



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL – RESIDUOS PELIGROSOS

ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS EMPLEANDO JALES DE LA MINA LA PRIETA, DE
HIDALGO DEL PARRAL, CHIHUAHUA.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
Q. LUIS ALBERTO LOZANO MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. IRMA C. GAVILÁN GARCÍA, FACULTAD DE QUÍMICA
DR. ENRIQUE CESAR VALDEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA

Ciudad Universitaria, México, Cd. Mx., diciembre de 2017

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Enrique César Valdez.

Secretario: Dra. Irma Cruz Gavilán García.

Vocal: M. en E. Patricia Isabel Romero Mares.

1^{er.} Suplente: M.A.I Landy Irene Ramírez Burgos.

2^{d o.} Suplente: Dra. Georgina Fernández Villagómez.

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Facultad de Ingeniería, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

Dra. Georgina Fernández Villagómez

FIRMA

Agradecimientos.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar estos estudios.

Gracias al proyecto PAPIT con número:IN113816

Con el título: Evaluación del nivel de ecotoxicidad de jales mineros de Parral, Chihuahua mediante lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) para su posterior estabilización/solidificación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS.....	8
Resumen.....	10
CAPÍTULO I.INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Justificación	16
1.2Objetivos.....	17
1.3 Hipótesis	18
1.4 Alcances y Limitaciones.....	18
CAPÍTULO 2.MARCO TEÓRICO	19
2.1.1Ecotoxicología	19
2.1.2Estudios ecotoxicológicos.....	20
2.1.3 Evaluaciones en ecotoxicología con <i>Eisenia foetida</i>	22
2.1.Relación concentración-respuesta y CL ₅₀	24
2.1.4 Biodisponibilidad.....	25
2.1.5 Bioaccesibilidad.....	26
2.2 Estudios previos	27
2.2.1 Especiación	27
2.2.2 Especiación de metales y metaloides en muestras de jales mineros de Hidalgo del Parral Chihuahua.....	29
2.2.3 Estudios de difracción de rayos X y pruebas de pH en pasta realizadas en muestras de jales mineros de Hidalgo del Parral, Chihuahua	30
CAPÍTULO 3. MARCO JURÍDICO	31
3.1 Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.....	32
3.2 Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) Última Reforma DOF 24-01-2017.....	32
3.3 Ley para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) 2015 Última Reforma DOF 22-05-2015.....	32
3.4 Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente del Estado de Chihuahua POE 2017.02.22/No.15	33
3.5. Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológicoy laProtección al Ambiente en Materia de Evaluación de Impacto Ambiental Última Reforma DOF 31-10-2014.....	34
3.6. Reglamento de la Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos Última Reforma DOF 31-10-2014.....	34
3.7. Reglamento de Ecología y Protección al Ambiente del Municipio de Hidalgo del Parral, Chihuahua	34

3.8	NOM-141-SEMARNAT-2003, que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales	35
3.9	NOM-147-SEMARNAT-2004. que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio..	39
3.10	NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente	41
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA		44
4.1	Resumen de la metodología	44
4.2	Obtención del material biológico.....	45
4.3	Prueba de humedad en papel filtro	47
4.4	Prueba de contacto en papel filtro.....	48
4.5	Prueba de mortalidad de lombrices de tierra <i>Eisenia foetida</i> con suelo artificial con las sales individuales.....	50
4.6	Prueba de mortalidad de lombrices con suelo artificial con las sales combinadas	52
4.7	Prueba de mortalidad de lombrices con jal minero.....	54
CAPÍTULO. 5 DISEÑO DE EXPERIMENTOS		58
5.1	Datos Categóricos	58
5.2	Variables de respuesta y variables explicativas	58
5.3	Distribucion de probabilidad binomial para datos categóricos.....	58
5.4	Modelos Lineales Generalizados	59
5.5	Componentes de un Modelo Lineal Generalizado.....	59
5.6	GLM para datos binarios	60
5.7	Modelo de probabilidad lineal	61
5.8	Modelo de regresión logística.....	61
5.9	Interpretación de la relación de momio	63
5.10	Estadístico de Hosmer-Lemeshow.....	63
5.11	Devianza	65
5.12	Diseño de experimentos con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> en la prueba de contacto con papel filtro utilizando la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac)	66
5.13	Diseño de experimentos con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> en la muestra de suelo artificial con la sal de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg).....	69

CAPÍTULO 6.RESULTADOS Y SU EVALUACIÓN	72
6.1Resultados de las pruebas presuntivas de humedad con la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	72
6.2Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> aplicando NaAsO ₂ (ac)	74
6.3Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con Pb(NO ₃) ₂ (ac)	80
6.4Resultados de la prueba con suelo artificial con la sal de NaAsO ₂ (mg/kg).....	85
6.5Resultados de la prueba en suelo artificial con Pb(NO ₃) ₂ (mg/kg).....	90
6.6Resultados de la prueba en suelo artificial manteniendo constante la concentración del Pb(NO ₃) ₂ (mg/kg) y variando la concentración de NaAsO ₂ (mg/kg).....	96
6.7Resultados de la prueba con suelo artificial manteniendo constante la concentración de NaAsO ₂ (mg/kg) y variando la concentración de Pb(NO ₃) ₂ (mg/kg)	101
6.8Resultados de las pruebas en muestras de jales de mina la Prieta en Hidalgo del Parral Chihuahua	106
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	109
Referencias.	111
ANEXO 1	115

LISTA DE FIGURAS.

Figura 2.1 Anatomía de una lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> (Capo,2007).	23
Figura 2.2 Relación concentración -respuesta (Díaz, 2004).....	24
Fig. 4.1 Metodología general para los Ensayos Ecotoxicológicos empleando Jales de la Mina la Prieta, de Hidalgo del Parral, Chihuahua.	46
Figura 4.2 Metodología para la prueba de humedad en papel filtro.	56
Figura 4.3 Metodología para la prueba ecotoxicológica en papel filtro.	56
Figura 4.4 Metodología para la prueba ecotoxicológica en muestras de suelo artificial con la sales individuales.	57
Figura 4.5 Metodología para determinar la ecotoxicidad con las sales combinadas.....	57
Figura4.6 Metodología para determinar la ecotoxicidad en muestras de jales mineros.	57
Figura. 5.1 Función de regresión logística creciente.	61
Figura 5.2 Función de regresión logística decreciente.	62
Figuras de la 6.1 a la 6.5 con muestras de agua destilada en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	73
Figuras de la 6.6 a la 6.11 con 5 ml de NaAsO_2 (ac) con diferentes concentraciones y en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	75
Figura 6.12 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> vs concentración de NaAsO_2 (ac) en g/l.....	78
Figuras de la 6.13 a la 6.18 con 5 ml de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (ac) a diferentes concentraciones en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	81
Figura 6.19 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> vs concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (ac) en g/l	83
Figuras de la 6.20 a la 6.24 con muestras de NaAsO_2 (mg/kg) a diferentes concentraciones en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	86
Figura 6.25 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> vs concentración de NaAsO_2 (mg/kg).	89
Figuras de la 6.26 a la 6.30 con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) a distintas concentraciones en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	91
Figura 6.31 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> vs concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) en muestra de suelo artificial.....	94
Figuras de la 6.32 a la 6.36 con NaAsO_2 (mg/kg) a diferentes concentraciones y a un valor constante para $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg)	97
Figura 6.37 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> vs concentración para la sal de NaAsO_2 (mg/kg) y manteniendo constante la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_3$ (mg/kg) en una muestra de suelo artificial	99
Figuras de la 6.38 a la 6.42 con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a diferentes concentraciones y con un valor constante de NaAsO_2 (mg/kg) en una muestra de suelo artificial en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	102
Figura 6.43 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> vs concentración de la sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y manteniendo constante la concentración de NaAsO_2 (mg/kg) en una muestra de suelo artificial.	104
Figuras de la 6.44 a la 6.50 con distintas muestras de jales mineros en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	106

LISTA DE TABLAS.

Tabla 2.1 Método de extracciones secuenciales propuesta por la Comunidad de Referencia Europea.	29
Tabla 3.1 Concentraciones de referencia totales (CRT) por tipo de uso de suelo.....	41
Tabla 3.2 Características de los residuos peligrosos.	42
Tabla 3.3 Límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT.	43
Tabla 4.1 Parámetros a controlar en prueba de humedad en papel filtro	47
Tabla 4.2 Concentraciones de la sal $Pb(NO_3)_2$ (g/l) para la prueba de contacto con papel filtro.	48
Tabla 4.3 Concentraciones de la sal de $NaAsO_2$ (g/l) para la prueba de contacto con papel filtro.	49
Tabla 4.4 Parámetros a controlar para la prueba de contacto en papel filtro.	49
Tabla 4.5 Concentraciones de la sal $NaAsO_2$ (mg/kg) para la prueba en muestra de suelo artificial.....	51
Tabla 4.6 Concentraciones de la sal $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) para la prueba en muestra de suelo artificial.....	51
Tabla 4.7 Parámetros a controlar para la prueba en suelo artificial con las sales individuales.....	52
Tabla 4.8 Concentraciones de las sales a utilizar de $NaAsO_2$ (mg/kg) y de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) para la prueba en muestras de suelo artificial en forma combinada.	53
Tabla 4.9 Parámetros a controlar para la prueba en suelo artificial con las sales de forma combinada.	54
Tabla 4.10 Muestras de jal minero codificadas con HP y su respectivo valor de pH.	55
Tabla 4.11 Puntos de muestreo de los jales mineros y sus respectivas concentraciones del metaloide As y del metal Pb (González, 2016).	55
Tabla 4.12 Parámetros a controlar para la prueba con jal minero.....	56
Tabla 6.1 Resultados de las pruebas presuntivas de humedad con la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	74
Tabla 6.2 Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> aplicando $NaAsO_2$ (ac).	76
Tabla 6.3 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de $NaAsO_2$ (ac).	77
Tabla 6.4 Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> aplicando $Pb(NO_3)_2$ (ac).	81
Tabla 6.5 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de $Pb(NO_3)_3$ (ac)	82
Tabla 6.6 Resultados de la prueba en suelo artificial con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> aplicando la sal de $NaAsO_2$ (mg/kg).	87
Tabla 6.7 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de $NaAsO_2$ (mg/kg)....	88
Tabla 6.8 Resultados de la prueba con suelo artificial en presencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> aplicando $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg).	92
Tabla 6.9 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg)...	93
Tabla 6.10 Resultados de la prueba en suelo artificial manteniendo constante la concentración de $Pb(NO_3)_2$ en 500 mg/kg y variando la concentración de $NaAsO_2$ (mg/kg).	97

Tabla 6.11 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de NaAsO_2 (mg/kg) con un valor constante de 500 (mg/kg) para la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	98
Tabla 6.12 Resultados de la prueba en suelo artificial manteniendo constante la concentración de NaAsO_2 en 50 mg/kg y variando la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en mg/kg.	102
Tabla 6.13 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) con un valor constante de 50 mg/kg para la sal de NaAsO_2 (mg/kg).....	103
Tabla 6.14 Resultados en pruebas ecotoxicológicas con lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> aplicando muestras de jales de mina la Prieta en Hidalgo del Parral Chihuahua.	107

RESUMEN.

Inicialmente en el presente trabajo se realizan una serie de ensayos ecotoxicológicos empleando muestras de jales de la mina La Prieta, de Hidalgo del Parral, Chihuahua con la finalidad de encontrar evidencia ecotoxicológica para futuros estudios de riesgo ambiental de la zona mencionada. El muestreo y recolección de los jales mineros fue realizado anteriormente por González(2016).

Enseguida, en el capítulo 1, se expone la problemática ambiental de los residuos tóxicos generados por los procesos mineros de concentración de minerales (jales) (Rodríguez, 2010) en la mina La Prieta, de Hidalgo del Parral Chihuahua, se menciona la justificación del trabajo, el objetivo general, objetivos específicos, la hipótesis del trabajo, los alcances y las limitaciones.

Asimismo, en el Marco Teórico, se describen los estudios ecotoxicológicos utilizando a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como organismo prueba para aportar información sobre los peligros planteados por la presencia de sustancias tóxicas naturales o antropogénicas en el ambiente (Capó, 2007). También se explican los términos de biodisponibilidad, bioaccesibilidad y concentración letal media (CL₅₀) utilizados en esta tesis. Se hace mención de los estudios previos de especiación (Menchaca, 2015) y de difracción de Rayos X (Barraza, 2015) realizados con jales de la misma zona de estudio.

Posteriormente, en el capítulo 3, se presenta la investigación en cuanto al tema de: prevención y control de la contaminación del suelo incluido en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA), al uso y aprovechamiento de minerales establecido en la Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente del Estado de Chihuahua, a la definición de jales mineros y de presa de jales descrita en la NOM-141-SEMARNAT-2003 y a un procedimiento químico de extracción de los constituyentes del residuo minero para definir su peligrosidad en base a su concentración explicado en la misma norma.

A continuación, en el de Metodología, se explica el trabajo experimental desarrollado para efectuar ensayos ecotoxicológicos con las sales de arsenito de sodio NaAsO_2 (g/l) y de nitrato de plomo (II) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (g/l) de forma individual en un ensayo denominado prueba de contacto con papel filtro. La finalidad de este ensayo es evaluar el comportamiento de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un medio acuoso con las sales mencionadas y considerando su mortalidad, calcular el valor de la CL_{50} para cada sal. También se menciona el desarrollo de la prueba ecotoxicológica en una muestra de suelo artificial con las sales de NaAsO_2 (mg/kg) y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) de forma individual para evaluar la CL_{50} de cada una de estas sales. En seguida se presenta el método propuesto por Braz (2011) para la determinación de la CL_{50} en muestras de mezclas de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con NaAsO_2 , dicho método consiste en tener presentes ambas sales estudiadas en una muestra de suelo artificial manteniendo constante la concentración de una de ellas y variar la concentración de la sal restante.

Con el fin de tener validez estadística, en el capítulo de Diseño de Experimentos, se describe un diseño completamente al azar para asignar a las lombrices de tierra *Eisenia foetida* cada unidad experimental y se explican los términos estadísticos asociados al modelo de regresión logística que es el utilizado en el presente trabajo de tesis para comprobar la dependencia de la mortalidad del organismo estudiado con las concentración de las sales de NaAsO_2 y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

En lo que se refiere a los resultados y su discusión se presenta para cada ensayo ecotoxicológico realizado en esta tesis la evidencia fotográfica del comportamiento de las lombrices de tierra al ser expuestas a las distintas concentraciones de la sal de NaAsO_2 o de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Asimismo, la evidencia fotográfica del comportamiento de las lombrices de tierra al estar en contacto con las muestras de jales mineros. Para cada prueba ecotoxicológica se utiliza el modelo logístico para el cálculo de la CL_{50} de las sales evaluadas y son comparados con los valores reportados en la literatura (considerando que para la mezcla de NaAsO_2 con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no se encontraron estudios ecotoxicológicos realizados previamente) . Se aplica el modelo logístico para rechazar o no rechazar las hipótesis nulas para cada prueba ecotoxicológica planteadas en el capítulo 5 que indican la dependencia de la mortalidad de la lombriz de tierra con las concentraciones de las sales evaluadas.

Finalmente, en el capítulo 7, se presentan las conclusiones en base a los objetivos planteados inicialmente, en cuanto a los estudios ecotoxicológicos realizados a nivel mundial con el uso de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, sobre la legislación referente a jales mineros en México. Y se realiza la comparación de la mortalidad de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* expuestas a las sales de NaAsO_2 y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en muestras artificiales respecto a la presencia del metal Pb y del metaloide As en los jales mineros.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

México se caracteriza por ser un país con una amplia tradición minera dada su diversidad y abundancia en cuanto a minerales se refiere, desde la época prehispánica se le reconocía a esta actividad como un factor de avance económico. La minería a lo largo de la historia de nuestro país ha contribuido a su desarrollo industrial, pues los minerales son utilizados como materias primas en distintas ramas industriales como: la petrolera, la siderúrgica, la química o la de la construcción (Muro, 2013). En la actualidad México forma parte de la lista de los países con mayor producción minera en el mundo, ocupa el primer lugar en la producción de plata a nivel mundial, contribuye con el 4% del producto interno bruto (PIB), al mes de julio del 2015, generó 352 mil 666 empleos directos y más de 1.6 millones de empleos indirectos, de acuerdo al reporte del Instituto Mexicano del Seguro Social (Muro, 2013). El territorio nacional cuenta con ricos depósitos de minerales metálicos en los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Coahuila y San Luis Potosí y según estudios geológicos, se estima que dos terceras partes de la superficie del país presenta condiciones favorables para la actividad minera (Muro, 2013).

Desde la época colonial, el estado de Chihuahua ha sido importante por su producción de minerales metálicos. Se han explotado yacimientos mineros importantes como el de Santa Bárbara, Parral, Santa Eulalia y San Francisco del Oro entre otros. Hidalgo del Parral es una ciudad mexicana del sur del estado de Chihuahua y fue un centro minero en la época del virreinato de la Nueva España. La explotación de la mina La Prieta dio origen a la fundación de la ciudad de Parral, aproximadamente en los años 30 del siglo XX , la mina La Prieta estuvo a cargo de la compañía norteamericana American Smelting Co. a la que se le concesionó la extracción de la plata y de otros minerales y al finalizar su auge minero Parral fue casi completamente abandonada en el año de 1930(Muro, 2013).

Durante la explotación de la mina La Prieta se generaron residuos conocidos como jales, como consecuencia de los procesos de recuperación de metales a partir de los minerales, después de triturar las rocas que los contienen y mezclar las partículas que se forman con agua y con reactivos químicos que facilitan la liberación de los metales. La existencia de

dichos jales a cielo abierto en Hidalgo del Parral representa un posible riesgo a la salud y al medio ambiente que deben evaluarse, mientras que su composición química hace de ellos un residuo tóxico para los organismos vivos (Barraza,2015).

Con más de tres siglos de historia, la minería en Parral trajo consigo un problema ambiental que ha estado latente desde sus inicios de operación, con una producción aproximada de 1500 toneladas de minerales puros al día, los residuos generados a la fecha abarcan un área de aproximadamente 80 hectáreas en cuyo suelo permanecen los jales de más de tres siglos de operación (Lima , 2012).

El principal conflicto ambiental asociado a los jales se relaciona, en las zonas lluviosas, con la dispersión de los mismos hacia su entorno, problemática vinculada con la generación de drenaje ácido, mientras que en las zonas áridas, con su esparcimiento provocado por el viento (Rodríguez, 2010).

