificación y cuantificación en muestras que no evidencian la presencia de metales.

En el presente informe es posible verificar una correlación entre la toxicidad de los lixiviados hacia la bacteria y los contenidos de metales de las muestras respectivas.

## 2.- INTRODUCCION

Uno de los problemas de contaminación ambiental es la que generan los residuos sólidos industriales (RISES), entendiéndose como tales, aquellas sustancias que no son vertidos al alcantarillado y no tienen ningún valor comercial para la empresa o industria que los genera. Este tipo de residuo es de difícil manejo y presenta inconvenientes en el transporte y disposición, particularmente cuando éstos son peligrosos. Por otra parte la falta de legislación al respecto incrementa el deterioro de la calidad de vida.

En Chile se generan alrededor de 1.800.000 ton/año de residuos industriales sólidos y el 5% de éstos se estima que son residuos peligrosos. La **tabla 1** contiene datos de la generación de RISES en algunas regiones del país.

**Tabla 1:** Generación de RISES en distintas regiones de Chile (1).

Región	Cantidad (ton/año)
Metropolitana	1.000.000
V	300.000
VIII	500.000
IX	50.000

Por esto es necesario la caracterización de los RISES para clasificarlos respecto a su grado de peligrosidad. De acuerdo a criterios internacionales (2), la caracterización de RISES implica determinar su potencial inflamabilidad, corrosividad, reactividad y toxicidad. Estas metodologías deben adaptarse a la realidad nacional, con lo cual podríamos asegurar un buen manejo y una disposición final ambientalmente aceptable.

En nuestro país, el Centro Nacional del Medio Ambiente, CENMA esta implementando este tipo de metodologías.

Para determinar la característica de toxicidad del residuo el procedimiento que se realiza es el *Toxicity Characteristic Leaching Procedure*, TCLP. Esta prueba consiste en evaluar por lixiviación la concentración de 41 especies, de las cuales 33 son orgánicas (Pesticidas, Herbicidas, Semivolátiles y Volátiles) y ocho inorgánicas (As, Ba, Cd, Cr, Hg, Ag, Pb y Se). Las muestras se clasifican como tóxicas si cualquiera de las especies evaluadas sobrepasa la concentración límite establecido en el TCLP. El procedimiento analítico establecido por EPA para el TCLP tiene la gran desventaja de ser costoso y muy lento\*.

En la actualidad se requiere de métodos analíticos complementarios que permitan generar resultados rápidos y confiables que ayuden a las autoridades y organismos fiscalizadores a tomar, sin demora, las medidas correspondientes a cada caso.

En este plano, se propone la utilización del Microtox™ para realizar un *screening* previo de toxicidad aguda por metales en lixiviados de RISES. Se espera que las muestras que resulten tóxicas por Microtox™, sean evaluadas de acuerdo al protocolo establecido para el TCLP, de manera de que las muestras no tóxicas puedan ser rápidamente detectadas y descartadas, sin necesidad de procesarlas de acuerdo al TCLP convencional.

\* Para el grupo de los metales este procedimiento básicamente involucra una lixiviación del residuo de  $18 \pm 2$  horas, una posterior filtración y digestión ácida del lixiviado, y finalmente la lectura o determinación por espectroscopia de absorción atómica de cada una de las especies metálicas.

### **Métodos de screening.**

Un método de *screening* se puede definir como aquel método analítico que permite entregar una respuesta binaria (**si/no**), en relación a la presencia de un cierto nivel de concentración de una especie en una matriz determinada. En éstos métodos se sacrifica en cierto grado una propiedad analítica (sensibilidad, selectividad, precisión, exactitud) en virtud de obtener información veraz, en un periodo de tiempo menor. Aunque la calidad de la información analítica en rigor decrece, ésta es válida para tomar decisiones acertadas frente a una problemática dada.

Este trabajo se basa en la utilización del sistema Microtox™ *Acute Test* como un método de *screening* para determinar en forma rápida si un residuo industrial sólido presenta la característica de toxicidad por metales. La **figura 1** muestra el concepto y la aplicación de los métodos de *screening* en el análisis de muestras.

### **Objetivo general:**

- Establecer si el bioensayo de toxicidad por el sistema Microtox™ es aplicable como método de *screening* previo al TCLP para la determinación de toxicidad por metales en RISES.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar si a la concentración límite de toxicidad establecido por EPA (USA) para los metales As, Ba, Cd, Cr, Pb y Se presentan toxicidad para la bacteria luminiscente utilizada en el sistema Microtox™.
- Evaluar el bioensayo de toxicidad aguda por Microtox™ con muestras de residuos sólidos industriales provenientes de fundiciones de hierro y de aluminio.

### 3.-MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- Bacteria

De los materiales utilizados en este trabajo la bacteria es uno de los mas importantes. Como se menciona en el resumen, ésta es una bacteria marina (*Vibrio fischeri* o *Photobacterium phosphoreum*) la cual emite luz (490nm.) como producto de su respiración. La **figura 2** muestra los substratos, productos y vías involucradas en la bioluminiscencia bacterial.

En su ambiente natural la bacteria se encuentra formando parte de una relación simbiótica con organismos superiores como algunas especies de peces y crustáceos. Generalmente estos organismos poseen la característica de luminiscencia, esto se debe a que ciertos órganos están infectados por una alta concentración de la bacteria. También se encuentra en forma libre en el mar, a concentraciones que son bajas (100 células/ml), y no logran emitir luz. Para que la bacteria pueda emitir luz debe estar a una concentración superior a 1.000 células/ml. Así logran comunicarse por medio de un autoinductor [N-(3-oxohexanoyl) homoserina lactona], que activa la síntesis de una enzima llamada Luciferasa, la cual cataliza la reacción de bioluminiscencia. La **figura 3** muestra éste proceso.

Para efectos del trabajo experimental se utilizó viales que contenían del orden de  $10^8$  células de la bacteria liofilizada, que se resuspenden en 1ml. de agua desionizada. La concentración final utilizada para el bioensayo (como se verá mas adelante) corresponde a  $1,1 \times 10^6$  células por ml.

#### 3.2.- Instrumento

Este consta de una pantalla digital de, aproximadamente, 30cm. de largo y 3cm. de ancho, una incubadora con 35 pozos en ella; un pozo (REAGENT) donde se activa la bacteria y un pozo (READ) en el cual se realiza la lectura fotométrica. Tiene un selector de longitud de onda a 490 nm. y un fotodetector de tipo fotomultiplicador que transforma la energía luminiscente en eléctrica. Además el instrumento posee un sistema análogo digital que permite ver en la pantalla la intensidad de radiación. La **figura 4** muestra una foto del instrumento.

### 3.2.1.- Operación del instrumento

Antes de realizar el bioensayo se debe verificar que el interruptor de la parte posterior del instrumento se encuentre en la posición *Toxicity Acute*. La **figura 5** muestra las opciones de análisis que se pueden realizar con el Microtox™.

Luego de encender el instrumento se debe esperar que la incubadora llegue a la temperatura de 15°C en los pozos (de 1 a 5 y de A a F) y a una temperatura de 5°C en pozo REAGENT, la **figura 6** es un esquema de la posición de los pozos en la incubadora del instrumento. Cuando la incubadora llega a la temperatura indicada, en la pantalla del instrumento aparece un símbolo ( \* ), el cual indica que esta listo para realizar las mediciones.