Estudios realizados con anterioridad en la zona, evidencian concentraciones de metales pesados en suelo superficial del área poblada, que rebasan los límites establecidos tanto por organismos nacionales como internacionales, lo que hace suponer que los jales de la mina La Prieta son una de las principales fuentes de emisión de los metales encontrados en dichos estudios (Rodríguez, 2010; Barraza , 2015).

Se han identificado al menos 19, 527 ,678 m³ de jales con altos contenidos de plomo en forma de galena (PbS) y arsénico en forma de arsenopirita (FeAsS), como los principales elementos potencialmente tóxicos expuestos al ambiente de la región minera Parral (Gutiérrez, 2007). Los daños a la salud relacionados con estas sustancias van desde cólicos, irritabilidad, dolores musculares hasta cáncer, infertilidad, abortos y perturbaciones al ADN. Para evaluar los efectos tóxicos causados por contaminantes naturales o antropogénicos sobre los organismos vivos presentes en los ecosistemas existen pruebas ecotoxicológicas(Truhaut, 1975). La investigación formal de los efectos adversos de los contaminantes sobre los organismos se inició en la década de los años 30 con el desarrollo de estudios para determinar la relación causa-efecto entre la presencia de contaminantes químicos en el agua y sus efectos biológicos en poblaciones de peces, basándose en pruebas de mortalidad de estos organismos, el término ecotoxicología fue establecido como una extensión natural de la toxicología (que

estudia los efectos de sustancias en organismos individuales) enfocada al estudio de los efectos ecológicos de los contaminantes en los ecosistemas (Moriarty, 2007).

Actualmente los resultados de las pruebas de laboratorio ecotoxicológicas son aceptadas como estimaciones conservadoras de los efectos potenciales de las sustancias en el ambiente y se reconoce su utilidad para los programas de monitoreo ambiental, así como para la regulación de las sustancias debido a que permiten identificar y evaluar los efectos potenciales de los contaminantes generados por actividades industriales o urbanas. Las pruebas ecotoxicológicas integradas con análisis químicos, geológicos y ecológicos, pueden ser utilizadas para determinar índices de calidad ambiental y originar una visión más completa de los efectos adversos que ocasionan los contaminantes sobre los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas y de esta forma contribuir a determinar medidas para proteger al ambiente (Capo, 2007).

Los bioensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de suelos contaminados (Dorn, 2008). La lombriz más utilizada ha sido *Eisenia* en su especie *foetida*, esta especie es exógena en México, pero de amplia distribución, fácil manejo y cultivo (Fragoso, 2012).

El bioensayo ecotoxicológico presentado en esta tesis se encuentra basado en la guía 222 de la OECD del año 2005 así como en experiencias obtenidas a nivel laboratorio (Cuevas, 2006). Los bioensayos con lombrices de tierra pueden llevarse a cabo con las muestras de suelo o con los extractos de los contaminantes.

1.1 Justificación

Las evaluaciones de riesgo y regulaciones referentes a contaminantes están basadas en los valores máximos permitidos de sus concentraciones totales. Como consecuencia, los resultados de las evaluaciones pueden estar fuera de los límites máximos permisibles en sitios contaminados pero no están en forma biodisponible, donde el riesgo puede ser pequeño y llevarse a cabo una medida de remediación con el correspondiente costo económico implicado. (Alexander, 2000). Por ello es importante considerar el concepto de biodisponibilidad en la emisión de normas y leyes ambientales (Adriano, 2004). La biodisponibilidad se define como el grado en que un contaminante presente en el suelo puede ser absorbido y tener un efecto potencialmente tóxico sobre un organismo (Alexander, 2000). Esta biodisponibilidad puede ser valorada por métodos biológicos o pruebas ecotoxicológicas con la exposición de organismos a las diferentes muestras de suelos y posteriormente evaluar sus efectos (Alexander, 2000) .

La evaluación ecotoxicológica con las muestras de jales de la presa de la mina La Prieta en Hidalgo del Parral, Chihuahua, brindará información sobre su biodisponibilidad en las lombrices de tierra *Eisenia foetida* para utilizar este criterio en estudios futuros de evaluaciones de riesgo de la zona de estudio.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Realizar una evaluación ecotoxicológica considerando al metaloide As y al metal Pb presentes en los jales mineros de la zona minera abandonada ubicada en Parral, Chihuahua, utilizando a la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) como organismo de prueba.

1.2.2 Objetivos específicos

- Llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre ecotoxicidad y las evaluaciones ecotoxicológicas en donde se utilice como organismo de prueba a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* consultando medios impresos y electrónicos.
- Realizar una revisión bibliográfica sobre los jales mineros y la legislación de sus impactos a los suelos de México.
- Exponer la lombriz de tierra a las muestras de jales mineros, utilizando diferentes unidades experimentales y considerando un diseño estadístico.
- Exponer la lombriz de tierra a diferentes concentraciones de la sal de nitrato de plomo (II) $Pb(NO_3)_2(ac)$ y de arsenito de sodio $NaAsO_2(ac)$ sobre papel filtro utilizando unidades experimentales separadas, haciendo uso de un diseño estadístico.
- Exponer la lombriz de tierra a diferentes concentraciones de la sal de $Pb(NO_3)_2(ac)$ y de $NaAsO_2(ac)$ utilizando unidades experimentales separadas en una muestra de suelo artificial, haciendo uso de un diseño estadístico.
- Exponer la lombriz de tierra a diferentes concentraciones de la sal de $Pb(NO_3)_2(ac)$ y de $NaAsO_2(ac)$ utilizando unidades experimentales combinadas en una muestra de suelo artificial, haciendo uso de un diseño estadístico.
- Determinar la CL_{50} para las sales de Pb y As empleando el modelo logístico de forma combinada y de forma individual.

1.3 Hipótesis

La exposición de las muestras de jales mineros de la mina La Prieta en Hidalgo del Parral, Chihuahua, a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* pueden causar su mortalidad.

1.4 Alcances y Limitaciones

La ecotoxicidad será evaluada utilizando bioensayos con la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como organismo de prueba, sin embargo, se reconoce con base en la literatura que es difícil extrapolar el resultado a una población humana.

Las sales de NaAsO_2 y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ fueron seleccionadas con base a su solubilidad, con la finalidad de realizar la prueba ecotoxicológica ya que el Pb y el As no están biodisponibles en los jales del sitio de estudio.

CAPÍTULO 2.MARCO TEÓRICO

En el punto 2.1.1 del capítulo 2 se describen los conceptos de ecosistema, contaminación, ecotoxicología, toxicidad, toxicaridad (Moriarty, 2007). En la sección 2.1.2 se presentan los constituyentes de los estudios ecotoxicológicos (Truhaut, 1975). La lombriz de tierra *Eisenia foetida* se expone como organismo de prueba para los bioensayos ecotoxicológicos en el punto 2.1.3. Mientras que el concepto de relación concentración-respuesta y concentración letal media (CL₅₀) se desarrolla en el apartado 2.1.4. Las definiciones de biodisponibilidad y bioaccesibilidad se tratan en los puntos 2.1.5 y 2.1.6 respectivamente. Los estudios previos realizados de especiación química y de difracción de rayos X de las muestras de jales mineros de Hidalgo del Parral Chihuahua se explican en las secciones 2.2.1 y 2.2.2 respectivamente.

2.1.1 Ecotoxicología

Se denomina ambiente no sólo al aire, sino al agua, suelo, alimentos y en resumen a todo lo que rodea la vida del ser humano y a los animales (Capo, 2007).

El ecosistema se define como el conjunto de las condiciones del ambiente, de los organismos y de sus propias interrelaciones. Un ecosistema puede ser equiparado con un ser viviente que tenga un equilibrio biológico potencialmente amenazado por la irrupción no habitual de factores biológicos, químicos y/o físicos (Capo, 2007).

Se entiende por contaminación a esta irrupción de dichos factores en el entorno que puedan afectar las condiciones del conjunto de seres que viven en y del ecosistema.(Barnthouse, 2000). Desde siempre ha existido contaminación en el medio ambiente. Al principio se debía a los fenómenos naturales, como las tormentas de arena, erupciones volcánicas, pero más tarde han sido las actividades humanas las que han empezado a influir considerablemente en la contaminación ambiental. Truhaut en el año de 1975 estableció el término de *ecotoxicología* en sustitución al de *toxicología ambiental*, usada hasta entonces.. La ecotoxicología es definida como la ciencia que estudia la contaminación, su origen, evolución e interacciones con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas, sus acciones y efectos sobre los seres vivos que forman estos ecosistemas (Capo,2007).

La ecotoxicología tiene como materia fundamental de estudio a la contaminación, sobre los sistemas bióticos en forma de toxicidad (Capo, 2007).

En ecotoxicología, los agentes físicos y compuestos químicos se estudian más por su peligrosidad potencial que por su toxicidad relativa, aplicados a determinadas condiciones de exposición, para darles un significado. Por ello, al hablar de nocividad aparte del concepto de toxicidad (propiedad inherente a un agente físico o a un compuesto químico de producir efectos indeseables cuando alcanza una concentración determinada en un lugar de un organismo vivo), se debe tener en cuenta el concepto de toxicaridad, es decir la probabilidad de que se produzca toxicidad, así como el riesgo o peligrosidad, determinado por la probabilidad de que ocurra una acción tóxica (Capo, 2007).

2.1.2 Estudios ecotoxicológicos

Los estudios ecotoxicológicos se componen de tres secuencias (Truhaut, 1975):

I. La liberación del contaminante, abarcando su formación, la génesis de las fuentes de contaminación, los medios y vías de transporte (suelo, aire, agua, alimentos), los factores que influyen en su difusión, sus absorciones geológicas y las posibles alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas debidas a los diversos componentes abióticos del ecosistema, dando lugar a su acumulación o degradación, puesto que siempre debe tenerse presente que las transformaciones de las sustancias químicas están en función del medio que los rodea.

II. El ingreso de los contaminantes en el medio biológico, es decir, su entrada en las cadenas biológicas, alimentarias, de comunidad. Una vez ocurrida la contaminación, el flujo de un contaminante dentro de los ecosistemas está condicionado a varios factores bióticos y abióticos con características que condicionan su disipación, acumulación o destrucción. En los estudios ecotoxicológicos concurren tres componentes íntimamente relacionados: el contaminante, el ambiente y el organismo vivo.

III. Calificación y cuantificación de los efectos patológicos sobre los seres vivos y sus ecosistemas. Constituye la ecotoxicidad propiamente dicha, es decir, la consecuencia de la acción originada por un contaminante sobre los seres vivos que forman los ecosistemas.

Hay que considerar que los ecosistemas naturales son un conjunto armónico consecuente con sus propios equilibrios biológicos, pero las sustancias químicas, en ocasiones pueden perturbar estos equilibrios y trastornar la citada armonía, alterando la capacidad de sobrevivir en las condiciones ecológicas producidas. Ello hace que en la ecotoxicología no sea suficiente la evaluación de la toxicidad que se realiza en la toxicología convencional, ni aun considerando que, en la ecotoxicología, los efectos tienden siempre a ser remotos. Es necesario conocer los datos usuales en toxicología convencional, como son: la toxicidad aguda de una sustancia representada por su CL_{50} , las alteraciones producidas por concentraciones subletales como prototipo de la capacidad de originar toxicidad y su interferencia con el proceso de reproducción en el ámbito de la fecundidad o su influencia en la inducción de cambios en el ADN celular (Capó, 2007).

Capó Martí, en el 2007, menciona que la ecotoxicología tiene una metodología experimental propia para la evaluación de los efectos de los contaminantes, aunque en realidad no está perfectamente confirmado que los microcosmos experimentales demuestren significativas respuestas a los agentes físicos y a las sustancias químicas, pero se considera que son orientativos.

El mismo Capó Martí, (2007) afirma que la ecotoxicología también se caracteriza por llevar a cabo un diagnóstico evaluativo, que tiende a la predicción, y que se fundamente en tres parámetros:

1. La determinación de la concentración del contaminante en el ambiente
2. La evaluación de la carga del contaminante
3. La predicción del riesgo

De forma habitual Capó Martí, (2007), presenta en los estudios ecotoxicológicos el uso de bioindicadores que alertan de posibles perturbaciones e indican la situación de un ecosistema. Su empleo proporciona información rápidamente, cuando se utilizan especies muy sensibles, denominados animales centinela. Como fin primordial la ecotoxicología busca el bienestar del ser humano, por ello, su misión es, tanto informar y alertar de la peligrosidad de las alternativas del desarrollo y de la degradación del medio ambiente, como prevenir, aportando

datos para la toma de decisiones, con arreglo al cociente beneficio/riesgo, que siempre va ligado a la calidad de vida.

La predicción en ecotoxicología se fundamenta sobre el concepto de riesgo. Se define así a la frecuencia esperada de un efecto indeseable por exposición a un contaminante. Sin embargo, teniendo en cuenta que el ecosistema es capaz de regenerarse hasta ciertos límites, es determinante valorar factores como la bioconcentración y la biodegradación aparte de la producción y dispersión del contaminante(Capo, 2007).

2.1.3 Evaluaciones en ecotoxicología con *Eisenia foetida*

Los organismos vivos integran el efecto tóxico causado por la exposición a diferentes contaminantes y responden al efecto adverso de compuestos o mezclas de ellos. Los bioensayos proveen una medida directa de la toxicidad ambiental en sitios contaminados respecto a los análisis químicos porque integran la respuesta de factores ambientales con los factores tóxicos de los contaminantes. Los métodos de pruebas estandarizadas para la evaluación de compuestos tóxicos en suelos se han desarrollado desde los años 80 y muchos de ellos se han basado en la prueba desarrollada en 1984 por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE). Dentro de estos trabajos, los organismos de prueba que más se han utilizado para evaluar efectos agudos y crónicos de los compuestos tóxicos en suelos son: lombrices, enquitreidos (nematodos), colémbolos (cochinillas) y ácaros predadores. De igual forma, se ha propuesto la caracterización ecotoxicológica sobre diferentes niveles tróficos, en donde se recomienda utilizar un organismo detritívoro, un productor, un consumidor primario y un consumidor secundario (ISO, 2001).

Se considera que las lombrices son organismos de prueba útiles para monitorear la toxicidad que provocan varios compuestos o xenobióticos, incluyendo metales pesados, plaguicidas, contaminantes orgánicos, mezclas complejas y desconocidas de contaminantes en suelos (Capo, 2007).

Las especies de lombriz comúnmente utilizadas son *Eisenia foetida* y *Eisenia andrei*. Estas son lombrices composteras que requieren un alto contenido de materia orgánica, son de fácil manejo y crianza y actualmente son cosmopolitas. Los efectos causados por compuestos tóxicos en *Eisenia foetida* y *Eisenia andrei* son relativamente bien conocidos, dado que se han realizado pruebas con estas lombrices por más de dos décadas (Jansch, 2005). Por lo tanto *E. foetida* y *E. andrei* se han convertido en invertebrados detritívoros modelo para evaluar efectos de xenobióticos en suelos (Capo , 2007).

La principal característica morfológica de la lombriz de tierra *Eisenia Foetida* es la presencia de segmentos externos e internos en su cuerpo, son hermafroditas y cuando son adultas se observa una protuberancia epidérmica denominada cítelos, ver figura 2.1 (Capo , 2007).

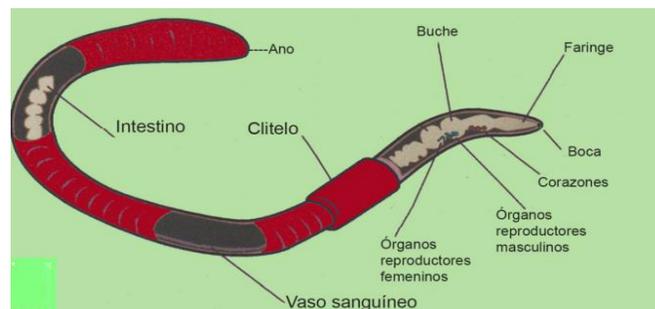


Figura 2.1 Anatomía de una lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Capo,2007).

En el cítelos se forman los capullos en los cuales son depositados los huevos. Esta especie se desarrolla bien en un intervalo de pH de 5 a 7, a temperatura de 20 a 28°C (Kaplan, 1980).

Una de las características de las lombrices de tierra incluyendo a la *Eisenia foetida* es que son capaces de acumular metales pesados en sus cuerpos a partir del suelo disminuyendo de esta forma la toxicidad de un suelo contaminado (Jaian, 2004).

El vermicomposteo constituye una forma especial de compostaje debido a que es alcanzado cuando las lombrices de tierra metabolizan y excretan una mezcla de suelo y materia orgánica. En el aparato digestivo de estas lombrices, los microorganismos son responsables de transformar compuestos orgánicos (proteínas, ácidos nucleicos, grasas, carbohidratos) a un producto más estable denominado vermicompostaje. En el proceso del vermicomposteo

se presume que las lombrices de tierra son útiles para limpiar el suelo de varios contaminantes como los metales pesados (Pereira, 2003).

El vermicomposteo es una de las mejores formas para disponer los residuos, no sólo debido a su capacidad de reducirlos, sino también a su habilidad para remediar un suelo contaminado (Edwards, 1992).

Una forma de determinar niveles aceptables de contaminantes en el suelo consiste en la aplicación de las pruebas de ecotoxicidad. Una serie de bioensayos aceptados internacionalmente para evaluar la toxicidad se han desarrollado por la Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica. (OCDE, 1984).

2.1.Relación concentración-respuesta y CL_{50}

Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como relación concentración-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por los contaminantes en el ambiente. La figura 2.2 muestra un patrón no rectilíneo de la relación concentración-respuesta (Díaz, 2004).

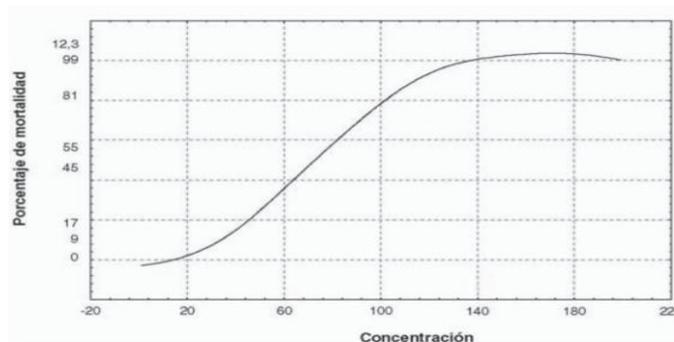


Figura 2.2 Relación concentración -respuesta (Díaz, 2004).