### 3.3.- Reactivos y soluciones

A partir de estándares de 1.000 ppm de Titrisol, se prepararon soluciones de trabajo, a distintas concentraciones: As 16ppm, Cr 16ppm, Cd 3.2ppm, Pb 16ppm, Se 10ppm, Ba 304ppm, Zn 160ppm. Luego, a partir de éstas concentraciones se realizaron 4 diluciones sucesivas a la mitad. De ésta forma se asegura que las concentraciones límites establecidas en la prueba TCLP fueran analizadas por el bioensayo.

Se preparó un buffer fosfato para ajuste de pH, para lo cual se disolvió fosfato monoácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) en una relación molar de 1.5:1.0 en 1 litro de agua, pH 7,4. También se preparó una solución al 2% de NaCl, el cual se utiliza como diluyente.

La solución **extractante** utilizada para el análisis de las muestras se preparó de la siguiente manera, en 1 litro de agua desionizada se agregaron 2.57gr. de NaOH y 5.7ml. de ac. acético glacial. Una vez preparadas las soluciones, éstas fueron almacenadas en un refrigerador a 4°C para al día siguiente realizar el bioensayo.

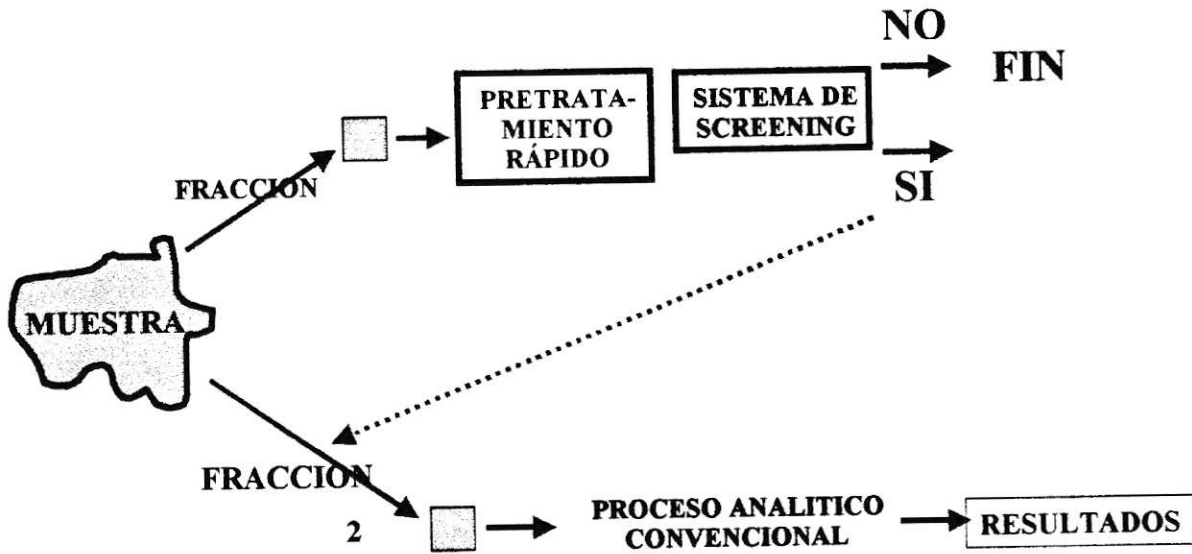
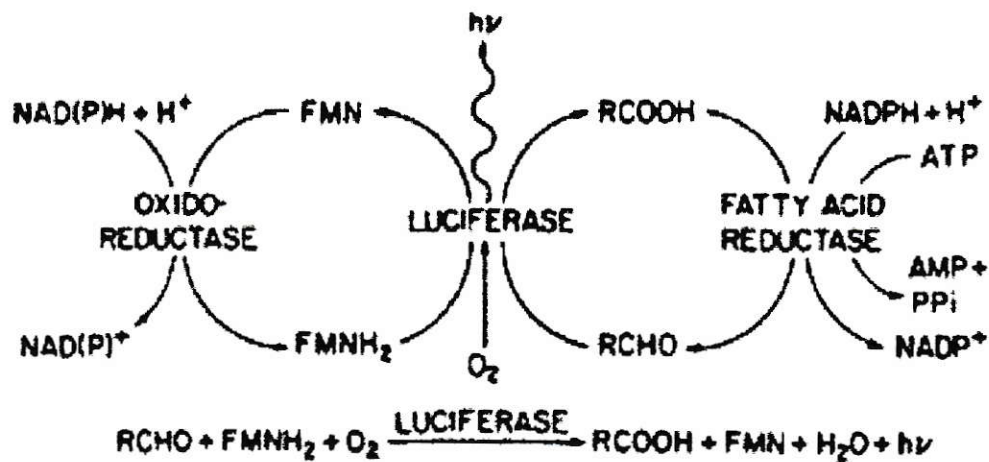


Figura 1: Esquema de aplicación de método de screening en el análisis de una muestra.



**Substrates, Products and Pathways Involved in the Bacterial Bioluminescence Reaction**

Figura 2: Reacción de bioluminiscencia.