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador

comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la concentración del contaminante en el alimento, suelo, aire, agua que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. La CL_{50} es la concentración que mata al 50% de la población.

En ellas, la estadística desempeña un papel importante no sólo para su cálculo, sino para la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad y para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en ellas (Díaz, 2004).

Díaz (2004) detalla que para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la concentración y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación. Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación concentración-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y a continuación utilizar el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable *concentración* del tóxico que causan un grado de efecto en particular sobre los organismos expuestos. Entre estas concentraciones la más utilizada como ya se mencionó anteriormente es la CL_{50} . La selección del método a utilizar para estimar dicho valor dependerá de qué tan bien las concentraciones caracterizan al CL_{50} . En el trabajo presente se utiliza el modelo logístico descrito en el capítulo de diseño de experimentos para la determinación del valor de la CL_{50} .

2.1.4 Biodisponibilidad

Numerosos estudios han mostrado que los efectos biológicos no se encuentran relacionados con la concentración total de un contaminante y que los organismos responden solamente a una fracción de la sustancia que resulta ser biológicamente disponible para dicho organismo (término denominado como biodisponibilidad)(Harmsen, 2007).

Las evaluaciones de riesgo y regulaciones referentes a contaminantes están basadas en los valores máximos permitidos de sus concentraciones totales.

Como consecuencia los resultados de las evaluaciones pueden ser alarmantes en sitios contaminados donde el riesgo puede ser pequeño y llevar a cabo una medida de remediación con el correspondiente costo económico implicado(Alexander, 2000). Por ello es importante considerar a la biodisponibilidad en la emisión de normas y leyes ambientales(Adriano, 2004).

La biodisponibilidad se define como el grado en que un contaminante presente en el suelo puede ser absorbido o adsorbido y tener un efecto potencialmente tóxico sobre un organismo (Alexander, 2000). Esta definición tiene tres niveles de información: disponibilidad ambiental, biodisponibilidad ambiental y biodisponibilidad toxicológica (Harmsen, 2007).

Las cuales se define a continuación:

De acuerdo a estos autores la disponibilidad ambiental es la proporción de un contaminante que está sujeta a las influencias físicas, químicas y biológicas del medio.

La biodisponibilidad ambiental es la fracción de un contaminante que un organismo acumula cuando entra en contacto con el medio.

La biodisponibilidad toxicológica es la fracción de la concentración de un contaminante que es absorbida o adsorbida por un organismo, es distribuida dentro de él y finalmente alcanza los receptores donde presenta su acción tóxica (Harmsen, 2007).

La fracción biodisponible de elementos químicos en suelos depende de sus propiedades y del comportamiento de los organismos estudiados (Harmsen, 2007).

La biodisponibilidad puede ser valorada por métodos biológicos con la exposición de organismos a las diferentes muestras de suelos y posteriormente evaluar sus efectos (Alexander, 2000) .

2.1.5 Bioaccesibilidad

El termino bioaccesibilidad de un metal representa a la fracción de un contaminante que después de la ingesta por un organismo vivo, es movilizada hacia sus fluidos gástricos (Jager, 2003).En el caso de un ser humano la liberación de la fracción bioaccesible ocurre en el espacio grastrointestinal, en el proceso de la digestión, quedando potencialmente disponible para su posterior absorción intestinal. La bioaccesibilidad de metales u otros contaminantes,

desde suelos o sedimentos, es altamente dependiente del pH de los diferentes órganos del tracto gastrointestinal (Jager, 2003). Son muchos los estudios que han buscado desarrollar y validar sustitutos de los fluidos del tracto gastrointestinal. La mayoría de los fluidos estomacales desarrollados se asemejan en su contenido a ácido clorhídrico HCl(ac) a pH de 1.5, sumado a algunos aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y sales (Jager, 2003).

Para el caso de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* la liberación de la fracción bioaccesible ocurre de la misma forma en su aparato digestivo, en una estructura denominada como molleja donde el contaminante es degradado por el uso de enzimas y microorganismos (Jager, 2003).

2.2 Estudios previos

2.2.1 Especiación

A continuación se hace referencia al trabajo de tesis de Evaluación de la contaminación del suelo por arsénico (As) y plomo (Pb) en la zona minera de Parral Chihuahua mediante espectroscopia de Absorción Atómica (Menchaca, 2015), donde se realizó una investigación de la especiación de metales y metaloides. Enseguida se redacta parte de su investigación y resultados obtenidos para el estudio de especiación extraída de su tesis.

El propósito de las investigaciones actuales sobre contaminación del medio ambiente se centra en desarrollar nuevos métodos analíticos, no sólo con la finalidad de determinar únicamente el contenido total de los elementos si no con el objetivo de conocer sus especies químicas para comprender las reacciones químicas o bioquímicas en las que intervienen y por ende obtener información relativa a su carácter tóxico. Por ello, la determinación de la concentración total de un metal sólo proporciona una explicación incompleta del posible impacto ambiental que puede producir en el medio en el que se encuentra (Templeton, 2000).

Los trabajos de Menchaca (2015), presentan a la especiación de metales y metaloides y cita que la determinación de la concentración total de un metal no da una valoración apropiada del impacto causado y que por lo tanto es necesario realizar estudios de especiación para obtener información más específica sobre su biodisponibilidad.

Por otra parte, Galán & Romero (2000), encontraron que la especie química depende de una serie de parámetros tales como: pH, capacidad de intercambio, condiciones redox, salinidad, y de la presencia de: materia orgánica, carbonatos, minerales de arcilla, hidróxidos y óxidos de Fe y Mn.

La especiación de elementos potencialmente tóxicos en el suelo es de gran interés, debido a los diferentes niveles de toxicidad exhibidos por las distintas especies. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada define el término especie química como la forma específica de un elemento determinada por su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación y su estructura molecular (Templeton, 2000).

Cuando la especiación no es factible, entonces se usa el término de fraccionamiento: proceso de clasificación de un analito o un grupo de analitos de una muestra determinada de acuerdo a sus parámetros físicos (por ejemplo, tamaño, solubilidad) o propiedades químicas (por ejemplo, tipo de enlace, reactividad) (Templeton, 2000).

Para realizar la especiación de metales o metaloides se utilizan técnicas de extracción secuencial, es decir se aplican diversos tipos de extractantes sucesivamente a la muestra, cada uno siendo más drástico en la acción química o de naturaleza diferente a la anterior (Templeton, 2000).

Uno de los principales esquemas de extracción secuencial es el propuesto por la Oficina de Comunidades de Referencia Europea (Rauret, 1999) y utilizado por Menchaca en el 2015.

En la tabla 2.1 se indica el procedimiento de extracciones secuenciales realizados por Menchaca (2015) para la especiación de As y Pb en las muestras de presas de jales mineros de Hidalgo de Parral, Chihuahua.

Tabla 2.1 Método de extracciones secuenciales propuesta por la Comunidad de Referencia Europea.

Etapa.	Fracción.	Fase Objetivo.	Reactivos.
1	Intercambiable/Soluble en ácido y agua.	Especies solubles. Carbonatos.	CH ₃ CO ₂ H 0.1 M , pH = 3.59
2	Reducible.	Oxi/ hidróxidos de Fe y Mn.	NH ₂ -OH HCl 0.5 M pH=2
3	Oxidable.	Materia orgánica. Sulfuros.	H ₂ O ₂ 8.8 M seguido de CH ₃ CO ₂ NH ₄ , 1.0 M, pH = 2
4	Residual.	Aluminosilicatos.	Agua regia.

2.2.2 Especiación de metales y metaloides en muestras de jales mineros de Hidalgo del Parral Chihuahua

Menchaca en el año 2015 realizó la especiación del metaloide arsénico de las muestras de la presa de jales en Hidalgo del Parral, Chihuahua, mostrando que la mayor parte del arsénico se encuentra presente en la fracción 3 (oxidable) y la fracción residual, estas fracciones se caracterizan por tener baja movilidad en el suelo y por lo tanto la probabilidad de tener efectos adversos por biodisponibilidad es baja. El 90 % del metaloide se encuentra en la fracción residual, unida a los aluminosilicatos, siendo la fracción más estable en la que se encuentra el arsénico.

En el caso del plomo los resultados de especiación obtenidos Menchaca, (2015) muestran que el plomo y las muestras de la presa de jales en Hidalgo del Parral, Chihuahua contienen más del 70 % del metal repartido entre la fracción 1 (intercambiable) que puede ser liberado mediante procesos de intercambio iónico y reemplazado por sales que se encuentran en el medio y la fracción 2 (reducible). Este resultado sugiere que la movilidad y biodisponibilidad del metal es alta presentando un potencial de riesgo de tener efectos adversos a la salud y al ambiente.

2.2.3 Estudios de difracción de rayos X y pruebas de pH en pasta realizadas en muestras de jales mineros de Hidalgo del Parral, Chihuahua

Barraza, (2015) realizó una prueba con las muestras de jales mineros denominada pH en pasta que se aplica para estimar si una sustancia es capaz de formar aguas ácidas y liberar sustancias tóxicas al ambiente, de acuerdo con este estudio las muestras analizadas no presentan un riesgo inmediato para liberar elementos potencialmente tóxicos, dado que el medio donde se encuentran los minerales se mantiene de forma alcalina.

Los estudios de difracción de rayos X realizados por (Barraza, 2015) revelaron la presencia de Pirita (FeS_2) en un porcentaje que ronda entre el 1 al 3 % causante de drenaje ácido de mina, el cual produce un descenso en el pH del agua y aumenta la solubilidad de los elementos potencialmente tóxicos como son los metales pesados.

También demostraron la presencia de minerales tampón como la Calcita (CaCO_3) y de los silicatos: albita ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$), caolinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$), moscovita ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$), sericita ($(\text{KNa,Ca})\text{Al}_2(\text{SiAl})_4\text{O}_{11}$) y los feldespatos potásicos (KAlSi_3O_8) que ayudan a neutralizar la acción de los generadores de ácido.

CAPÍTULO 3. MARCO JURÍDICO

En el punto 3.1 del capítulo 3 se describe el artículo 27 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos referente al dominio de recursos naturales de la nación. En el punto 3.2 se menciona la prevención y control de la contaminación del suelo contenida en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA). En la sección 3.3 en la Ley para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) se establece la competencia y regulación federal de los residuos de la industria minera-metalúrgica. En el apartado 3.4 se especifican las competencias de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en la Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente del Estado de Chihuahua referentes al aprovechamiento de minerales o sustancias no reservadas a la Federación. En el punto 3.5 se establece la autorización en materia de impacto ambiental para la explotación de minerales en el Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. En la sección 3.6 se establece la competencia federal de los residuos mineros en el Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. En el apartado 3.7 se mencionan las acciones a seguir para la prevención y control de la contaminación de los suelos estipulados en el Reglamento de Ecología y Protección al Ambiente del Municipio de Hidalgo del Parral, Chihuahua. En el punto 3.8 se ilustran las definiciones de presas y de jales mineros de acuerdo a la NOM-141-SEMARNAT-2003 y se establece un procedimiento que consta de dos métodos para determinar la peligrosidad de los jales, el primero se basa en la extracción de los constituyentes tóxicos del jal minero y el segundo en evaluar el potencial de generación de drenaje ácido para jales que contienen sulfuros de metales. En el punto 3.9 se establecen las concentraciones de referencia totales para los metales o metaloides por arriba de las cuales un suelo puede representar un riesgo para la salud de las personas acorde a la NOM-147-SEMARNAT-2004. En el punto 3.10 se presentan las características que hacen a un residuo peligroso y también se define cuando un residuo es tóxico para el ambiente acorde a la NOM-052-SEMARNAT-2005.

3.1 Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

El artículo 27 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos establece que corresponde a la nación el dominio directo de todos los recursos naturales de la plataforma continental, de todos los minerales o sustancias que se encuentren en vetas, mantos, masas o yacimientos.

3.2 Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) Última Reforma DOF 24-01-2017

En el capítulo 4 de la LGEEPA correspondiente a la prevención y control de la contaminación del suelo en el artículo 134 se establece que:

- I. Corresponde al estado y a la sociedad prevenir la contaminación del suelo.
- II. Deben ser controlados los residuos en tanto que constituyen la principal fuente de contaminación de los suelos.
- III. En los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos deberán llevarse a cabo las acciones necesarias para recuperar o restablecer las condiciones de tal manera que puedan ser utilizadas en cualquier tipo de actividad prevista por el programa de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable.

3.3 Ley para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) 2015 Última Reforma DOF 22-05-2015

En el Título Tercero denominado Clasificación de los residuos, artículo 17, se establece que los residuos de la industria minera-metalúrgica provenientes del minado y tratamiento de minerales como jales mineros son de regulación y competencia federal, pudiéndose disponer en el sitio de generación y su manejo integral estará sujeto a los planes previstos en esta Ley.

3.4 Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente del Estado de Chihuahua POE 2017.02.22/No.15

En el Capítulo 2 Artículo 123 de la Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente del Estado de Chihuahua se establece que, para el aprovechamiento de los minerales o sustancias no reservadas a la Federación, que constituyan depósitos de naturaleza semejante a los componentes de los terrenos, tal como rocas que sólo puedan utilizarse para la fabricación de materiales para la construcción u ornamento, corresponde a la Secretaría:

- I. Su regulación a través de las normas oficiales que expida la Federación, las Normas Técnicas Ecológicas Estatales y el reglamento de esta Ley.
- II. Otorgar la autorización para realizar las actividades de exploración, explotación y aprovechamiento de estos recursos. La autorización sólo se otorgará con la opinión favorable del municipio de que se trate.
- III. Prevenir que dichas actividades se lleven a cabo, sin causar daños al equilibrio ecológico y al medio ambiente, logrando que:
 - A) El aprovechamiento sea racional.
 - B) Se eviten daños o afectaciones al bienestar de las personas.
 - C) Se eviten graves alteraciones topográficas.

Artículo 124. Corresponde a los municipios:

- II. Participar con el Estado en la vigilancia de las actividades de exploración, explotación y aprovechamiento de estos recursos.

Artículo 125. Quienes pretendan realizar actividades de aprovechamiento de minerales o sustancias no reservadas a la federación, estarán obligados a:

- I. Controlar la emisión o el desprendimiento de polvos, humos o gases que puedan afectar los ecosistemas, zonas y bienes de competencia local.
- II. Controlar los residuos y evitar su diseminación fuera de los terrenos en los que se lleven a cabo dichas tareas.

III. Restaurar y, en su caso reforestar las áreas utilizadas, una vez concluidos los trabajos de aprovechamiento respectivos, para restituirles su estado original o mejorarlo de ser posible.

3.5. Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Evaluación de Impacto Ambiental Última Reforma DOF 31-10-2014

En el capítulo II, artículo 5, se establece que quienes pretendan llevar a cabo alguna de las siguientes obras o actividades: exploración, explotación y beneficio de minerales y sustancias reservadas a la federación, requerirán previamente la autorización de la Secretaría en materia de impacto ambiental. El beneficio de minerales y la disposición final de los residuos en presas de jales, excluyendo las plantas de beneficio que no utilicen sustancias consideradas como peligrosas, también requerirá la respectiva autorización en materia de impacto ambiental.

3.6. Reglamento de la Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos Última Reforma DOF 31-10-2014

En el Título Tercero denominado Residuos provenientes de la industria minero-metalúrgica se establece en el artículo 32 que los residuos provenientes de los procesos metalúrgicos son de competencia federal. El artículo 32 menciona la obligación de los responsables de generar residuos mineros de manejarlos de acuerdo a planes en modalidades previstas en el reglamento presente. El artículo 34 define el sitio de generación como el predio donde se desarrolla el proceso que da lugar a los residuos, así como también aquel en el que se encuentren las instalaciones.

3.7. Reglamento de Ecología y Protección al Ambiente del Municipio de Hidalgo del Parral, Chihuahua 2002

En el Capítulo V, relativo a la contaminación del suelo y del subsuelo, en el artículo 331 se establece que para prevenir y controlar la contaminación del suelo y del subsuelo, corresponderá al ayuntamiento en el ámbito de su respectiva competencia vigilar y controlar que:

I. No se acumulen, depositen o infiltren residuos o sustancias en el suelo o subsuelo sin el tratamiento previo respectivo y en sitios que no reúnan las condiciones técnicas necesarias para prevenir y evitar su contaminación y debidamente autorizados, de acuerdo a la legislación y normatividad ambiental aplicables.

II. El funcionamiento de los sistemas de recolección, almacenamiento, transporte, alojamiento, reúso, reciclaje, tratamiento y disposición final de residuos sólidos municipales se lleven a cabo conforme a los lineamientos y disposiciones que emita la autoridad municipal, así como a la normatividad ambiental correspondiente.

III. El manejo de los materiales y residuos peligrosos se lleva a cabo conforme a lo dispuesto en los artículos 150 al 153 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y la normatividad aplicable, así como a las disposiciones y restricciones de las correspondientes autorizaciones, debiendo en todo momento hacerlo del conocimiento de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente para que aplique las medidas de seguridad y sanciones cuando fueren procedentes, así como la interposición de las denuncias ante la autoridad competente.

En el artículo 334 párrafo V se establece que, para prevenir y controlar la contaminación del suelo y subsuelo, el Municipio, en coordinación en su caso con otras dependencias estatales, deberá realizar al menos el programa: para la recuperación de suelos contaminados por la presencia de materiales de cualquier tipo, de tal manera que puedan ser integrados a los planes y programas de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulten aplicables.

3.8 NOM-141-SEMARNAT-2003, que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales

En la presente norma se menciona que las presas de jales son uno de los sistemas para la disposición final de los residuos sólidos generados por el beneficio de los minerales y deben reunir condiciones de máxima seguridad, a fin de garantizar la protección de la población,

las actividades económicas y sociales y en general el equilibrio ecológico. Por sus características tóxicas, determinadas por su composición u oxidación y por su forma de manejo, pueden representar un riesgo para el equilibrio ecológico, el ambiente y la salud de la población en general, debido a lo anterior es necesario establecer criterios y procedimientos para su correcta disposición.