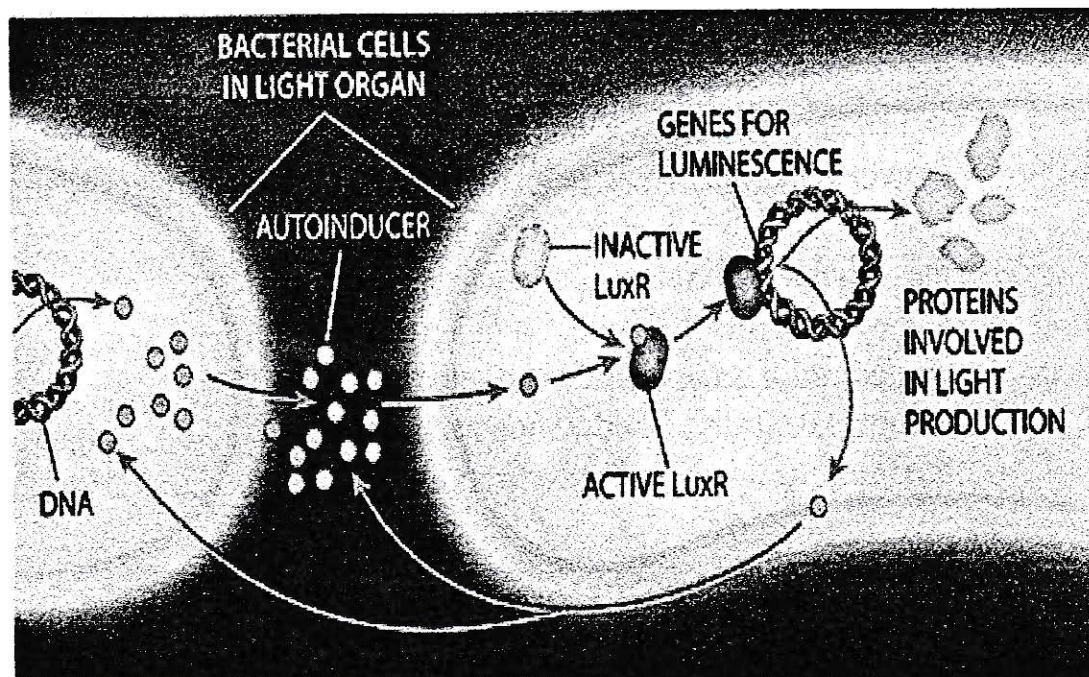
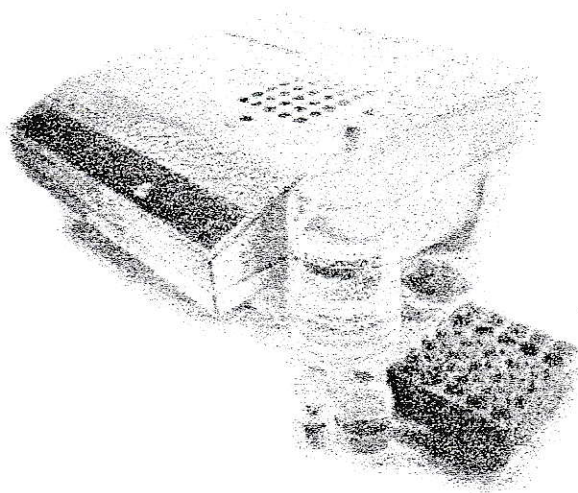
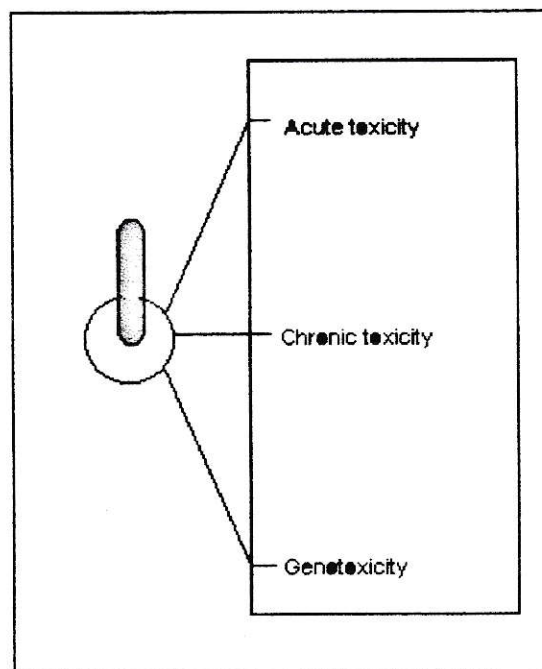


Figura 3: Proceso de autoinducción



**Figura 4:** Fotografía del instrumento, Microtox™ modelo 500.



**Figura 5:** Interruptor en parte posterior del instrumento, Microtox™ modelo 500.

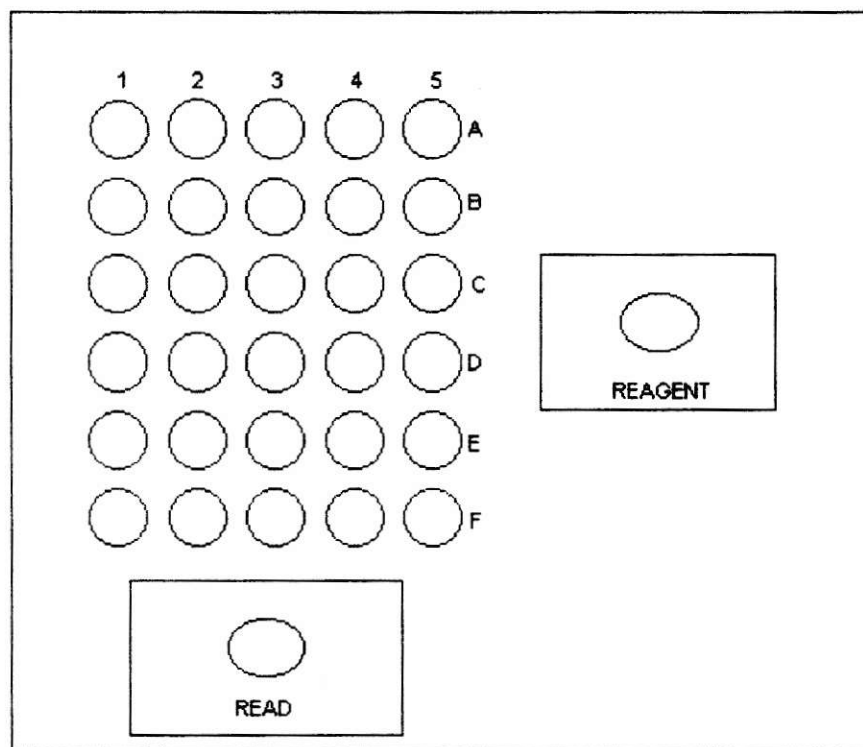


Figura 6: Esquema de la posición de los pozos en la incubadora, Microtox™ modelo 500.

### 3.4.- Procedimiento de medida

Se realiza el encendido del instrumento indicado en el punto 3.2.1, el cual se debe llevar a cabo a lo menos 45 minutos antes de usar para que la temperatura llegue a la requerida en la incubadora. Los siguientes pasos resumen el procedimiento de medida en la utilización del instrumento.

**Paso 1:** Colocar las cubetas de borosilicato (diámetro externo 1,2cm. y 5cm. de largo aprox.) en los pozos 1 a 5 y A a F, también en el pozo REAGENT .

**Paso 2:** Agregar en los pozos 1 a 5 y A a F, 900  $\mu$ L solución al 2% de NaCl.

**Paso 3:** Agregar 1ml. de solución de reconstitución (agua ultra pura) en el pozo REAGENT.

**Paso 4:** Colocar una cubeta en el pozo READ y agregar 1.8 ml. de solución al 2% de NaCl, esperar 5 minutos.

**Paso 5:** Sacar el vial con las bacterias del freezer que esta a  $-20^{\circ}\text{C}$  y reconstituirla.

**Paso 6:** Para reconstituir la bacteria se debe vaciar la solución de reconstitución, que esta en la cubeta del pozo REAGENT, en el vial. Homogeneizar y devolver el contenido a la cubeta del pozo REAGENT, esperar 5 minutos.

**Paso 7:** Tomar la pipeta de repetición con puntas de tipo jeringa de 0.25ml, homogeneizar el contenido de la cubeta en el pozo REAGENT.

**Paso 8:** Tomar 400 $\mu$ l de la cubeta del pozo REAGENT y agregarlos a la cubeta del pozo READ. Esto se realiza dos veces, para poder agregar la bacteria a todas las cubetas de análisis.

**Paso 10:** Cambiar la punta de la pipeta, homogeneizar el contenido de la cubeta del pozo READ y agregar 100 $\mu$ L a las cubetas de los pozos de A1 a A5, B1 a B5, C1 a C5, D1 a D5, E1 a E5 y F1 a F3. Esperar 15 minutos.