Los jales mineros son definidos como residuos sólidos generados en las operaciones primarias de separación y concentración de minerales. Una presa de jales es definida como una obra de ingeniería para el almacenamiento o disposición final de los jales, cuya construcción y operación ocurren simultáneamente. En la sección 5.7 de la NOM-141-SEMARNAT-2003 se establecen los criterios de postoperación de las presas de jales mineros, establecidos de la siguiente forma: una vez que el depósito de jales llegue al final de su vida útil se deben implementar medidas que aseguren que:

- a) No se emitan partículas sólidas a la atmósfera como producto de la pérdida de humedad de la superficie de la presa de jales.
- b) No se formen escurrimientos que afecten a cuerpos de agua superficiales y subterráneos.
- c) No falle la presa de jales.

Cuando los jales sean generadores potenciales de ácido se debe cumplir con los siguientes aspectos:

- Cubrir con un material mineral o con agua, para evitar la formación de drenaje ácido del jal, cuidando de no solubilizar otros elementos tóxicos.
- No se deben utilizar especies que promueven la acidificación del sustrato.
- Cuando no sea pertinente establecer medidas que eviten la formación de drenaje ácido, se deben establecer medidas de tratamiento del mismo para evitar daños en cuerpos de agua, suelos y sedimentos, ya sea por su acidez o por contaminación con elementos tóxicos.
- La superficie del depósito debe ser cubierta con el suelo recuperado, de ser el caso o con materiales que permitan la fijación de especies vegetales.

- Las especies vegetales que se utilicen para cubrir el depósito deben ser originarias de la región para garantizar la sucesión y permanencia con un mínimo de conservación.

En la citada norma se establece un método que consta de dos procedimientos para evaluar la peligrosidad de los residuos mineros; el primero se basa en la extracción del constituyente tóxico y en determinar su movilidad en agua, conforme a la “Prueba para realizar la extracción de metales y metaloides en jales, con agua en equilibrio con CO₂” el segundo consiste en definir el potencial de generación de drenaje ácido de acuerdo con la “Prueba de Balance Ácido-Base para jales que contienen sulfuros de metales”.

Para el desarrollo de la evaluación de la peligrosidad de los jales, se deben considerar los siguientes aspectos:

- Definición de las diferentes menas del yacimiento.
- Definición del proceso de beneficio.
- Manejo del jal en la presa.

Las muestras de jales aplicables para la evaluación pueden originarse de:

- Pruebas piloto en proyectos nuevos o de incorporación de nuevas reservas, o
- Muestras provenientes de la operación diaria de la planta de beneficio actual de la unidad minera.

Prueba de extracción de constituyentes tóxicos.

La técnica propuesta es la referida a la “Prueba para realizar la extracción de metales y metaloides en jales, con CO₂”, procedimiento que utiliza como extractante agua destilada en equilibrio con CO₂ en condiciones estándar (ácido carbónico, pH= 5.5) preparada al momento de su uso.

En el extracto obtenido se cuantificarán los metales y metaloides regulados en la NOM-052-SEMARNAT-2005 mediante los métodos de “Espectroscopia de emisión atómica acoplada a plasma” y “Métodos de absorción atómica”.

La toxicidad de los metales y metaloides (MM) en jales no depende de su concentración total sino de la concentración de la fracción extraíble bajo condiciones ambientales. La fracción extraíble es la que puede representar un riesgo ambiental, ya que es móvil en el ambiente.

También se considera a esta fracción extraíble como una medida indirecta de la fracción biodisponible, ya que reacciona fácilmente dentro de los organismos vivos.

Aplicaciones y limitaciones.

- Este método permite obtener rápidamente un extracto acuoso para estimar la disponibilidad de MM presentes en los jales, bajo condiciones de laboratorio especificadas en esta Norma. No pretende simular el tipo de lixiviado que se produce bajo condiciones específicas de campo.
- Este método busca simular las condiciones de extracción, cuando la composición de los minerales de los jales, es el factor que determina el pH del extracto.
- La extracción acuosa señalada en este método refleja la capacidad amortiguadora de los jales, ya que el pH final del extracto acuoso es el resultado de la interacción del extractante con los minerales de los jales que producen reacciones ácidas o básicas.
- El extracto obtenido es adecuado para cuantificar los MM; sin embargo, dado que generalmente las concentraciones solubles de estos elementos son bajas, es de especial importancia tomar precauciones durante el almacenaje y manejo de las muestras para evitar su contaminación.
- El extracto no es adecuado para medir los contaminantes orgánicos o compuestos volátiles de naturaleza inorgánica.

Si al aplicar la prueba anterior la concentración en el extracto de uno o varios de los elementos listados en la tabla 3.3 referente a los constituyentes tóxicos en el extracto PECT y obtenida de la NOM-052-SEMARNAT-2005 es superior a los límites permisibles señalados en la misma, los jales son peligrosos por su toxicidad.

Prueba de evaluación del potencial de generación de ácido prueba estática.

Esta prueba tiene el propósito de caracterizar la peligrosidad de los jales por su reactividad. Consiste en definir el balance entre los minerales potencialmente generadores de ácido y aquéllos potencialmente consumidores, para determinar la capacidad neutralizante neta de los constituyentes del jal, bajo la base de la "Prueba de Balance Ácido-Base para jales que contienen sulfuros de metales".

La peligrosidad de los jales debida a su reactividad está determinada por la oxidación de los sulfuros, que ocurre cuando los jales que contienen sulfuros metálicos son expuestos al aire y agua. El producto de la oxidación de los sulfuros metálicos es ácido sulfúrico, que si no es neutralizado por minerales con una reacción básica, produce drenaje ácido (DA) que contiene disueltos metales y metaloides potencialmente tóxicos.

La capacidad de los jales para generar DA depende del balance entre los minerales productores potenciales de ácido (sulfuros) y los minerales consumidores potenciales de ácido (carbonatos, hidróxidos y aluminosilicatos).

3.9 NOM-147-SEMARNAT-2004. que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio

El desarrollo de actividades económicas de manera no sustentable, ha contribuido a la emisión de compuestos potencialmente tóxicos que, bajo ciertas condiciones y concentraciones, pueden tener efectos nocivos a la salud de la población y afectaciones al equilibrio ecológico y el ambiente.

Las formas de producción utilizadas en el pasado y la escasez de especificaciones ambientales en materia de suelos han generado la aparición de sitios contaminados, los que se han constituido en pasivos ambientales y causado la incertidumbre de los particulares en cuanto a las acciones que se deben llevar a cabo para remediar un sitio. En el año 1988, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) estableció unos criterios interinos para llenar este vacío de la normatividad ambiental, sin embargo, estos criterios interinos no tienen la formalidad jurídica para hacerlos realmente aplicables.

En virtud de que los elementos regulados pueden estar presentes en el suelo de manera natural y en ocasiones en concentraciones tales que pueden representar un riesgo para la salud de la población humana o de los ecosistemas, es importante establecer criterios para determinar la contaminación antropogénica en suelos y en su caso las concentraciones de remediación. En

el ámbito internacional estos criterios toman como base las evaluaciones de riesgo a la salud o ambiental.

En virtud del tipo y dimensiones de las áreas afectadas, y con la finalidad de atender situaciones específicas, la Norma se estructuró considerando dos escenarios: a) Extensión afectada menor o igual a 1000 m², b) Extensión afectada mayor a 1000 m². El primer escenario aplica generalmente para accidentes, emergencias o eventos de contaminación que deben resolverse inmediatamente y que, de acuerdo con la experiencia registrada por las empresas, en la mayoría de los casos el área contaminada es menor a los 1000 m².

En el segundo escenario, que aplica generalmente a eventos contaminantes que se presentan de manera deliberada o fortuita, continua o súbita, en extensiones mayores a los 1000 m², es necesario conocer cómo se presentó el derrame, descarga, filtración, depósito o transferencia del contaminante al suelo y de éste a algún receptor. Para ello se debe desarrollar un modelo conceptual que permita identificar la presencia de población humana potencialmente expuesta, las fuentes de contaminación, los mecanismos de liberación y de transporte de los contaminantes, las rutas y vías de exposición, así como establecer el área de estudio.

Con base al modelo conceptual se debe determinar la existencia, origen, naturaleza y extensión de la contaminación por uno o más de los siguientes elementos: arsénico, mercurio, plomo, bario, berilio, cromo hexavalente, así como los receptores potenciales de la contaminación, el modelo conceptual debe determinar lo siguiente: la fuente de contaminación del suelo, los mecanismos de liberación de los contaminantes, los mecanismos de transporte, las rutas de exposición, las vías de exposición. El proceso concluye en el momento en que se determina la concentración objetivo, o cuando de conformidad con lo que se establece en la NOM-147-SEMARNAT-2004, no sea necesario llevar a cabo la remediación.

Un suelo puede representar un riesgo para la salud de las personas, cuando al menos una de las concentraciones de los elementos regulados se encuentre por arriba de las concentraciones de referencia totales establecidas en la Tabla 3.1 Cuando las concentraciones iniciales sean menores o iguales a las concentraciones de referencia, se considerará que el suelo no requiere remediación.

Tabla 3.1 Concentraciones de referencia totales (CRT) por tipo de uso de suelo.

Contaminante.	Uso agrícola/residencial/comercial. (mg/kg)	Uso industrial. (mg/kg)
Arsénico.	22	250
Bario.	5400	67000
Berilio.	150	1900
Cadmio.	37	450
Plata.	390	5100
Plomo.	400	800
Selenio.	390	5100
Talio.	5.2	67
Vanadio.	78	1000

NOTA:

a. En el caso de que se presenten diversos usos del suelo en un sitio, debe considerarse el uso que predomine.

b. Cuando en los programas de ordenamiento ecológico y de desarrollo urbano no estén establecidos los usos del suelo, se usará el valor residencial.

Para determinar la concentración objetivo con población humana potencialmente expuesta el responsable debe efectuar un muestreo exploratorio conforme se establece en la NMX-AA-132-SCFI-2006 Muestreo de Suelos para la Identificación y la Cuantificación de Metales y Metaloides y Manejo de la Muestra. Cuando las concentraciones iniciales totales son mayores a las concentraciones de referencia totales la persona física o moral responsable de la contaminación debe elegir la concentración objetivo de la remediación que se establece como aquella concentración total de los contaminantes que debe ser igual o inferior a las concentraciones de referencia de la Tabla 3.1.

3.10 NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente

En la NOM-052-SEMARNAT-2005 se establece que los residuos peligrosos, en cualquier estado físico, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, inflamables, tóxicas, y biológica-infecciosas, y por su forma de manejo pueden representar un riesgo para el

equilibrio ecológico, el ambiente y la salud de la población en general, por lo que es necesario determinar los criterios, procedimientos, características y listados que los identifiquen. Los avances científicos y tecnológicos y la experiencia internacional sobre la caracterización de los residuos peligrosos han permitido definir como constituyentes tóxicos ambientales, y crónicos a aquellas sustancias químicas que son capaces de producir efectos adversos a la salud o al ambiente. El residuo es peligroso si presenta al menos una de las características indicadas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Características de los residuos peligrosos.

CARACTERISTICAS.
Corrosividad (C).
Reactividad (R).
Explosividad (E).
Toxicidad al Ambiente (T).
Inflamabilidad (I).
Biológico Infecciosas (B)

En la NOM-053-SEMARNAT-2005 se enlistan los límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT indicados en la tabla 3.3 que hacen peligroso a un contaminante o a un jal minero por su toxicidad al ambiente.

Tabla 3.3 Límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT.

Contaminante.	Límite Máximo Permisible (mg/l).
Arsénico.	5.0
Bario.	100.0
Cadmio.	1.0
Cromo Hexavalente.	5.0
Níquel.	5.0
Mercurio.	0.2
Plata.	5.0
Plomo.	5.0
Selenio.	1.0

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

En el punto 4.1 del capítulo 4 se presenta el resumen de la metodología que incluye la prueba por contacto con papel filtro y las pruebas con suelo artificial y muestras de jal minero utilizadas en este trabajo de tesis y presentadas de forma esquemática en la Fig. 4.1. En el apartado 4.2 se describe la procedencia y las condiciones de aclimatación dentro del Laboratorio de Ingeniería Ambiental para las lombrices de tierra utilizadas en las pruebas ecotoxicológicas. En la sección 4.3 se describe la prueba de humedad en papel filtro con la finalidad de conocer el volumen optimo a utilizar en las pruebas de contacto con papel filtro y se expone en la Fig. 4.2 su esquema correspondiente. En el punto 4.4 se redacta el desarrollo para la prueba de contacto en papel filtro considerando a las concentraciones de las sales de NaAsO_2 (g/l) y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (g/l) reportadas en la literatura mientras que en la Fig. 4.3 se describe su esquema correspondiente. La prueba de mortalidad con las lombrices de tierra en suelo artificial con las sales mencionadas en forma individual es ilustrada en el apartado 4.5 y presentada de forma resumida en la Fig. 4.4 mientras que la misma prueba pero con las sales en forma combinada es descrita en la sección 4.6 y esquematizada en la Fig. 4.5 Finalmente la descripción del ensayo ecotoxicológico para los jales mineros se presenta en el punto 4.7 y se muestra de forma condensada en la Fig. 4.6.

4.1 Resumen de la metodología

El ensayo descrito en la presente tesis se encuentra explicado en la guía 207 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para la evaluación de sustancias (OCDE, 1984). Dicho ensayo incluye dos clases de pruebas toxicológicas:

- 1) Prueba por contacto con papel filtro
- 2) Prueba con suelo artificial y muestras de suelo contaminado o de jal minero.

La prueba por contacto en papel filtro es utilizada como preliminar para evaluar el comportamiento de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* en contacto con las sales estudiadas.

La prueba por contacto en papel filtro involucra la exposición de las lombrices a las sustancias de prueba por separado: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2(\text{ac})$ y $\text{NaAsO}_2(\text{ac})$ sobre un papel filtro húmedo. En la prueba con suelo artificial se exponen las lombrices de tierra a concentraciones conocidas de las sustancias $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2(\text{ac})$ y $\text{NaAsO}_2(\text{ac})$ sobre una muestra de suelo artificial de forma individual y posteriormente en una segunda prueba con la mezcla de las sustancias con la finalidad de evaluar su mortalidad al término de 14 días. Cuando se exponen las lombrices de tierra a las muestras de jal minero también se evalúa su mortalidad al término de la prueba. En la figura 4.1 se presenta la metodología general de todo el estudio.

4.2 Obtención del material biológico

Para llevar a cabo los diferentes tipos de bioensayos se utilizaron lombrices adultas del género *Eisenia foetida* de al menos 2 meses de edad (con cítelos). Las lombrices se obtuvieron del criadero de un productor de lombricomposta en Tláhuac, Ciudad de México, se les trasladó al laboratorio con suficiente sustrato orgánico proveniente del mismo sitio de cultivo, para su posterior adaptación.

Enseguida se sometieron a un periodo de aclimatación durante 4 meses en las instalaciones de la Secretaría de Posgrado e Investigación de la Facultad de Ingeniería de la UNAM, específicamente en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental, donde se colocaron en un contenedor de plástico con orificios en su parte superior para la oxigenación de las lombrices y orificios también en su parte inferior con la finalidad de evitar encharcamientos de agua al momento de humectar a las lombrices y con humus proveniente de la lombricomposta de Tláhuac. Por otro lado, se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) se cubrió con tela negra el contenedor de plástico logrando el correcto desarrollo de los organismos y su reproducción. Así mismo se alimentaron cada 2 semanas con residuos orgánicos de lechuga, papaya, cáscaras de naranja, cáscaras de chícharos y cáscaras de aguacate, administrando el mismo tipo de alimento, con una humedad que se mantuvo en 50%, el pH con valor de 7.

En la figura 4.1 se presenta la metodología general para llevar a cabo el presente trabajo de tesis

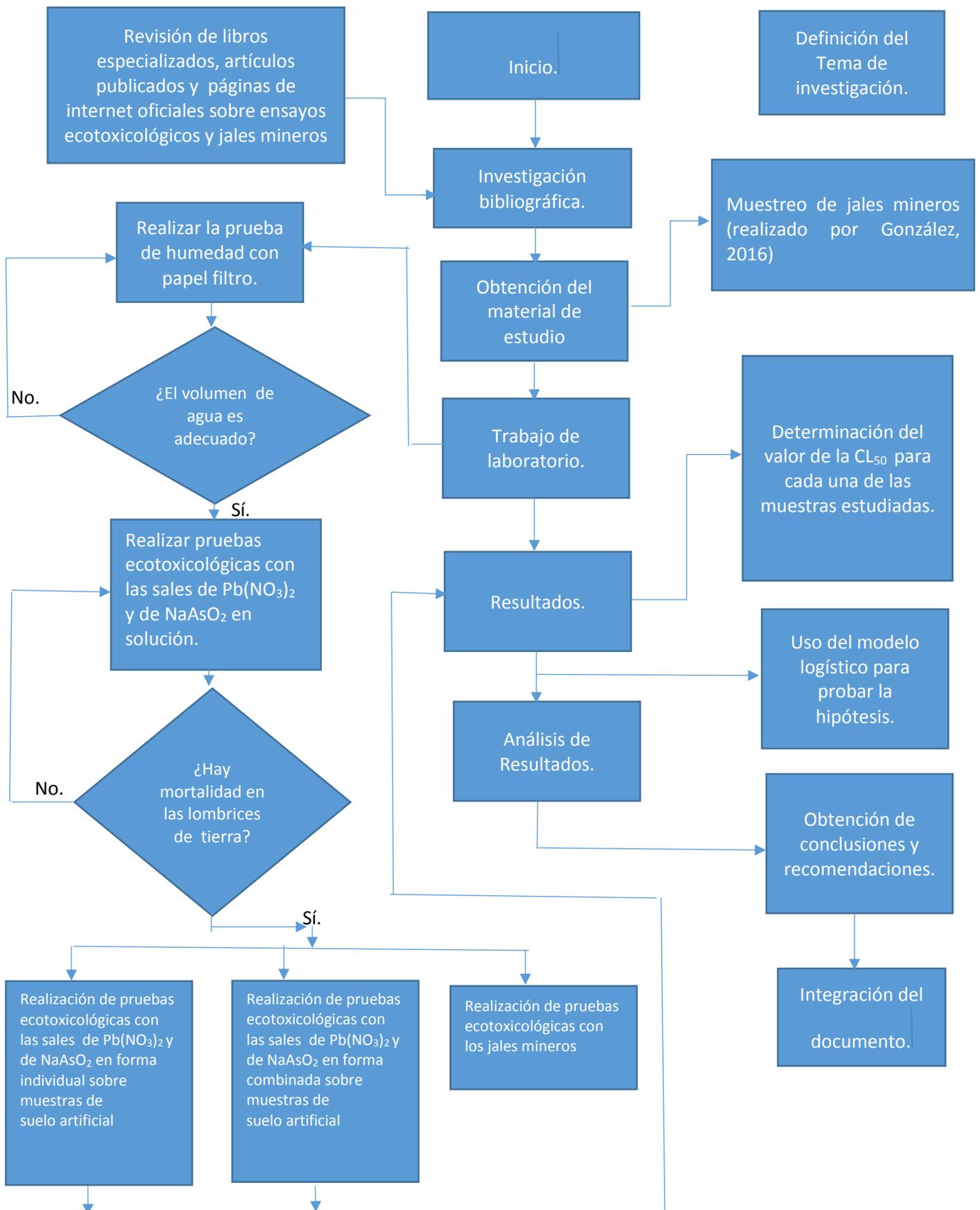


Fig. 4.1 Metodología general del trabajo de tesis *Ensayos Ecotoxicológicos empleando Jales de la Mina la Prieta, de Hidalgo del Parral, Chihuahua.*

4.3 Prueba de humedad en papel filtro

La prueba de contacto con papel filtro es un bioensayo agudo y determina el efecto del compuesto tóxico mediante la concentración letal (CL₅₀) de las sustancias a probar, éste puede afectar a la lombriz por ingestión o por contacto, a través de la piel o causar su muerte. Para llevar a cabo esta prueba se realizó una prueba previa de humedad con papel filtro, para lo cual se prepararon 5 cajas Petri con diferentes cantidades de agua (de 1 a 5 ml) colocando una lombriz en cada una de ellas y se taparon con tela negra durante un periodo de 48 horas con una intensidad de luz de 780 lux (OECD, 1984) proporcionada por una lámpara fluorescente de 39 watts presente en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental; terminado el tiempo se observó en qué cajas de Petri las lombrices evadieron el medio o no se encontraron sobre el papel filtro y se determinó la cantidad de agua al adicionar en la prueba de contacto que corresponde a la mínima cantidad de agua en donde no se presentó mortalidad de la lombriz ni evadieron el medio logrando una exposición correcta del organismo al contaminante. Con esta prueba se determinó el volumen de agua a utilizar en la prueba de contacto. En la tabla 4.1 se indican los parámetros a controlar para el citado experimento.