**Paso 11:** Rápida mente agregar 1ml. de cada solución (agua en los blancos), de las especies en estudio en el orden o secuencia que se muestra en la **Figura 7**, donde: los pozos A1 hasta A4 contienen 8ppm, 4ppm, 2ppm y 1ppm respectivamente de As(V) y en el pozo A5 se encuentra el blanco; los pozos B1 a B4 contienen 152 ppm, 76 ppm, 38 ppm y 16 ppm respectivamente de Ba(II) y en el pozo B5 el blanco; los pozos C1 a C4 contienen 1.6 ppm, 0.8 ppm, 0.4 ppm y 0.2 ppm respectivamente de Cd(II) y en el pozo C5 el blanco; los pozos D1 a D4 contienen 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm y 1 ppm respectivamente de Cr(III) y el pozo D5

el blanco; los pozos E1 a E4 contienen 5 ppm, 3 ppm, 1 ppm y 0.5 ppm respectivamente de Se(IV) y el pozo E5 el blanco; los pozos F1 a F4 contienen 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm, y 1 ppm respectivamente de Pb(II) y en el pozo F5 el blanco. El Zn(II) se realizó en otro bioensayo.

**Paso 12:** Tomar un blanco y apretar el botón SET del instrumento, esta operación permite que el fotodetector del instrumento identifique el punto inicial de medición. Luego rápidamente registrar las lecturas iniciales de cada solución en estudio cronometrando a tiempo cero el inicio de las lecturas. Medir la intensidad a los 5, 15, 30 minutos, tiempo suficiente para detectar, toxicidad aguda para la bacteria.

### 3.5.- Procedimiento de preparación y análisis de las muestras.

Las muestras de residuos sólidos seleccionadas provenían de una fundición. Tres de las cinco muestras eran escorias y las dos restantes eran arenas utilizadas en el proceso de moldear.

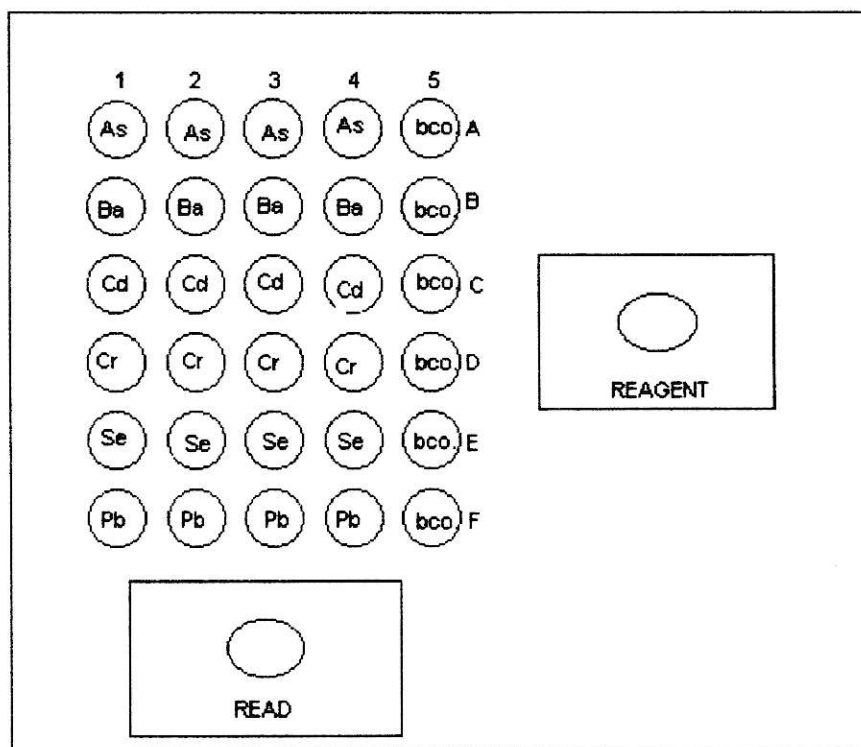
En vasos plásticos se pesaron 5 gramos de cada muestra, se les agregó 100ml. de solución extractante\* diluida en agua al 9.5 % v/v. En seguida se aplicó a cada muestra 10 minutos de ultrasonido con un desmembranador de tipo sumergible. Se dejó reposar y, mientras, se instaló el sistema de filtración con filtros de 0.45µm. para filtrar y obtener los lixiviados. A este procedimiento le llamaremos lixiviación rápida\*\*

Los lixiviados del TCLP se obtienen por agitación de la muestra con solución extractante en una relación 1:20 por 18±2 horas. A este proceso le llamaremos lixiviación convencional.

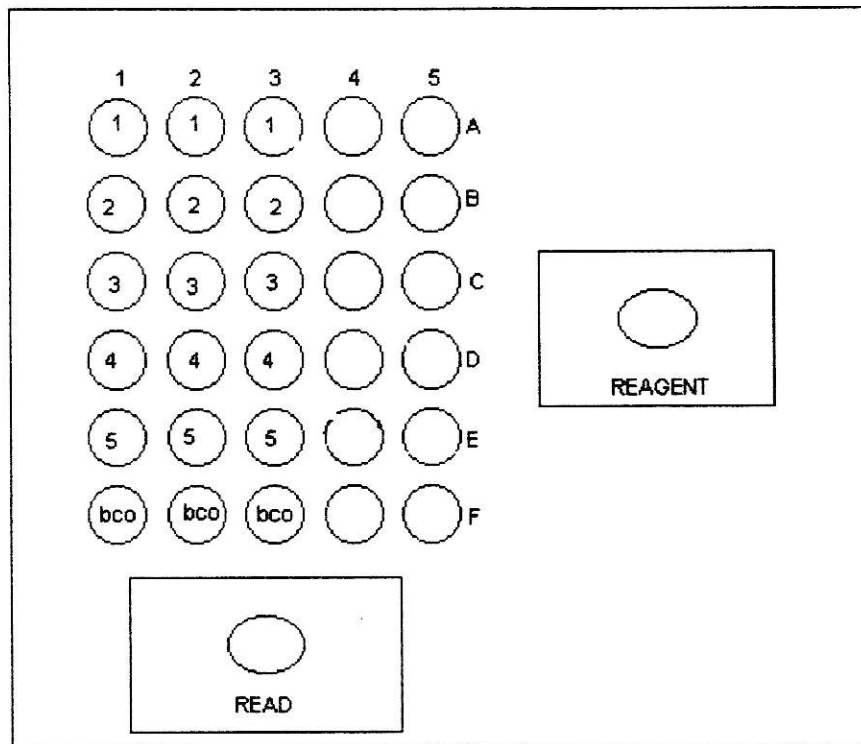
A los lixiviados obtenidos por lixiviación rápida se les ajustó el pH con 500µL. de buffer fosfato. Luego se tomaron 5 vasos plásticos en los cuales se agregaron 10 mL de cada lixiviado. Las muestras se conservaron en un refrigerador a 4°C para ser analizadas al día siguiente. Se repitieron los pasos descritos en el ítem 3.4. En el paso 11 se agrega 1 mL de cada lixiviado. En la **figura 8** se observa la disposición final de los lixiviados de las muestras en el bioensayo. Cada cubeta se analizó por triplicado y también el blanco (solución extractante diluido al 9.5% v/v) se trato de la misma manera que las muestras, a fin de minimizar las interferencias y errores experimentales.

\* La razón muestra a solución extractante 1:20 es la misma utilizada en el procedimiento del TCLP.

\*\* Los lixiviados se analizaron en cuanto a su contenido de metales por ICP-OES



**Figura 7:** Esquema de la posición de las soluciones de metales



**Figura 8:** Esquema de la posición de los lixiviados de las muestras.



## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.-Toxicidad de soluciones estándares de metales evaluadas mediante bioensayo.