Tabla 4.1 Parámetros a controlar en prueba de humedad en papel filtro.

Parámetro.	Valor.
Duración del bioensayo.	48 horas.
Temperatura.	22°C +/- 2°C.
Iluminación	780 lux.
Contenedores de prueba.	Cajas de Petri de plástico.
Especie de prueba.	Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> .
Edad del organismo al inicio de la prueba.	Más de 2 meses (con presencia de citelio)
Régimen	Sin alimento.
Respuesta a medir.	Evasión de la especie de prueba sobre el medio expuesto.
Vol. de agua utilizado.	1 a 5 ml de agua destilada.

4.4 Prueba de contacto en papel filtro

Se utilizaron cajas Petri donde se colocó el papel filtro impregnado con el agente tóxico cubriendo completamente la superficie interna de cada caja. El papel se impregnó con 1 ml de la solución de la sal del metal a evaluar $Pb(NO_3)_2(ac)$ o $NaAsO_2(ac)$ y las concentraciones correspondientes para dejar secar a temperatura ambiente. Después de secado el papel filtro, se adicionó a cada una de las cajas 1 ml de agua destilada. Se realizó un blanco el cual consistió de papel filtro humedecido con 1 ml de agua destilada. Las soluciones y concentraciones utilizadas en los bioensayos se encuentran en la tabla 4.2 y se basaron en las concentraciones reportadas por Neuhauser, (2000), para el caso de la sal de plomo en pruebas agudas sobre papel filtro con una duración de 48 horas. Para el caso de la sal de arsénico, se procedió a tomar como referencia las concentraciones publicadas por Pallavi, (2013) en pruebas agudas sobre papel filtro con una duración de 24 horas y en conjunto con bioensayos realizados en el laboratorio se determinaron las concentraciones reportadas en la tabla 4.3.

Es importante mencionar que experimentalmente se verificó que a la mayor concentración de las sales a evaluar se presentó la mortalidad total de las lombrices de tierra y a la menor concentración su no mortalidad, lo anterior es un requisito para realizar los ensayos ecotoxicológicos (Díaz,2004).

Tabla 4.2 Concentraciones de la sal $Pb(NO_3)_2$ (g/l) para la prueba de contacto con papel filtro.

Número de prueba.	Concentración de $Pb(NO_3)_2$ (g/l)
1	3
2	2
3	1
4	0.5
5	0.25

Tabla 4.3 Concentraciones de la sal de NaAsO_2 (g/l) para la prueba de contacto con papel filtro.

Número de prueba.	Concentración de NaAsO_2 (g/l).
1	0.6
2	0.4
3	0.3
4	0.2
5	0.1

Posteriormente se colocó lombriz por lombriz en cada caja Petri (las cuales estaban perforadas por la parte superior y cubiertas con *manta cielo* con la finalidad de mantener la humedad y oxigenación de la lombriz de tierra). Las cajas Petri se colocaron en forma horizontal y fueron iluminadas con una lámpara fluorescente a una intensidad de 780 lux a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un periodo de 48 horas para el caso de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2(\text{ac})$ y de 24 horas para la sal de $\text{AsNaO}_2(\text{ac})$.

Finalmente, se realizaron un total de 4 repeticiones y un blanco por cada concentración, los signos de toxicidad que se desarrollaron durante la exposición se determinaron a las 48 horas. Las lombrices se consideraron muertas cuando no respondieron a ningún estímulo mecánico inmediato. Una vez realizada la prueba, la CL_{50} del metal probado se determinó mediante el modelo logístico. En la tabla 4.4 se indican los parámetros a controlar para el experimento realizado.

Tabla 4.4 Parámetros a controlar para la prueba de contacto en papel filtro.

Parámetro.	Valor.
Duración del bioensayo.	48 horas para la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2(\text{ac})$ y 24 horas para la sal de $\text{AsNaO}_2(\text{ac})$.
Temperatura.	$22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.
Iluminación	780 lux.
Contenedores de prueba.	Cajas de Petri de plástico.
Especie de prueba.	Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> .
Edad del organismo al inicio de la prueba.	Más de 2 meses (con presencia de citelio)
Régimen	Sin alimento.
Respuesta a medir.	Mortalidad de la especie de prueba.

4.5 Prueba de mortalidad de lombrices de tierra *Eisenia foetida* con suelo artificial con las sales individuales

Este bioensayo es una prueba aguda con exposición de 14 días, que determina el efecto del compuesto tóxico mediante la CL_{50} donde se observa la mortalidad de los organismos para cada concentración de la sal estudiada a evaluar.

A continuación, se describe la técnica: se realizó la prueba por cuadruplicado más un blanco, en este bioensayo se colocaron las lombrices de tierra en cajas de Petri (perforadas por la parte superior y cubiertas con *manta cielo* con la finalidad de mantener la humedad y la oxigenación de la lombriz de tierra) donde se aplicó el suelo artificial contaminado.

Inicialmente en una caja de Petri se depositaron 50 g de suelo proveniente de los viveros de Xochimilco, Ciudad de México, se utilizó como suelo artificial ya que está compuesto de arena (70%), roca volcánica denominada como perlita (10%) y de compost (20%), el suelo fue homogeneizado anteriormente a través de una malla de tamiz No. 20.

Se vertió sobre el suelo artificial una solución acuosa con la sal de los metales a evaluar ya sea de $Pb(NO_3)_2(ac)$ o de $NaAsO_2(ac)$ a diferentes concentraciones, las cuales se seleccionaron basándose en Zhifeng, et al (2016), diferenciándose de las utilizadas por Pallavi (2013) y por Neuhauser (2000) y se encuentran reportadas en la tabla 4.5 y 4.6.

A continuación, se procedió a agregar la cantidad de agua destilada para alcanzar el 45 % de humedad verificada con el detector de humedad (modelo ks-d1) marca Delmhorst colocando los electrodos en el suelo artificial previamente compactado durante 15 minutos.

El valor que recomienda la OCDE (1984) en el % de humedad es del 35 al 45 %.

Posteriormente se midió el pH con el medidor digital de pH marca Spear dando un valor de 7.2. En seguida se depositaron 6 lombrices maduras citeleadas por caja de Petri.

La prueba tuvo una duración de 14 días y al término de ese periodo se llevaron a cabo las evaluaciones de mortalidad. La mortalidad se evaluó cuando el organismo no respondió a estímulos mecánicos suaves.

Al término de 14 días de exposición se determinó la CL_{50} de los metales probados mediante el modelo logístico. En la tabla 4.7 se indican los parámetros a controlar durante el experimento citado.

Tabla 4.5 Concentraciones de la sal $NaAsO_2$ (mg/kg) para la prueba en muestra de suelo artificial.

Número de Prueba.	Concentración de $NaAsO_2$(mg/kg)
1	500
2	400
3	300
4	200
5	100
6	50

Tabla 4.6 Concentraciones de la sal $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) para la prueba en muestra de suelo artificial.

Número de prueba.	Concentración de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg)
1	4000
2	3000
3	2000
4	1000
5	500

Tabla 4.7 Parámetros a controlar para la prueba en suelo artificial con las sales individuales.

Parámetro.	Valor.
Duración del bioensayo.	14 días.
Temperatura.	22°C +/- 2°C.
Iluminación	780 lux.
Humedad del suelo	45 %
pH del suelo	7.2
Contenedores de prueba.	Cajas de Petri de plástico.
Especie de prueba.	Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> .
Edad del organismo al inicio de la prueba.	Más de 2 meses (con presencia de citelio)
Régimen	Sin alimento.
Respuesta a medir.	Mortalidad de la especie de prueba.

4.6 Prueba de mortalidad de lombrices con suelo artificial con las sales combinadas

Nuevamente se realizó el mismo procedimiento que en las muestras de suelo artificial individual sólo que al momento de colocar las sales de NaAsO_2 (mg/kg) en la muestra de suelo artificial basadas en (Zhifeng, et al., 2016) se mantuvo una concentración constante de 500 mg /kg para el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ tomando en cuenta que a esta concentración en el bioensayo individual para la sal de plomo no se presentaron efectos en la lombriz de tierra. Dicho procedimiento para la evaluación de mezclas binarias se encuentra reportado en (Braz, 2011). El intervalo de concentraciones utilizadas se enlista en la tabla 4.8.

También en una segunda prueba se colocaron las sales de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) en la muestra de suelo artificial basadas en (Zhifeng, et al., 2016) y se mantuvo una concentración constante de 50 mg /kg para la sal de NaAsO_2 tomando en cuenta que a esta concentración en el bioensayo individual para la sal de arsénico no se presentaron efectos en la lombriz de tierra. Dicho procedimiento para la evaluación de mezclas binarias se encuentra reportado en (Braz, 2011). Las concentraciones utilizadas se enlistan en la tabla 4.8.

Por otro lado, se colocó un control con 6 lombrices de tierra *Eisenia foetida* en una muestra de suelo artificial impregnándola con la cantidad de agua destilada necesaria para obtener una humedad al 45% (verificada con el medidor de humedad marca Delmhorst) sobre una

caja de Petri perforada por la parte superior. Al final se midió el pH de las muestras de suelo con el medidor digital de pH marca Spear dando un valor de 7.2.

La prueba tuvo una duración de 14 días y al término de ese periodo se llevaron a cabo las evaluaciones de mortalidad. La mortalidad se evaluó cuando el organismo no respondió a estímulos mecánicos suaves. En la tabla 4.9 se enlistan los parámetros a controlar durante la prueba mencionada.

Al término de 14 días de exposición se determinó la CL₅₀ de los metales probados mediante el modelo logístico.

Tabla 4.8 Concentraciones de las sales a utilizar de NaAsO₂ (mg/kg) y de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) para la prueba en muestras de suelo artificial en forma combinada.

Número de prueba.	Concentración de NaAsO₂(mg/kg) manteniendo constante en 500 (mg/kg) la concentración de Pb(NO₃)₂.	Concentración de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) manteniendo constante en 50(mg/kg) la concentración de NaAsO₂.
1	300	3000
2	200	2000
3	100	1000
4	50	500
5	25	250

Tabla 4.9 Parámetros a controlar para la prueba en suelo artificial con las sales de forma combinada.

Parámetro.	Valor.
Duración del bioensayo.	14 días.
Temperatura.	22°C +/- 2°C.
Iluminación	780 lux.
Humedad del suelo	45 %
pH del suelo	7.2
Contenedores de prueba.	Cajas de Petri de plástico.
Especie de prueba.	Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> .
Edad del organismo al inicio de la prueba.	Más de 2 meses (con presencia de citelio)
Régimen	Sin alimento.
Respuesta a medir.	Mortalidad de la especie de prueba.

4.7 Prueba de mortalidad de lombrices con jal minero

Este bioensayo es una prueba aguda con exposición de 14 días, que determina el efecto del compuesto tóxico mediante la CL₅₀ donde se observa la mortalidad de los organismos. Las concentraciones de As y de Pb de las muestras de jales mineros se encuentran reportadas en la tabla 4.4 y 4.5, respectivamente. A continuación, se describe la técnica basada en la guía 207 de la OCDE para la evaluación de sustancias (OCDE, 1984). La técnica indica que se realice la prueba por cuadruplicado más un blanco consistente en una caja de Petri con una muestra de suelo artificial con una lombriz de tierra, en este bioensayo se colocó una lombriz de tierra en cada caja de Petri donde se aplicó el jal minero.

En un inicio se pesaron 50 g de una muestra de jal minero y se homogenizó a través de una malla de tamiz de No. 20. Se humedeció el jal minero con agua destilada hasta alcanzar un valor de 45%. Para la determinación de la humedad de dicho jal se utilizó el detector de humedad (modelo ks-d1) marca Delmhorst colocando los electrodos de humedad sobre el jal minero previamente compactado durante 15 minutos.

Posteriormente se midió el pH de cada punto muestreado de los jales mineros con el medidor digital de pH marca Spear y se registraron los valores en la tabla 4.10. Se depositó 1 lombriz de tierra *Eisenia foetida* madura por caja de Petri. La prueba tuvo una duración de 14 días y

en ese periodo se llevaron a cabo las evaluaciones de mortalidad. La mortalidad se evaluó cuando el organismo no respondió a un estímulo mecánico suave.

Los valores de las concentraciones del metaloide As y del metal Pb determinadas por González (2016) se encuentran en las tablas 4.11.

En la tabla 4.12 se indican los parámetros a controlar durante la citada prueba.

Tabla 4.10 Muestras de jal minero codificadas con HP y su respectivo valor de pH.

Clave de la muestra.	pH
HP2	7.6
HP3	7.3
HP5	7.7
HP7	7.4
HP16	7.6
HP17	7.7

Tabla 4.11 Puntos de muestreo de los jales mineros y sus respectivas concentraciones del metaloide As y del metal Pb (González, 2016).

Clave de la muestra.	Concentración en ppm (mg/kg) de As.	Concentración en ppm (mg/kg) de Pb
HP2	624.74	4525.54
HP3	202.5	3012.94
HP5	501.93	2880
HP7	499.19	4762.31
HP16	545.16	3205.23
HP17	659.51	2896.9
BLANCO	25.09	97.35

Tabla 4.12 Parámetros a controlar para la prueba con jal minero.

Parámetro.	Valor.
Duración del bioensayo.	14 días.
Temperatura.	22°C +/- 2°C.
Iluminación	780 lux.
Humedad del suelo.	45 %
Contenedores de prueba.	Cajas de Petri de plástico.
Especie de prueba.	Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> .
Edad del organismo al inicio de la prueba.	Más de 2 meses (con presencia de citelio)
Régimen.	Sin alimento.
Respuesta a medir.	Mortalidad de la especie de prueba.

La metodología para los ensayos ecotoxicológicos descrita anteriormente se presenta esquemáticamente en las figuras 4.2 a 4.6.

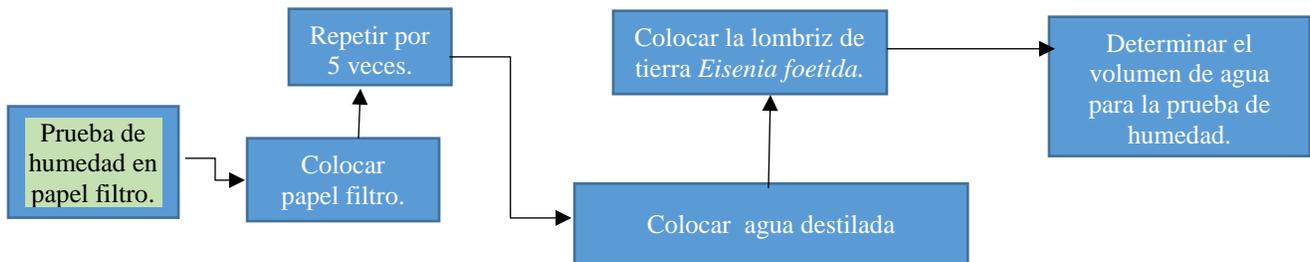


Figura 4.2 Metodología para la prueba de humedad en papel filtro.

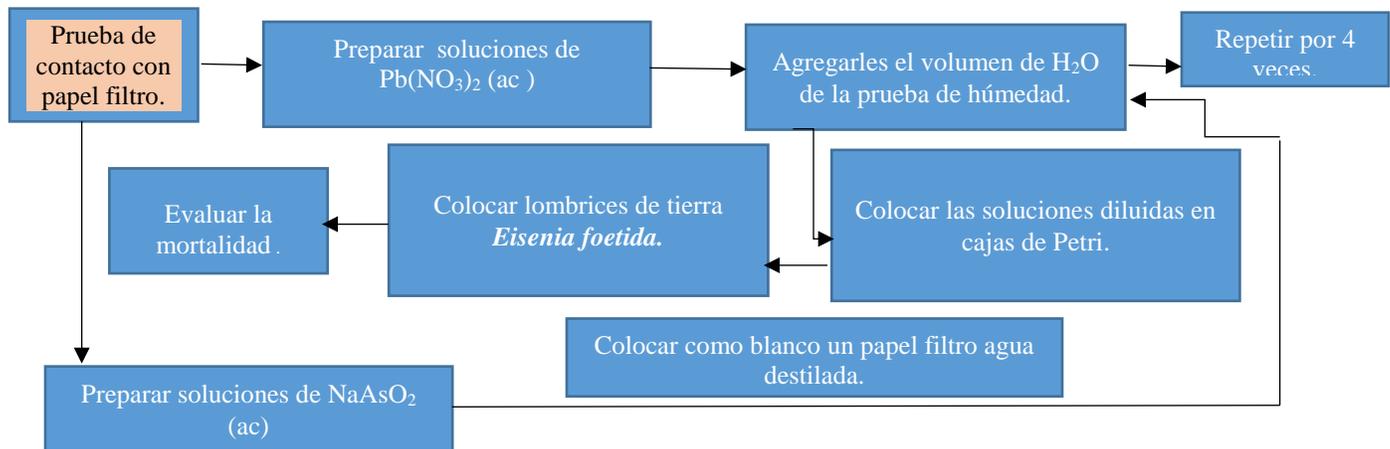


Figura 4.3 Metodología para la prueba ecotoxicológica en papel filtro.