Como se menciona en la introducción, el trabajo experimental comienza con la formulación de la siguiente pregunta: ¿Hay un efecto de inhibición en la producción de luz de la bacteria al ser expuesta a las soluciones estándares de metales? Los resultados se muestran en la **tabla 2**. En la primera columna de la tabla se indican los valores de concentración límite establecido por la EPA para los metales analizados por el procedimiento TCLP en RISES, en la columna central se indica el rango de concentraciones utilizadas para cada metal y en la columna de la izquierda se muestra los valores obtenidos en cada bioensayo.

En la **figura 9** se observan los gráficos intensidad de luminiscencia v/s tiempo para las soluciones de metales. Los valores de IT50 se obtienen por interpolación en los gráficos. Como se puede observar, en todos los gráficos la intensidad en los blancos se encuentra por sobre las intensidades dadas en las soluciones de iones metálicos. También se manifiesta un leve aumento en la intensidad de los blancos y en algunas de las soluciones, antes de los primeros 5 minutos de exposición, esto se debe a que las bacterias contenidas en las cubetas adquieren mayor espacio cuando se realiza el paso 11 descrito en el ítem 3.4., lo cual, disminuye el efecto de apantallamiento de una bacteria sobre otra. Luego entre los 15 y 30 minutos de exposición de la bacteria hacia los blancos se observa una estabilidad en la luminiscencia.

En general, en los gráficos se observa una disminución en los valores de IT50 al aumentar las concentraciones de las soluciones de iones metálicos (tabla 2).

Las intensidades medidas a los tres tiempos en las soluciones de As(V): a 1ppm es prácticamente igual a la intensidad luminiscente del blanco, indicando que no hay toxicidad; a 2ppm es diferente a la del blanco. Hay una clara disminución de la luminiscencia a los primeros 5 minutos de exposición, luego se observa una estabilidad a los 15 y 30 minutos. Esta concentración presenta toxicidad con un valor de  $IT50 > 30$  minutos; a 4ppm disminuye en los primeros 5 minutos, luego se estabiliza y

**Tabla 2:** Bioensayo de toxicidad para soluciones estandar de metales.

Analitos metálicos.	Concentración (ppm)	IT50*(min)
Arsénico Concentración límite(EPA): 5ppm	1.0	No toxico**
	2.0	>30
	4.0	8.5
	8.0	4
Bario Concentración límite(EPA): 100ppm	19.0	No toxico
	38.0	>30
	76.0	4.6
	152.0	2.2
Cadmio Concentración límite(EPA): 1ppm	0.2	No toxico
	0.4	>30
	0.8	8.3
	1.6	2.6
Cromo Concentración límite(EPA): 5ppm	2.0	No toxico
	4.0	>30
	8.0	24.2
Plomo Concentración límite(EPA): 5ppm	1.0	>30
	4.0	5.7
	8.0	2.8
Zinc No considerado como toxico en RISES por criterio EPA.	10	18.8
	20	10.8
	40	5.5
	80	2.7
Selenio Concentración límite(EPA): 1ppm	1.0	No toxico
	3.0	No toxico
	5.0	No toxico

\* Tiempo de exposición en el cual la luminiscencia decae en un 50%

\*\* En bioensayo de toxicidad aguda

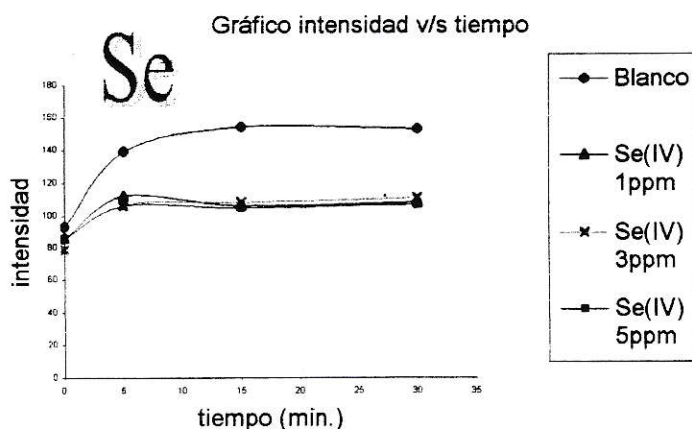
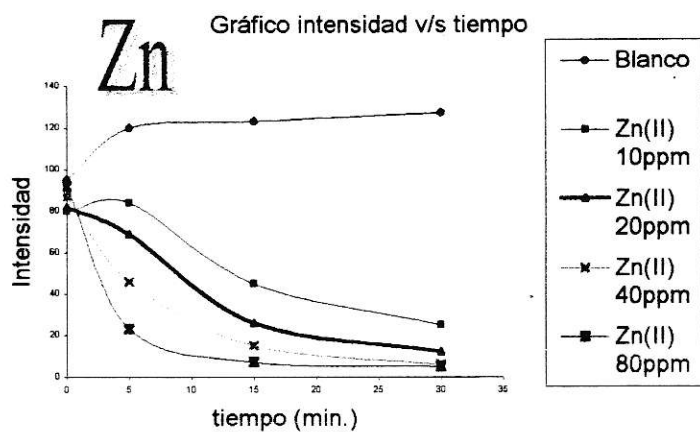
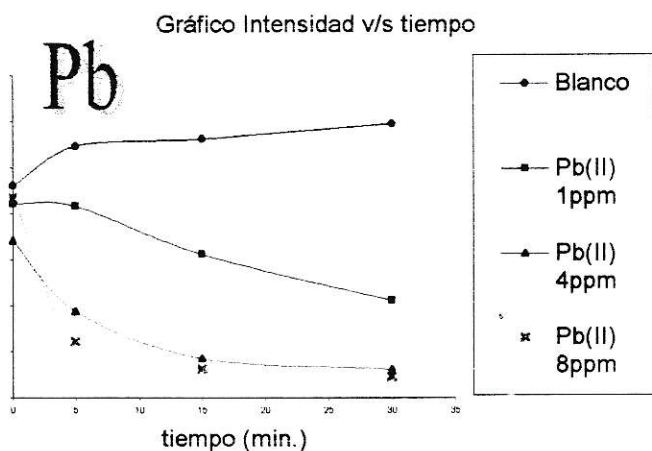
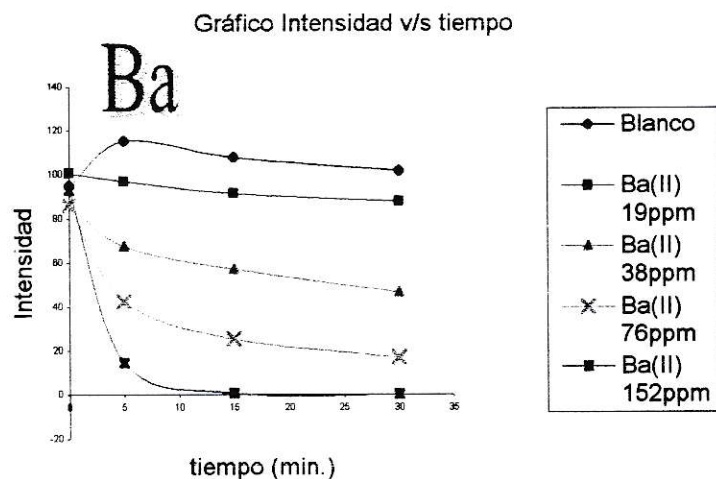
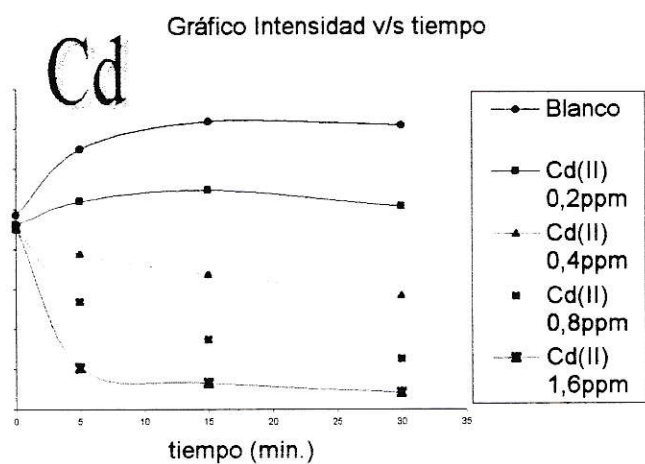
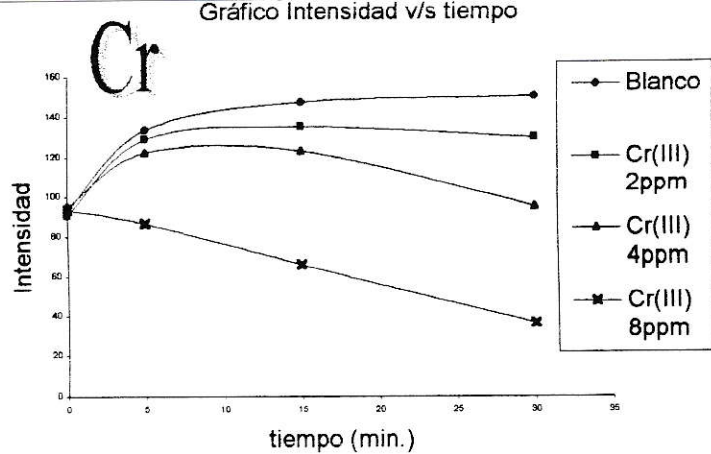
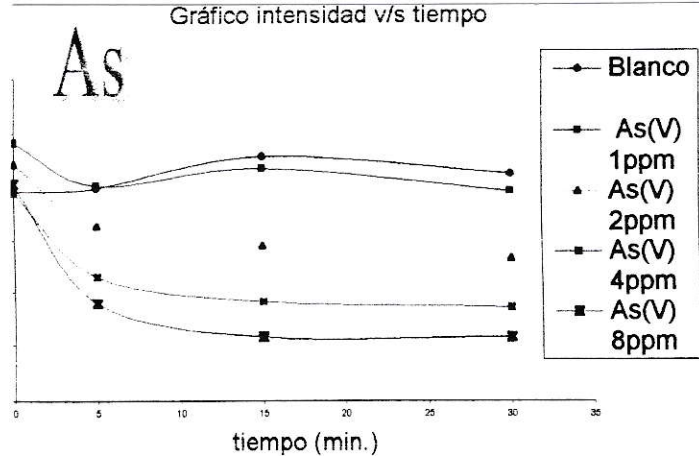