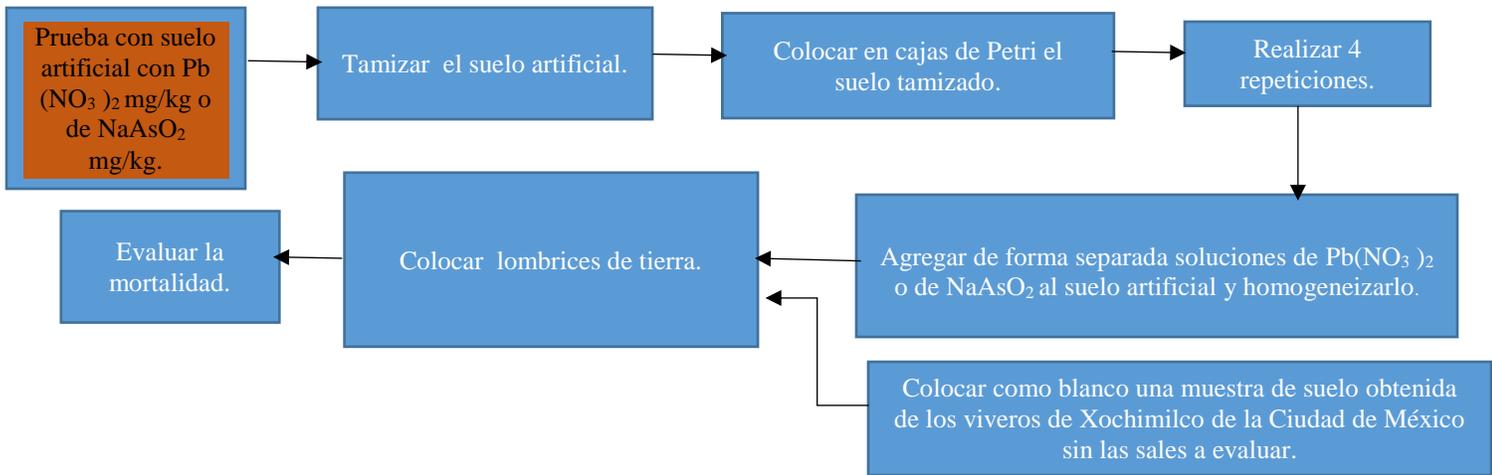


Figura 4.4 Metodología para la prueba ecotoxicológica en muestras de suelo artificial con la sales individuales.

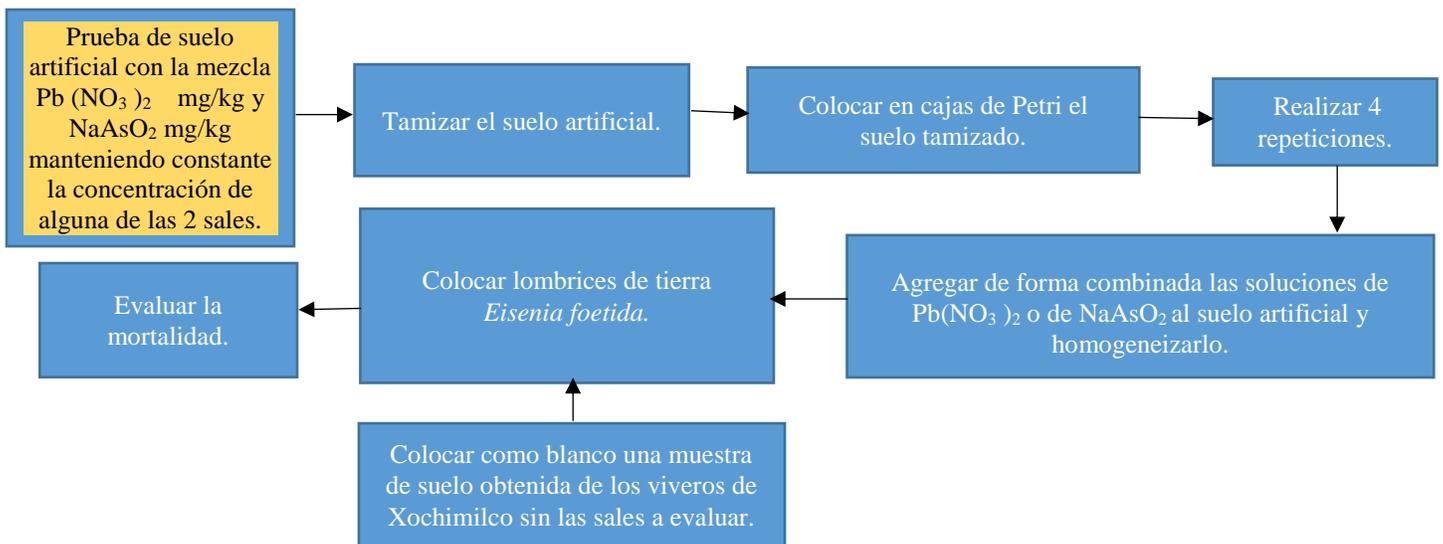


Figura 4.5 Metodología para determinar la ecotoxicidad con las sales combinadas.

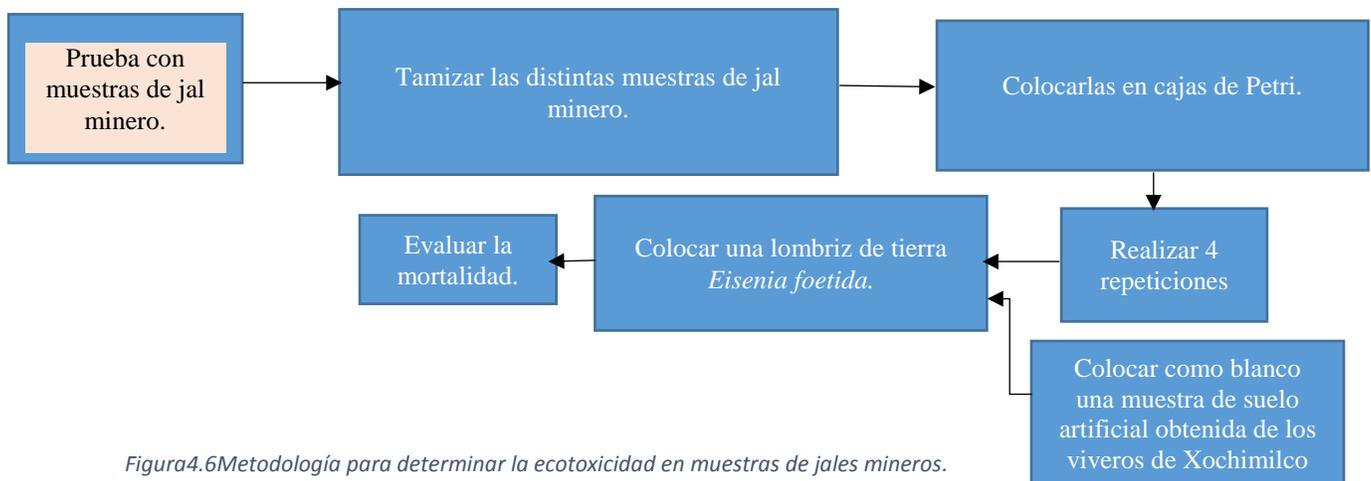


Figura 4.6 Metodología para determinar la ecotoxicidad en muestras de jales mineros.

CAPÍTULO. 5 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En el capítulo presente se describen los términos necesarios para establecer el diseño completamente al azar para la asignación de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* a cada tratamiento. También se presentan los conceptos empleados para el desarrollo del modelo de regresión logística. En seguida se explica el diseño de experimentos para los bioensayos realizados y mencionados a continuación: prueba con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (ac) en papel filtro, prueba con NaAsO_2 (ac) en papel filtro, prueba con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) en muestra de suelo artificial, prueba con NaAsO_2 (mg/kg) en muestra de suelo artificial, prueba con la mezcla de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) y NaAsO_2 (mg/kg) y ensayo con las muestras de jales mineros.

Finalmente se establece el uso del modelo de regresión logística para el cálculo de la CL_{50} para las sales estudiadas. Y se comprueba si existe dependencia entre mortalidad de las lombrices de tierra con las concentraciones dadas del metaloide As o del metal Pb presentes en las muestras artificiales y de jales mineros. Se presentan las pruebas de bondad de ajuste utilizadas para comprobar la bondad del ajuste.

5.1 Datos Categóricos

Una variable categórica está basada en una escala de categorías, por ejemplo para el caso de clasificación de gravedad en una lesión la clasificación sería: ninguna, media, moderada o severa. Otro ejemplo consiste en la etapa de una enfermedad que puede ser clasificada como inicial o avanzada (Agresti, 2007).

5.2 Variables de respuesta y variables explicativas

La variable de respuesta se le conoce como dependiente, generalmente se le denota como Y. Mientras que a la variable explicativa se le denomina como independiente, y se le denota como X.

5.3 Distribucion de probabilidad binomial para datos categóricos

El análisis estadístico inferencial requiere utilizar una distribución de probabilidad para la variable de respuesta. Para el caso de los datos categóricos se utiliza a la distribución binomial. Este tipo de datos resultan de un número m de ensayos independientes e idénticos con 2 posibles resultados ya sea de éxito o fracaso. Ensayos idénticos significa que la

probabilidad de éxito es la misma para cada ensayo. Ensayo independiente se refiere a que el resultado de un ensayo no afecta al resultado de otro. Cada ensayo tiene una distribución de Bernoulli. Se le asigna el símbolo π a la probabilidad de éxito de un ensayo dado. La letra Y representa el número de éxitos dentro de los m ensayos. Bajo la suposición de m ensayos independientes e idénticos, Y tiene una distribución binomial con parámetros m y π . En la ecuación 5.1 se escribe la distribución binomial (Agresti, 2007).

$Y \sim \text{bin}(m, \pi)$ si:

$$P(Y=y) = \frac{m!}{y!(m-y)!} \pi^y (1-\pi)^{m-y}, \quad y = 0, 1, 2, \dots, m \dots \text{Ecuación 5.1}$$

5.4 Modelos Lineales Generalizados

Los modelos lineales generalizados cuyo acrónimo es GLM se aplican para los datos categóricos y un caso especial de ellos es el modelo de regresión logística que es desarrollado en el punto 5.9.

5.5 Componentes de un Modelo Lineal Generalizado

Un modelo lineal generalizado tiene 3 componentes: el componente aleatorio que es identificado como la variable de respuesta Y con su respectiva distribución de probabilidad, un componente sistemático que establece las variables explicativas para el modelo y finalmente una función de enlace que especifica el valor esperado para Y . A continuación son descritos cada uno de estos componentes con más detalle (Agresti, 2007).

Componente Aleatorio: el componente aleatorio de un GLM identifica la variable de respuesta Y y selecciona una distribución de probabilidad para ella. También manifiesta las observaciones de Y como: Y_1, \dots, Y_n . En muchas aplicaciones las observaciones de Y son de carácter binario ya sea un éxito o un fracaso. En general cada Y_i puede ser el número de éxitos en un cierto número fijado de ensayos. En nuestro caso, se asume una distribución binomial para Y .

Componente Sistemático: el componente sistemático de GLM especifica las variables explicativas que son las x_j en la ecuación 5.2. Dichas variables son conocidas como

predictores en el GLM. La combinación lineal de las variables explicativas es denominado predictor lineal.

$$\alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k \dots \text{ Ecuación 5.2}$$

Función de enlace: indica el valor esperado para la variable de respuesta Y , es una función que relaciona los componentes aleatorios con los componentes sistemáticos. La función de enlace más sencilla es $g(\mu) = \mu$ que se enuncia en la ecuación 5.3. Dicha ecuación es la forma de un modelo regresión ordinario para respuestas continuas.

$$\mu = \alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k \dots \text{ Ecuación 5.3}$$

Otro tipo de función enlace corresponde a $g(\mu) = \log(\mu)$ que modela el logaritmo de la media. Un GLM que utiliza el log de una función de enlace es conocido como un modelo log lineal y tiene la forma de la ecuación 5.4.

$$\log(\mu) = \alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k \dots \text{ Ecuación 5.4}$$

5.6 GLM para datos binarios

Muchas variables de respuestas se componen de sólo 2 categorías, la variable de respuesta Y denota dos posibles resultados codificados como 1 para un éxito y 0 para un fracaso. La distribución de Y asigna probabilidades $P(Y=1) = \pi$ en caso de éxito y de $P(Y=0) = (1-\pi)$ para un fracaso. Para m observaciones independientes, el número de éxitos tiene una distribución binomial presentada en la ecuación 5.1 y especificada por los parámetros m y π (Agresti, 2007).

5.7 Modelo de probabilidad lineal

Para una respuesta binaria un modelo de probabilidad lineal se representa con la ecuación 5.3, tiene ese nombre porque la probabilidad de éxito cambia linealmente con x , el parámetro β representa el cambio en la probabilidad por unidad de cambio en x . Este GLM tiene una componente binomial aleatoria.

5.8 Modelo de regresión logística

Sea $\pi(x)$ la probabilidad de éxito que depende del valor de la variable x .

La relación entre $\pi(x)$ y x es usualmente no lineal, un cambio en x puede tener menos impacto cuando π tiene un valor cercano a 0 o a 1 que cuando está a la mitad de ese rango.

La $\pi(x)$ incrementa continuamente o decrece continuamente conforme x aumenta su valor, como se indica en las Figuras 5.1 y 5.2 respectivamente. La función matemática que describe esta curva es la descrita en la ecuación 5.5.

$$\pi(x) = \frac{\exp(\alpha + \beta x)}{1 + \exp(\alpha + \beta x)} = e^{\alpha + \beta x} / 1 + e^{\alpha + \beta x} \dots \text{Ecuación 5.5}$$

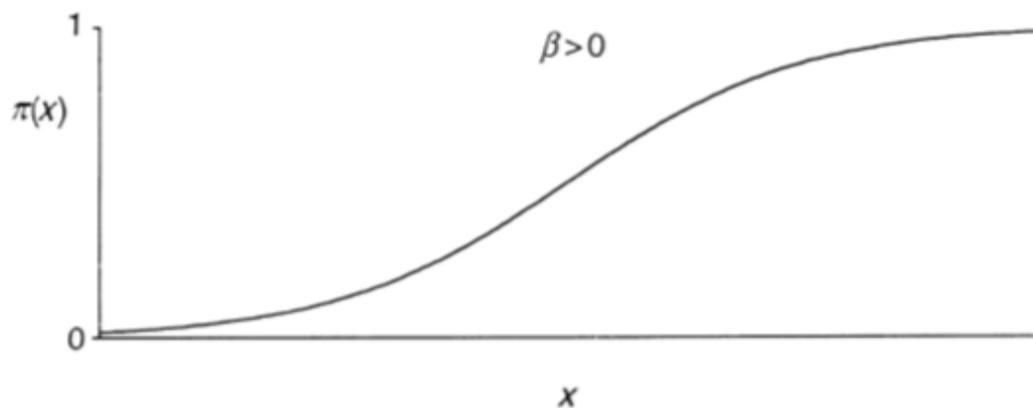


Figura. 5.1 función de regresión logística creciente.

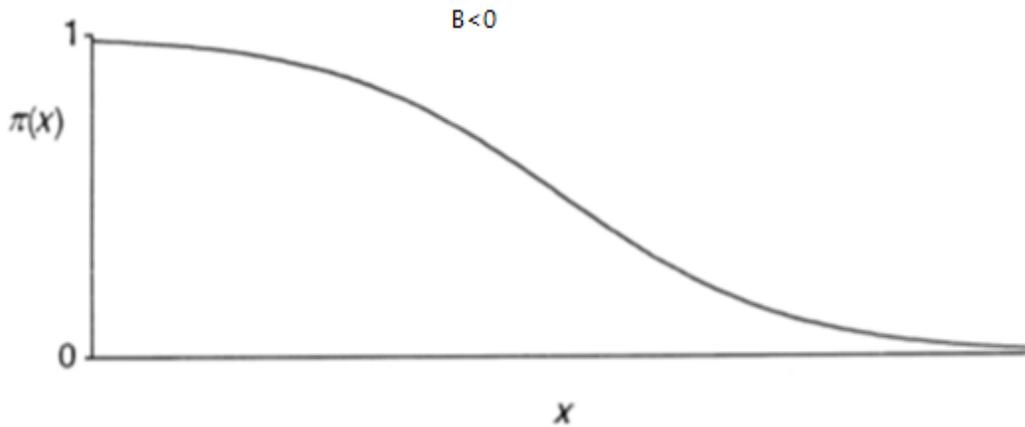


Figura 5.2 función de regresión logística decreciente.

La ecuación 5.5 recibe el nombre de función de regresión logística, el modelo de regresión logística corresponde al indicado en la ecuación 5.6.

$$\text{logit} [\pi(x)] = \log \left[\frac{\pi(x)}{1-\pi(x)} \right] = \alpha + \beta x \dots \text{Ecuación 5.6}$$

El modelo de regresión logística es un caso especial de GLM. El componente aleatorio para el éxito o fracaso de la variable de respuesta tiene una distribución binomial. La función enlace es la función logit: $\log\left[\frac{\pi(x)}{1-\pi(x)}\right]$ para π simbolizado por $\text{logit}(\pi)$ y el componente sistemático se encuentra representado en la ecuación 5.6 por los predictores lineales α y β . Los modelos de regresión logística son frecuentemente llamados modelos logit (Agresti, 2007).