Figura 9: Bioensayo de luminiscencia para soluciones estandar de metales.

## 4.2.- Análisis de muestras de residuos sólidos industriales.

### 4.2.1.Evaluación de toxicidad

La **tabla 3** muestra los resultados de los bioensayos, de las muestras analizadas por el Microtox™.

**Tabla 3:** Bioensayo de toxicidad para residuos industriales

Tipo de residuo	IT50 (min.)
Blanco	No toxico
Muestra 1: arena de moldeado	13.7
Muestra 2: arena de moldeado	No toxico
Muestra 3: escoria de hierro	No toxico
Muestra 4: escoria de hierro	No toxico
Muestra 5: escoria de hierro	No toxico

En este bioensayo el blanco corresponde a 900µL de NaCl al 2% + 100 µL de bacteria a una concentración de  $1.1 \times 10^6$  bacterias por mL y 1 mL de solución extractante diluido al 9.5% v/v.

La **figura 10**, muestra los gráficos intensidad v/s tiempo que se obtuvieron del bioensayo aplicado al extractante a distintas concentraciones y a los lixiviados de las muestras. Se observa en el gráfico de la solución extractante que al 9.5% v/v hay toxicidad, ya que las intensidades del blanco están por sobre las intensidades dadas por la solución extractante diluida al 9.5% v/v. Sin embargo, el decaimiento de la intensidad de luz en esta solución es lento en comparación con las otras. Por este motivo se eligió como solución extractante para tratar las muestras por lixiviación rápida. Tal como se muestra en la **tabla 4**, esta solución logra extraer:  $[Pb]_T = 2.9\text{ppm}$  (concentración de plomo total en el lixiviado de la muestra);  $[Zn]_T = 2.7\text{ppm}$ ;  $[Cu]_T = 2.3\text{ ppm}$  y  $[Fe]_T = 0.1\text{ppm}$  de la muestra 1.

En el gráfico de la muestra 1 se observa una inhibición de la emisión de luz a causa de la toxicidad provocada por el lixiviado, según la tabla 4, se podría concluir que tal efecto es consecuencia de las cantidades de Pb, Zn y Cu encontradas.