En la ecuación 5.6 x representa a la variable explicativa que es cuantitativa para una variable de respuesta binaria Y , $\pi(x)$ representa la probabilidad de éxito para el valor x indicada en la ecuación 5.8, esta probabilidad es el parámetro para la distribución binomial. El parámetro β determina el grado de incremento o decremento de la curva. Cuando $\beta > 0$, $\pi(x)$ incrementa conforme incrementa x como se indica en la figura 5.1, cuando $\beta < 0$, $\pi(x)$ disminuye conforme x aumenta, cuando $\beta = 0$, la ecuación 5.6 se simplifica a una constante. La magnitud del predictor β determina qué tan rápido la curva del modelo logístico crece o decrece. La pendiente más pronunciada para el modelo de regresión logística ocurre

cuando $\pi(x) = 0.5$, y esto sucede cuando: $x = -\alpha/\beta$ y se le denomina nivel efectivo medio, siendo denotado como EL_{50} . El valor anterior indica el nivel en que la variable de respuesta presenta el 50 % de éxito.

5.9 Interpretación de la relación de momio

Una importante interpretación del modelo de regresión logística usa las probabilidades de éxito y de fracaso para la variable de respuesta, la relación de ellas es conocida como momio presentada en la ecuación 5.7 donde se presenta un efecto multiplicativo de e^β sobre el momio cada vez que se incrementa en 1 unidad el valor de x . Si el valor de $\beta = 0$ por lo tanto $e^\beta = 1$ implica que el momio es independiente del valor de x .

$$\frac{\pi(x)}{1-\pi(x)} = \exp(\alpha + \beta x) = e^\alpha (e^\beta)^x \dots \text{Ecuación 5.7}$$

$$\pi(x) = 1 / 1 + \exp(-\{\beta_0 + \beta_1 x\}) \dots \text{Ecuación 5.8}$$

5.10 Estadístico de Hosmer-Lemeshow

El estadístico de Hosmer-Lemeshow representa una medida de la bondad de ajuste del modelo de regresión logístico aplicada a datos binarios desagrupados. Para calcular dicho estadístico primeramente se ordenan las observaciones binarias en forma ascendente acorde a los valores de sus respectivas probabilidades estimadas por el modelo logístico. Después con las observaciones binarias ordenadas se forman 3 o más grupos de tamaño similar, los percentiles de las probabilidades estimadas pueden ser usadas para definir los grupos. Posteriormente son sumados los valores de la variable de respuesta para cada grupo formado, así como también las probabilidades estimadas. La suma de las observaciones binarias dentro de un grupo es el número de éxitos en ese grupo, mientras que la suma de las probabilidades estimadas es el número de éxitos estimados por el modelo logístico. Los valores anteriores son comparados entre los distintos grupos formados utilizando un estadístico χ^2 .

Suponga que hay m_i observaciones en el grupo i de g grupos, donde el número de éxitos observados es o_i y el correspondiente número de éxitos estimado es e_i . Y si también

definimos π_i como la probabilidad estimada de éxito promedio dentro del grupo i , tenemos que $\pi_i = e_i / m_i$. Denotando al estadístico de Hosmer-Lemeshow como:

$$X^2_{HL} = \sum_{i=1}^g (o_i - m_i \pi_i)^2 / m_i \pi_i (1 - \pi_i) \dots \text{Ecuación 5.9}$$

Utilizando estudios de simulación estadística se demuestra que la ecuación 5.9 sigue una distribución χ^2 con $(g-2)$ grados de libertad cuando el modelo ajustado a los datos experimentales es adecuado. Consiguiendo de esta forma tener una prueba formal de bondad de ajuste para datos binarios desagrupados (Collet, 2003).

Sin embargo el valor numérico del estadístico de Hosmer-Lemeshow es dependiente del número de grupos formados y del número de observaciones dentro de cada grupo, por lo que el valor de P-value en la prueba de significancia no debería ser interpretado rígidamente, más bien debe ser tomado como una guía para verificar la adecuación del modelo.

Hosmer y Lemeshow (2000) proponen crear 10 grupos, en cuyo caso el estadístico asociado sigue asintóticamente una distribución χ^2 con 8 grados de libertad. Para la creación de los grupos hay que elegir los puntos de corte de las probabilidades estimadas. Se mencionan dos formas de elegir los puntos de corte. La primera consiste en dividir las probabilidades estimadas en intervalos de igual amplitud. Y la segunda en dividir los datos en base a los cuantiles de la distribución, con lo que se obtienen grupos más homogéneos. Al estadístico obtenido mediante el primer método se le denomina Hosmer-Lemeshow H y al obtenido por el segundo Hosmer-Lemeshow C (Cañadas, 2013).

5.11 Devianza

En el caso del modelo de regresión logística la devianza es definida como (Sheater, 2009):

$$G^2 = 2\sum_{i=1}^n [y_i \log(y_i / \hat{y}_i) + (m_i - y_i) \log(m_i - y_i / m_i - \hat{y}_i)] \dots \text{Ecuación 5.10}$$

Donde:

G^2 = Estadístico devianza.

y_i = número de éxitos en m_i ensayos del proceso binomial i donde $i= 1, \dots, n$.

$\hat{y}_i = m_i \hat{\pi}(x_i)$

$\hat{\pi}(x_i)$ = probabilidad estimada por el modelo de regresión logística para el valor x_i

Los grados de libertad asociados con la devianza se encuentran dados por: $g = n - (\text{número de parámetros } \beta \text{ estimados en el modelo de regresión logística})$

La devianza es utilizada como estadístico de bondad de ajuste para datos binarios agrupados suponiendo como H_0 = El modelo de regresión logística se ajusta a los datos.

Bajo el supuesto de H_0 y cuando m_i es suficientemente grande, la devianza G^2 se distribuye aproximadamente como una χ^2_{n-p-1} , donde n = número de muestras binomiales, p = número de predictores en el modelo. En el programa R la devianza asociada con el modelo logístico es referido a la devianza residual mientras que la devianza nula es la calculada cuando se fija el valor del parámetro $\beta_1 = 0$.

5.12 Diseño de experimentos con lombriz de tierra *Eisenia foetida* en la prueba de contacto con papel filtro utilizando la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac)

La estructura del diseño es completamente al azar al asignar de forma aleatoria el organismo de prueba: lombriz de tierra *Eisenia foetida* (en edad madura comprobada por la presencia de su citelio en su estructura corporal) a las diferentes concentraciones para la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac) en muestras de papel filtro dentro de una caja de Petri y evaluar su mortalidad al término de 14 días. Al evento de evaluar la mortalidad de una lombriz de tierra dentro de una caja de Petri con la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac) se le denomina como bioensayo o ensayo Bernoulli. El problema a estudiar consiste en verificar la mortalidad de la lombriz de tierra al ser expuesta a diferentes concentraciones para la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac) y en determinar el valor de la CL_{50} para esta sal. El modelo de diseño de experimentos se compone del factor a evaluar que es igual a la concentración de $Pb(NO_3)_2$ (ac). Se presentan 5 niveles representados por las 5 concentraciones diferentes de $Pb(NO_3)_2$ (ac): 3 g/L, 2g/L, 1g/L, 0.5 g/L, 0.25 g/L que son los 5 tratamientos. Y 4 repeticiones por nivel estudiado. Se tiene como blanco 5ml de agua destilada sobre un papel filtro dentro de la caja Petri en contacto con la lombriz de tierra. La variable de respuesta (Y) es la mortalidad de una lombriz de tierra *Eisenia foetida*, la unidad experimental resulta ser cada lombriz de tierra dentro de una caja de Petri expuesta sobre un papel filtro a una determinada concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac). Se trabaja bajo los supuestos de que los n bioensayos son independientes entre sí en idénticas circunstancias experimentales.

Se presenta un ensayo de Bernoulli por unidad experimental con una variable de respuesta Y dicotómica, esto es, sólo son posibles dos resultados:

$$Y_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{cuando no se presenta la mortalidad de la lombriz de tierra.} \\ 1 & \text{cuando se presenta la mortalidad de la lombriz de tierra.} \end{cases}$$

Donde Y_{ij} = es la observación de la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

$$i = 1, 2, 3 \dots 5$$

$$j = 1, 2, 3 \dots 4$$

La Y_{ij} sigue una distribución binomial representada en la ecuación 5.10 con un $m = 1$ dado el número de ensayos de Bernoulli encontrados por unidad experimental y una probabilidad de éxito (definida como la muerte de la lombriz de tierra) denotada como $\pi(x_i)$, donde x_i es la concentración de $Pb(NO_3)_2$ (ac).

$$P(Y_{ij} | x_i) \sim \text{Binomial}(1, \pi(x_i)) \quad \dots \text{Ecuación 5.10}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, 5$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, 4$$

Utilizando la función de probabilidad para la distribución binomial con $m = 1$ y considerando que $\pi(x_i) = 1 / (1 + \exp(-\{\alpha + \beta_1 x_i\}))$ (acorde al modelo de regresión logística) establecemos la ecuación 5.11

$$P(Y_{ij} = y_{ij} | x_i) = \pi(x_i)^{y_{ij}} (1 - \pi(x_i))^{1 - y_{ij}} / (y_{ij}! (1 - y_{ij})!) \quad \dots \text{Ecuación 5.11}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, 5$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, 4$$

La ecuación 5.11 nos permite deducir las ecuaciones 5.12 y 5.13 que se aplican para calcular la probabilidad de sobrevivencia de la lombriz de tierra y la probabilidad de muerte dependientes del valor de la concentración x_i en cada unidad experimental, respectivamente. También pone de manifiesto la relación de Y_{ij} con la $\pi(x_i)$ estimada en el modelo de regresión logística

$$P(Y_{ij} = 0 | x_i) = 1 - \pi(x_i) = 1 - [1 / (1 + \exp(-\{\alpha + \beta x_i\}))] \quad \dots \text{Ecuación 5.12}$$

$$P(Y_{ij} = 1 | x_i) = \pi(x_i) = 1 / (1 + \exp(-\{\alpha + \beta x_i\})) \quad \dots \text{Ecuación 5.13}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, 5$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, 4$$

Para probar si hay efecto de la concentración de la sal, la hipótesis a probar es $H_0 : \beta = 0$ en la ecuación 5.14, lo que implicaría que la probabilidad de la mortalidad de la lombriz de tierra es independiente de la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac).

$$\text{logit} [\pi_{i,j}(x)] = \log \left[\frac{\pi_{i,j}(x)}{1 - \pi_{i,j}(x)} \right] = \alpha + \beta x_{ij} \quad \dots \text{Ecuación 5.14}$$

Donde: $\pi_{i,j}$ = probabilidad de encontrar muerta a la lombriz de tierra en la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

$1 - \pi_{i,j}$ = probabilidad de encontrar viva a la lombriz de tierra en la j-ésima unidad experimental del i-ésimo tratamiento.

α = predictor lineal que determina un valor constante para el modelo logístico cuando el valor de $\beta = 0$.

β = predictor lineal que determina el grado de incremento o decremento de la curva generada por el modelo logístico.

x_{ij} = concentración de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (ac) en la j-ésima unidad experimental del i-ésimo tratamiento.

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales estimados del modelo de regresión logístico ajustado y la ecuación 5.13.

$$\text{CL}_{50} = -\alpha / \beta \dots \text{Ecuación 5.15}$$

Se utiliza la prueba de Hosmer-Lemeshow para la bondad de ajuste del modelo de regresión logística a los datos experimentales.

El mismo diseño de experimentos es aplicado con el factor la sal de NaAsO_2 (ac) con 5 niveles representados por: 0.6 g/l, 0.4g/l, 0.3g/l, 0.2 g/l, 0.1 g/l.

De igual manera es utilizado un diseño de experimentos idéntico con el factor la muestra de jal minero con 6 niveles representados por: HP2 , HP3, HP5, HP7, HP16 y HP17 . Y la unidad experimental es una lombriz de tierra *Eisenia foetida* dentro de una caja de Petri en presencia de una muestra de jal.

5.13 Diseño de experimentos con lombriz de tierra *Eisenia foetida* en la muestra de suelo artificial con la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg)

La estructura del diseño es completamente al azar al asignar de forma aleatoria por cada muestra de suelo artificial contenida en una caja de Petri seis organismos de prueba: lombrices de tierra *Eisenia foetida* (en edad madura comprobada por la presencia de su citelio en su estructura corporal). Al evento de evaluar la mortalidad de cada lombriz *Eisenia foetida* dentro del grupo de las seis presentes por caja de Petri al término de 14 días se le denomina como bioensayo o ensayo Bernoulli.

El problema a estudiar consiste en verificar la mortalidad de las lombrices de tierra al ser expuestas a diferentes concentraciones para la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg y en determinar el valor de la CL_{50} para esta sal. El modelo de diseño de experimentos se compone del factor a evaluar que es igual a la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg en la muestra de suelo artificial. Se presentan 5 niveles representados por las 5 concentraciones diferentes de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en mg de esta sal por kg de suelo artificial y son las siguientes: 4000mg/kg , 3000 mg/kg, 2000 mg/kg, 1000 mg/kg y 500 mg/kg que son los 5 tratamientos. Y 4 repeticiones por nivel estudiado. Se tiene como blanco 50 g de suelo artificial sin la presencia de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dentro de la caja Petri en contacto con las lombrices de tierra. La variable de respuesta (Y) es el número de éxitos (lombrices de tierra muertas) presentes en los 6 ensayos Bernoulli (cuando los datos se encuentran agrupados el ajuste del modelo se conoce como regresión logística binomial (Cañadas, 2013)), la unidad experimental resulta ser el grupo de seis lombrices de tierra dentro de una caja de Petri expuestas a una determinada concentración de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg en la muestra de suelo artificial. Se trabaja bajo los supuestos de que los 6 bioensayos son idénticos e independientes entre sí.

La variable de respuesta $Y_{ij} = \{0, 1, 2, \dots, 6\}$ registrará uno de siete posibles valores para cada observación realizada y representa al número de lombrices de tierra muertas.

Y_{ij} = es la observación de la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

La Y_{ij} sigue una distribución binomial representada en la ecuación 5.16 con un $m = 6$ dado el número de ensayos de Bernoulli encontrados por unidad experimental y $\pi(x_i)$ es definida como la probabilidad de mortalidad para una lombriz de tierra, donde x_i es la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg).

$$P(Y_{ij} | x_i) \sim \text{Binomial} (6, \pi(x_i)) \dots \text{Ecuación 5.16}$$

$$i = 1, 2, \dots, 5.$$

$$j = 1, 2, \dots, 4.$$

Utilizando la función de probabilidad para la distribución binomial con $m = 6$ y considerando que $\pi(x_i) = 1 / (1 + \exp(-\{\alpha + \beta_1 x_i\}))$ (acorde al modelo de regresión logística) establecemos la ecuación 5.17

$$P(Y_{ij} = y_{ij} | x_i) = \pi(x_i)^{y_{ij}} (1 - \pi(x_i))^{6 - y_{ij}} \frac{6!}{(y_{ij}! (6 - y_{ij})!)} \dots \text{Ecuación 5.17}$$

$$i = 1, 2, \dots, 5.$$

$$j = 1, 2, \dots, 4.$$

La ecuación 5.17 nos permite calcular las probabilidades estimadas por el modelo de regresión logística para $y_{ij} = \{0, 1, 2, \dots, 6\}$ en cada unidad experimental.

$$i = 1, 2, \dots, 5.$$

$$j = 1, 2, \dots, 4.$$

Para probar si hay efecto de la concentración de la sal, la hipótesis a probar es $H_0: \beta = 0$ en la ecuación 5.18, lo que implicaría que la probabilidad de mortalidad para una lombriz de tierra es independiente de la concentración de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg).

$$\text{logit} [\pi_{i,j}(x)] = \log \left[\frac{\pi_{i,j}(x)}{1 - \pi_{i,j}(x)} \right] = \alpha + \beta x_{ij} \dots \text{Ecuación 5.18}$$

$$i = 1, 2, \dots, 5.$$

$$j = 1, 2, \dots, 4.$$

Donde: $\pi_{i,j}$ = probabilidad de mortalidad para una lombriz de tierra en la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

$1 - \pi_{i,j}$ = probabilidad de sobrevivencia para una lombriz de tierra en la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

α = predictor lineal que determina un valor constante para el modelo logístico cuando el valor de $\beta = 0$.

β = predictor lineal que determina el grado de incremento o decremento de la curva generada por el modelo logístico.

x_{ij} = concentración de la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) en la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

Si se quiere determinar el valor de la probabilidad para algún valor de los indicados por $y_{i,j} = \{0,1,2,\dots,6\}$ se utiliza la ecuación 5.17 con el valor de $\pi_{i,j}$ estimado con el modelo de regresión logística.

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales estimados del modelo de regresión logístico ajustado y la ecuación 5.13.

$$\text{CL}_{50} = -\alpha/\beta \dots \text{Ecuación 5.15}$$

Se utiliza la prueba de la devianza para la bondad de ajuste del modelo de regresión logística a los datos experimentales.

El mismo diseño de experimentos se aplica para la sal de NaAsO_2 mg/kg teniendo como factor a su concentración con 5 niveles: 500 mg/kg, 400 mg/kg, 300 mg/kg, 200 mg/kg y 50 mg/kg.

También para la mezcla combinada de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg con una concentración constante de 50 mg/kg para la sal de NaAsO_2 . Se tiene como factor la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg con 5 niveles: 3000mg/kg, 2000 mg/kg, 1000 mg/kg, 500 mg/kg y 250 mg/kg

De la misma forma para el caso de la mezcla combinada de NaAsO_2 mg/kg con una concentración constante de 500 mg/kg para la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Se tiene como factor la concentración de NaAsO_2 mg/kg con 5 niveles: 300 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg y 25 mg/kg.

CAPÍTULO 6.RESULTADOS Y SU EVALUACIÓN

En la primera sección del capítulo 6 se muestran los resultados para la prueba de humedad. Posteriormente en el punto 6.2 se muestran evidencias fotográficas para el comportamiento de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* al ser expuestas a la sal de NaAsO_2 (ac), que son descritas en la tabla 6.1 En seguida se presenta en el punto 6.21 la aplicación del modelo de regresión logística para comprobar la dependencia de la mortalidad de la lombriz de tierra con la concentración de dicha sal. También se muestra el empleo del citado modelo para evaluar el valor de la CL_{50} en este bioensayo. Se calcula un intervalo de confianza para el CL_{50} basado en la ecuación propuesta por Muhammad (2009). Y finalmente se compara este valor con los reportados en la literatura exceptuando para las muestras con las sales combinadas de NaAsO_2 con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Lo anterior es desarrollado para todas las pruebas experimentales del presente trabajo de tesis.