Gráfico intensidad v/s tiempo

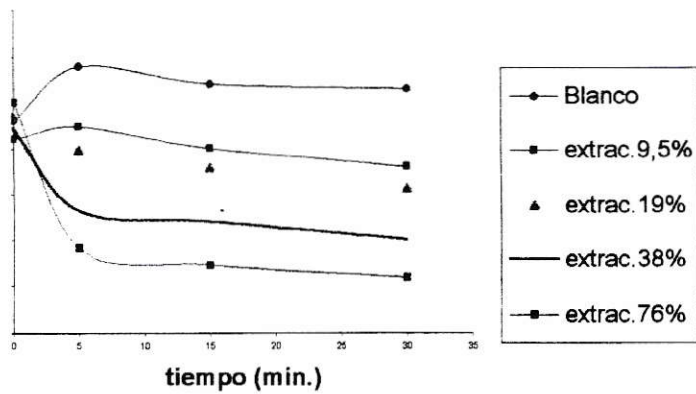


Gráfico Intensidad v/s tiempo

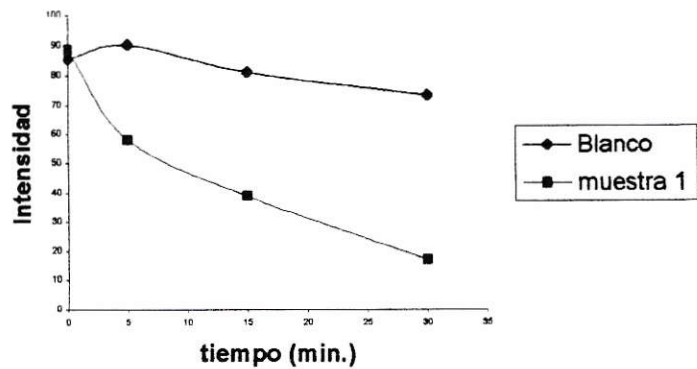


Gráfico Intensidad v/s tiempo

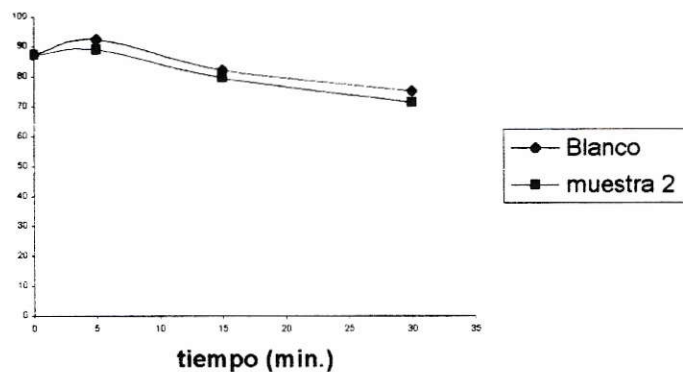


Gráfico intensidad v/s tiempo

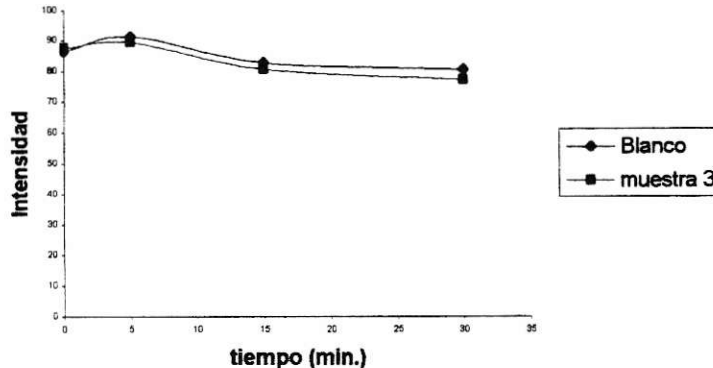


Gráfico intensidad v/s tiempo

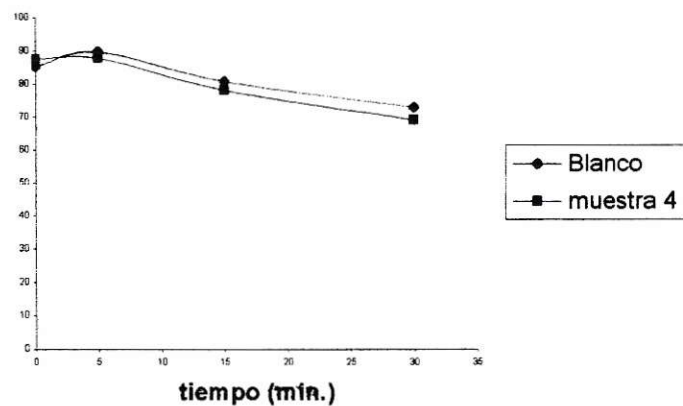


Gráfico intensidad v/s tiempo

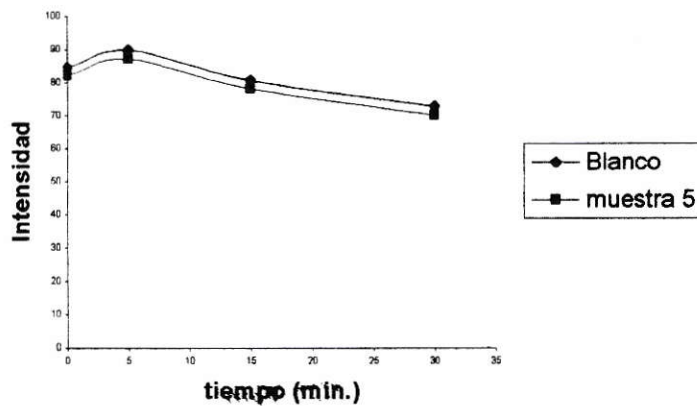


Figura 10: Bioensayo de luminiscencia para lixiviados de residuos sólidos de fundición metalúrgica

#### 4.2.2.- Condiciones de lixiviación.

Se utilizaron muestras de escoria y arena consideradas como desechos de fundición. Para evaluar la capacidad de extracción del fluido lixivante (extractante, ver reactivos y soluciones en el ítem 3.3) en condiciones rápidas, se compararon por ICP-OES las concentraciones de metales obtenidas en los lixiviados de muestras utilizando la lixiviación rápida v/s lixiviación convencional del TCLP.

**Tabla 4:** Contenido de metales en lixiviados de residuos sólidos industriales analizados por ICP.

**Muestra 1:** arena utilizada en el proceso de moldeo.

Metal	Lixiviación rápida (ppm)	Lixiviación convencional (ppm)
As	<0.03	<0.03
Ba	<5x10 <sup>-4</sup>	<5x10 <sup>-4</sup>
Cd	<0.005	<0.005
Cr	<0.01	<0.01
Hg	<0.1	<0.1
Ag	<0.0015	<0.05
Pb	2.9	18.2
Se	<0.09	<0.09
Cu	2.3	80.2
Fe	0.1	2.4
Zn	2.7	30.4

**Muestra 2:** arena utilizada en el proceso de moldeo.

Metal	Lixiviación rápida (ppm)	Lixiviación convencional (ppm)
As	<0.03	<0.03
Ba	<5x10 <sup>-4</sup>	<5x10 <sup>-4</sup>
Cd	<0.0015	<0.0015
Cr	<0.003	<0.003
Hg	<0.1	<0.1
Ag	<0.0015	<0.0015
Pb	<0.1	0.2
Se	<0.09	<0.09
Cu	<0.005	<0.0015
Fe	<0.005	0.54
Zn	0.2	1.8

**Muestra 3: Escoria de hierro**

Metal	Lixiviación rápida (ppm)	Lixiviación convencional (ppm)
As	<0.03	<0.03
Ba	<5x10 <sup>-4</sup>	<5x10 <sup>-4</sup>
Cd	<0.005	<0.0015
Cr	<0.1	<0.1
Hg	<0.1	<0.1
Ag	<0.0015	<0.0015
Pb	<0.1	0.3
Se	<0.09	<0.09
Cu	<0.005	<0.005
Fe	0.7	48.4
Zn	0.21	0.8

**Muestra 4: Escoria de hierro**

Metal	Lixiviación rápida (ppm)	Lixiviación convencional (ppm)
As	<0.03	<0.03
Ba	<5x10 <sup>-4</sup>	<5x10 <sup>-4</sup>
Cd	<0.0015	<0.0015
Cr	<0.003	<0.003
Hg	<0.1	<0.1
Ag	<0.0015	<0.0015
Pb	<0.1	<0.1
Se	<0.09	<0.09
Cu	<0.005	<0.0015
Fe	0.5	44
Zn	0.04	0.5

**Muestra 5: Escoria de hierro**

Metal	Lixiviación rápida (ppm)	Lixiviación convencional (ppm)
As	<0.03	<0.03
Ba	<5x10 <sup>-4</sup>	1.7
Cd	<0.0015	<0.005
Cr	<0.1	<0.1
Hg	<0.1	<0.1
Ag	<0.0015	<0.0015
Pb	<0.03	<0.1
Se	<0.09	<0.09
Cu	<0.005	<0.0015
Fe	1.6	295
Zn	0.01	0.41

Los valores mostrados anteceditos por el símbolo “<” (menor que), son los límites de detección del instrumento. En la muestra 1, el valor <0.05 para Ag en la lixiviación convencional (ver tabla 4) es el límite de cuantificación, es decir, el lixiviado de la muestra tiene una cantidad de Ag que se encuentra entre 0.0015 ppm y 0.05 ppm. También, en la muestra 2, el valor <0.005 para Cu en la lixiviación rápida es el límite de cuantificación del instrumento. Lo mismo ocurre con la muestra 3 respecto a Cd, en la muestra 4 respecto a Cu y en la muestra 5 con Cd, Cu y Pb.

En la muestra 1, tanto en la lixiviación rápida como en la lixiviación convencional hay cantidades de Pb, Fe, Zn y Cu. En la muestra 2 hay Zn en ambos tipos de lixiviados, Pb y Fe solo en la lixiviación convencional. Lo mismo ocurre en la muestra 3, con la diferencia de que además se encuentra Fe en el lixiviado obtenido por lixiviación rápida. En la muestra 4 hay Fe y Zn en ambos tipos de lixiviados. En la muestra 5 también hay Fe y Zn en ambos lixiviados y una pequeña cantidad de Ba en la muestra sometida a la lixiviación convencional.

Las cantidades extraídas por lixiviación rápida son, en algunos casos, hasta más de 40 veces menor que las cantidades extraídas por la lixiviación convencional.

Los resultados indican que el extractante diluido al 9.5% v/v utilizado en la lixiviación rápida logra extraer metales contenidos en las muestras como Zn, Cu, Fe y Pb (en el caso de la muestra 1), los mismos, pero en mayor concentración (debido a que se utiliza el extractante sin diluir) se encuentran en las muestras tratadas por lixiviación convencional.

La muestra 1 según el procedimiento TCLP (extracción convencional) también se clasifica como tóxica, ya que, la concentración de Pb supera el límite máximo permitido por la EPA en RISES. Además esta muestra presenta una alta cantidad de Cu y Zn.



## 5.- CONCLUSIONES

De acuerdo a lo expuesto anteriormente la metodología para análisis de toxicidad aguda por el Microtox™ presenta ventajas y desventajas.

Una de las principales ventajas que tiene éste método es la rapidez con que se obtienen resultados. En menos de 30 minutos se logra saber si la muestra presenta o no la característica de toxicidad aguda.

Requiere un pequeña cantidad de muestra. En este trabajo 5 gramos de muestra fueron suficientes.

Los resultados también presentan una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación de 10 – 20%, esto se puede observar en los gráficos de las figuras 9 y 10 donde los blancos son prácticamente iguales en cada bioensayo.

Una limitación del método se encuentra en la extracción de metales contenidos en las muestras. La utilización de la solución extractante diluida al 9.5%, en la lixiviación rápida, no extrae las cantidades reales de metales que se encuentran en las muestras de RISES. Las cantidades de metales extraídos por la lixiviación rápida son del orden de 40 veces menores que las cantidades extraídas por la lixiviación convencional. Por lo que es importante entender que este trabajo es de carácter preliminar, pues es necesario evaluar distintas condiciones de lixiviación, con distintas soluciones lixiviantes y a distintos tiempos de extracción.

El método no es selectivo, lo cual es una ventaja, ya que desde el punto de vista “método de screening” solo interesa si hay o no metales en las muestras. En la muestra 1 podemos asumir que la toxicidad aguda es debido a las cantidades de Pb, Cu y Zn que se encontraron en el lixiviado. Esta misma muestra se clasificó como toxica por el procedimiento TCLP ya que la concentración de Pb fue mayor que la concentración límite máximo permitido. En las muestras 2, 3, 4 y 5 no se observó diferencias significativas entre los blancos y los lixiviados. Por lo que se concluye que estas muestras no presentan toxicidad aguda, por metales en el bioensayo. Además no se clasificaron como tóxicas de acuerdo al procedimiento TCLP. Esto confirmaría que las muestras no tóxicas para la bacteria serán no toxicas por la prueba de laboratorio TCLP, por lo cual, el método serviría como screening previo al TCLP para RISES de la industria metalurgica.

Dentro de las limitaciones enfrentadas durante el desarrollo de esta memoria, nos encontramos con que el medio al cual fue expuesta la bacteria no es el ideal para el estudio de la toxicidad. El medio debería ser mas parecido al de su ambiente natural. Sin embargo se observan diferencias significativas entre los blancos y las muestras, lo que indicaría que en cierto modo se puede evaluar la toxicidad aguda por metales hacia la bacteria, aunque el medio no sea el ideal.

Por último, es necesario realizar posteriores estudios donde se pueda comparar este bioensayo con otros tipos de bioensayos y verificar si existen correlaciones entre estos. El mismo estudio se podría realizar pero con bacterias terrestres que porten los genes Lux de la *Vibrio fischeri*, por ejemplo, la bacteria *Alcaligenes eutrophus*. Así se podría evaluar la toxicidad aguda que pudiese presentar un residuo industrial sólido al ser dispuesto en un relleno sanitario, pues el ambiente natural del organismo utilizado para el bioensayo es el mismo donde finalmente se disponen este tipo de residuos.

El trabajo de investigación realizado en esta memoria tiene un carácter muy preliminar y abre nuevas inquietudes para trabajos posteriores a fin de optimizar la metodología y evaluar en forma efectiva la toxicidad que pudiesen presentar los RISES sobre organismos vivientes.

## 6.-BIBLIOGRAFIA

- 1- Edición Especial "Residuos Sólidos" El Mercurio 9/6/99
- 2-CD-ROM EPA Solid Waste(SW –846) capítulo 7 tercera revisión 1996
- 3- M. S. Lobos 1999. Desarrollo de Metodologías Analíticas para determinación y especiación de Selenio en Suelos Chilenos. Tesis Doctoral, Universidad Católica de Valparaíso.
- 4- Bastian, K.C. 1998. Microtox™ characterization of foundry sand residuals. Waste Management, 18: 227-234.
- 5- Bois, F.M. 1986. Multiple Regression Analysis of Toxic Interactions: Application to the Microtox Test and General Comments. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36: 707-714.
- 6- Casarini, D.C.P. 1991. Evaluation of toxicity test procedure to define loading rates in a land treatment system. Wat. Sci. Tech., 12: 183-188.
- 7- Gupta, G. 1991. Changes in Poultry Litter Toxicity with Simulated Acid Rain. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 46: 167-172.
- 8- Gupta, G. 1990. Toxicity (EC<sub>50</sub>) comparisios fo some animal wastes. Water, Air, and Soil Pollution 53: 113-117.
- 9- Gupta, G. 1990. Changes in Poultry Litter Toxicity with Time. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44: 579-584.
- 10- Kleinheinz, G.T. 1997. Sampling of air streams and incorporation of samples in the Microtox™ toxicity testing system. Envirom. Toxicol. and Chem., 16(10): 2064-2066.

11- Lawton, L.A. 1990. Use of rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 205-207.

12- May-ming, M. 1990. Assessing the Effectiveness of Depuration of Polluted Clams and Mussels using the Microtox™ Bioassay. *Envirom. Toxicol. and Chem.*, 44: 876-883.

13- Somasundaram, L. 1990. Application of the Microtox System to Asses the Toxicity of Pesticides and Their Hidrolysis Metabolites *Envirom. Toxicol. and Chem.*, 44: 254-259.