6.1 Resultados de las pruebas presuntivas de humedad con la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

En el esquema siguiente se describe la prueba presuntiva de humedad, indicando la forma de proceder, además, se muestran evidencias fotográficas en las figuras 6.1 a 6.5 del comportamiento de las lombrices al estar en contacto con distintos volúmenes de agua y los resultados son descritos en la tabla 6.1.

Resultados.

Terminado el tiempo correspondiente se observó que en las cajas donde se colocaron 1,2 y 3 ml de agua las lombrices de tierra *Eisenia foetida* se secaron. La lombriz en 4 ml no evadió el medio ni presentó mortalidad, lo mismo ocurrió con el volumen de 5 ml.



Figura 6. 2 Muestra de 1 ml de agua destilada y una lombriz de tierra seca.



Figura 6. 1 Muestra de 2 ml de agua destilada y una lombriz de tierra seca.



Figura 6. 3 Muestra de 3 ml de agua destilada y una lombriz de tierra seca.



Figura 6. 5 Muestra de 4 ml de agua destilada y una lombriz de tierra húmeda viva sin evadir el medio filtro.



Figura 6. 4 Muestra de 5 ml de agua destilada y una lombriz de tierra húmeda viva sin evadir el medio.

Figuras de la 6.1 a la 6.5 con muestras de agua destilada en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Tabla 6.1 Resultados de las pruebas presuntivas de humedad con la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Volúmenes de agua para las pruebas presuntivas de humedad.	Resultados.
Muestra de 1 ml	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento del sistema integumentario (piel), rigidez, contracción y sequedad en su estructura corporal.
Muestra de 2 ml	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento del sistema integumentario (piel), enroscamiento, rigidez y sequedad en su estructura corporal.
Muestra de 3 ml	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento del sistema integumentario (piel), rigidez, contracción y sequedad en su estructura corporal.
Muestra de 4 ml	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza y una estructura corporal blanda y húmeda.
Muestra de 5 ml	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza y una estructura corporal blanda y húmeda.

6.2 Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando NaAsO₂ (ac)

En las figuras 6.6 a 6.11 se presenta el distinto comportamiento de las lombrices de tierra al ser expuestas a diferentes concentraciones en estado acuoso de la sal de NaAsO₂ (ac). Se observa que, en las concentraciones más altas correspondientes a 0.6, 0.4 y 0.3 g/l, se presenta la mortalidad y desangramiento de los organismos estudiados, mientras que en las de 0.2, y 0.1 g/l no se muestra desangramiento ni mortalidad. En el blanco se observa la no mortalidad de la lombriz de tierra. En la tabla 6.2 se enlistan los resultados para las pruebas mencionadas.



Figura 6. 7 5 ml de NaAsO₂ (ac) a 0.6 g/l. La lombriz se encuentra desangrada, enroscada y muerta.



Figura 6.7 5 ml de NaAsO₂ (ac) a 0.4 g/l. La lombriz se encuentra muerta y desangrada.



Figura 6.8 5 ml de NaAsO₂ (ac) a 0.3 g/l. La lombriz se encuentra muerta enroscada y desangrada.



Figura 6. 10 5 ml de NaAsO₂ (ac) a 0.2 g/l. La lombriz se encuentra enroscada y viva.



Figura 6. 9 5 ml de NaAsO₂ (ac) a 0.1 g/l. La lombriz se encuentra viva.



Figura 6. 11 5 ml de agua destilada sobre el papel filtro. La lombriz se encuentra viva.

Figura de la 6.6 a la 6.11 con 5 ml de NaAsO₂ (ac) con diferentes concentraciones y en presencia de la lombriz de tierra Eisenia foetida.

Tabla 6.2 Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando NaAsO_2 (ac).

Distintas concentraciones de NaAsO_2 (ac) en g/l de las pruebas de contacto.	Cambios observados en las pruebas de contacto en papel filtro.
0.6	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento, ulceración del sistema integumentario (piel), enroscamiento e hinchazón en su estructura corporal.
0.4	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento, ulceración del sistema integumentario (piel), enroscamiento e hinchazón en su estructura corporal.
0.3	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento, ulceración del sistema integumentario (piel), enroscamiento, rigidez e hinchazón en su estructura corporal.
0.2	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza, un ligero enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda.
0.1	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza y una estructura corporal blanda y húmeda.
Blanco de agua destilada.	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza y una estructura corporal blanda y húmeda.

6.2.1 Aplicación del modelo logístico para la comprobación de la prueba de hipótesis y el cálculo de la CL₅₀

Al ingresar la sintaxis para el diseño 1 en el programa estadístico R Versión 2.14.0- 2011 mostrada en el anexo 1 para la aplicación del modelo logístico a las concentraciones de la sal de NaAsO₂ (ac) en conjunto con los valores de la variable de respuesta (mortalidad de la lombriz de tierra) se genera la tabla 6.3 donde en la primer columna se indica el valor de los predictores lineales estimados α y β y en la segunda columna se presenta el valor de p-value asociado a cada coeficiente mencionado para probar que el predictor correspondiente es igual a cero.

Tabla 6.3 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de NaAsO₂ (ac).

Predictores.	Coefficientes estimados	p-value
α	-6.871	0.0382
β	27.484	0.0321

El modelo de regresión logística para la sal de NaAsO₂ (ac) se expresaría de la siguiente forma:

$$\log[\pi_{ij}(x)/1-\pi_{ij}(x)] = \alpha + \beta x_{ij} = -6.871 + 27.484x_{ij} \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.1}$$

$i = 1, 2, \dots, 5.$
 $j = 1, 2, \dots, 4.$

Utilizando la prueba de hipótesis propuesta en el capítulo 5 y vuelta a enunciar de nueva cuenta en la ecuación 6.2.

$$H_0 : \beta = 0 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.2}$$

Se observa en la tabla 6.3 un valor para β distinto de cero, con su respectivo valor de p-value asociado que es menor al α (nivel de significancia de 0.05). Por lo tanto se rechaza H_0 y se manifiesta la dependencia de la probabilidad de muerte de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* con la concentración de la sal de NaAsO₂ (ac) en la ecuación 6.1

En la figura 6.12 se muestra la gráfica generada por el programa R al utilizar la sintaxis presentada en el anexo 1. En dicha gráfica los puntos en blanco representan las observaciones de las mortalidades para cada ensayo, por ejemplo, para la concentración de 0.2 g/l de NaAsO₂ (ac) se presentan 2 puntos superpuestos en la mortalidad de 0 y también 2 puntos superpuestos en la mortalidad de 1. La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales y representa a una función de regresión logística creciente al ser $\beta > 0$ lo que implica que $\pi(x)$ (la probabilidad en la mortalidad de la lombriz de tierra) aumenta al incrementar x (la concentración de la sal de NaAsO₂ (ac)) acorde a la ecuación 6.1.

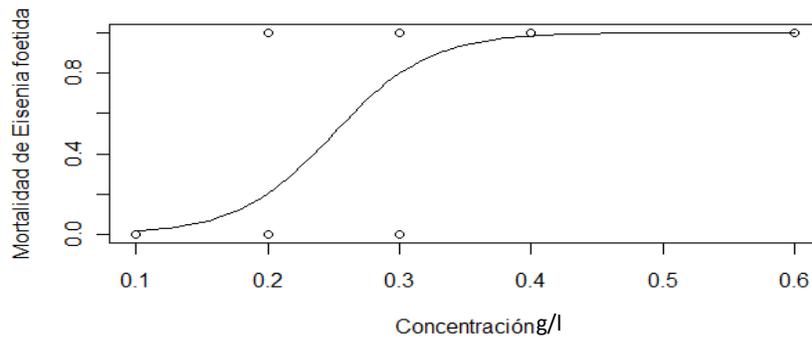


Figura 6.12 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* vs concentración de NaAsO₂ (ac) en g/l

Para calcular la CL₅₀ se utilizan los parámetros lineales del modelo de regresión logístico y la ecuación 6.3.

$$CL_{50} = -\alpha / \beta = -(-6.871)/27.484 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.3}$$

Haciendo uso de la ecuación 6.3 se calcula la CL₅₀ = 0.249 g/l

Para determinar el intervalo de confianza se utiliza la ecuación: 6.4 (Muhammad, 2009).

$$\text{Error Estándar de } CL_{50} = (\text{Log } CL_{84} - \text{Log } CL_{16}) / (2N)^{0.5} \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.4}$$

Donde: Log CL₈₄= Concentración en la que el 84 % de las lombrices de tierra presentan mortalidad.

Log CL₁₆= Concentración en la que el 16 % de las lombrices de tierra presentan mortalidad.

N= número de lombrices de tierra presentes en las 4 repeticiones por cada tratamiento.

Para determinar el CL₈₄ y el CL₁₆ se hace uso de la ecuación 6.1

$$CL_{84} = 0.276 \text{ g/l}$$

$$CL_{16} = 0.223 \text{ g/l}$$

$$\text{Y el error estándar de } CL_{50} = (\text{Log}0.276 - \text{Log}0.223) / (8)^{0.5} = 0.032 \text{ g/l}$$

Así el intervalo del 95% de confianza para la CL₅₀ = 0.249 g/l +/- 0.032 g/l; (0.217g/l-0.281g/l) para la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 24 horas.

El valor de CL₅₀ se considera como un indicador de la peligrosidad de la sal en medio acuoso y resulta ser mayor al valor de 5 mg/L para As del extracto PECT (procedimiento de extracción de componentes tóxicos) propuesto en la NOM-053-SEMARNAT-2005. Este valor manifiesta la alta resistencia de los organismos estudiados al compuesto tóxico y se debe de tomar con reserva pues no es extrapolable al ser humano, pero puede ser comparado con las concentraciones del metaloide As que se pudieran generar a partir de los jales mineros si se llegará a presentar una lluvia ácida en la zona de estudio.

Este ensayo se realiza como antecedente de las pruebas con las muestras de suelo artificial para evaluar el comportamiento y efecto de la sal evaluada sobre la lombriz de tierra.

La prueba se realizó bajo nuestras condiciones experimentales mencionadas en la tabla 4.4 lo que lo hace diferente a otros bioensayos ecotoxicológicos realizados por diferentes investigadores y con la finalidad de comparar los resultados de CL₅₀ obtenidos en este bioensayo y verificar la adecuación del procedimiento utilizado y el desempeño del experimentador se cita a Pallavi (2013) que determinó la CL₅₀ en pruebas de contacto con papel filtro utilizando a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como organismo de prueba y obtuvo un valor de CL₅₀ = 0.3 g/l para un periodo de 24 horas. El bioensayo realizado en esta tesis y el realizado por Pallavi (2013) se encuentran basados en guía 207 de la Organización para la Cooperación y el desarrollo Económico (OECD) para la evaluación de sustancias

(OECD,1984) . Dada la similitud en resultados se comprueba la correcta aplicación del procedimiento experimental para efectuar el bioensayo citado.

6.2.2 Prueba de Hosmer- Lemeshow.

Para determinar la idoneidad del modelo de regresión logística a los datos experimentales se utiliza la prueba de Hosmer-Lemeshow. En dicha prueba se forman 10 grupos acorde a lo establecido por Hosmer y Lemeshow (2000). Para ello se utiliza la sintaxis 1 correspondiente a la prueba de bondad de ajuste en el programa R arrojando un valor de p-value =1 para el estadístico H de Hosmer y Lemeshow. Dado el valor de p-value a un α fijado de 0.05 se confirma la idoneidad del modelo.

En este caso la H_0 = el modelo de regresión logística se ajusta a los datos observados.

6.3 Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con $Pb(NO_3)_2$ (ac)

En las figuras 6.13 a 6.18 se presenta el distinto comportamiento de la lombriz de tierra al ser expuestas a diferentes concentraciones en estado acuoso para la sal de $Pb(NO_3)_2$ (ac). Se observa que en las concentraciones más altas correspondientes a 3, 2 y 1 g/l se presenta la mortalidad y desangramiento de los organismos estudiados mientras que en las concentraciones de 0.5, y 0.25 g/l no se muestra desangramiento ni mortalidad. Y en el blanco no se observa la no mortalidad de la lombriz de tierra.



Figura 6.13 5 ml de $Pb(NO_3)_2$ (ac) a 3g/L. La lombriz se encuentra seca, enroscada y muerta.



Figura 6. 14 5 ml de $Pb(NO_3)_2$ (ac) a 2 g/L. La lombriz se encuentra enroscada y muerta.



Figura 6. 15 5 ml de $Pb(NO_3)_2$ (ac) a 1 g/L. La lombriz se encuentra enroscada y muerta.



Figura 6. 16 5 ml de $Pb(NO_3)_2$ (ac) a 0.5 g/l. La lombriz se encuentra viva.



Figura 6. 17 5 ml de $Pb(NO_3)_2$ (ac) a 0.25 g/l. La lombriz se encuentra viva.



Figura 6.18 5 ml de agua destilada sobre el papel filtro. La lombriz se encuentra viva.

Figuras de la 6.13 a la 6.18 con 5 ml de $Pb(NO_3)_2$ (ac) a diferentes concentraciones en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

Tabla 6.4 Resultados de la prueba de contacto en papel filtro con lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando $Pb(NO_3)_2$ (ac).

Distintas concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ en g/l de las pruebas de contacto.	Cambios observados en las pruebas de contacto en papel filtro.
3	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento, enroscamiento, rigidez y sequedad en su estructura corporal.
2	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento, ulceración, enroscamiento y rigidez en su estructura corporal.
1	La lombriz de tierra se encuentra muerta al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta necrosamiento y rigidez en su estructura corporal.
0.5	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza oscura y una estructura corporal blanda y húmeda.
0.25	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza oscura y una estructura corporal blanda y húmeda.
Blanco de agua destilada.	La lombriz de tierra se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta una coloración rojiza oscura y una estructura corporal blanda y húmeda.

6.3.1 Aplicación del modelo logístico para la comprobación de la prueba de hipótesis y el cálculo de la CL₅₀

Al ingresar la sintaxis 2 en el programa estadístico R Versión 2.14.0-2011 mostrada en el anexo 1 para la aplicación del modelo logístico a las concentraciones de la sal de Pb(NO₃)₂(ac) en conjunto con los valores de la variable de respuesta (mortalidad de la lombriz de tierra) se genera la tabla 6.5 donde en la primer columna se indica el valor de los predictores lineales estimados α y β y en la segunda columna se presenta el valor de p-value asociado a cada coeficiente mencionado para probar que el predictor correspondiente es igual a cero.

Tabla 6.5 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de Pb(NO₃)₃ (ac).

Predictores.	Coefficientes estimados.	p-value.
α	-4.366	0.0408
β	5.618	0.0427

El modelo de regresión logística para la sal de Pb(NO₃)₂(ac) se expresaría de la siguiente forma:

$$\log[\pi_{ij}(x)/1-\pi_{ij}(x)] = \alpha + \beta x_{ij} = -4.366 + 5.618 x_{ij} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.5}$$

$$i = 1, 2, \dots, 5$$

$$j = 1, 2, \dots, 4$$

Utilizando la prueba de hipótesis propuesta en el capítulo 5 (vuelta a enunciar de nueva cuenta en la ecuación 6.6) para verificar la dependencia de la concentración de la sal con la mortalidad de la lombriz de tierra.

$$H_0 : \beta = 0 \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.6}$$

Y en conjunto con un valor indicado en la tabla 6.5 para β distinto de cero, con su respectivo valor de p-value asociado que es menor al α (nivel de significancia de 0.05), se rehaza H_0 y

se manifiesta la dependencia de la probabilidad de muerte para la lombriz de tierra *Eisenia foetida* con la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2(ac)$ en la ecuación 6.5

En la figura 6.19 se muestra la gráfica generada por el programa R al utilizar la sintaxis 2 presentada en el anexo 1. La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales y representa a una función de regresión logística creciente al ser $\beta > 0$ lo que implica que $\pi(x)$ (la probabilidad en la mortalidad de la lombriz de tierra) aumenta al incrementar x (la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2(ac)$) acorde a la ecuación 6.5.

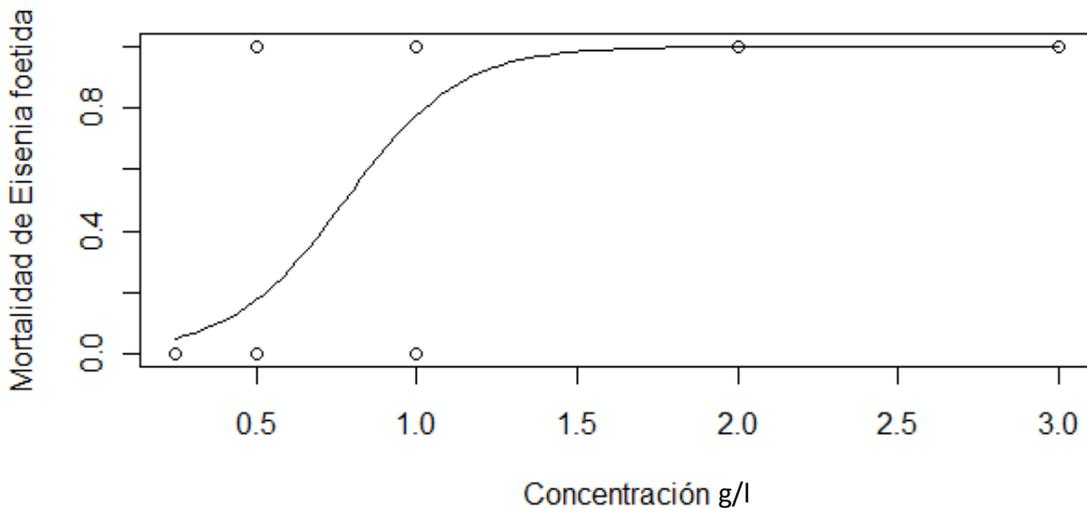


Figura 6.19 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* vs concentración de $Pb(NO_3)_2(ac)$ en g/l

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales estimados del modelo de regresión logístico ajustado y la ecuación 6.7.

$$CL_{50} = -\alpha / \beta = -(-4.366) / 5.618 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.7}$$

Haciendo uso de la ecuación 6.7 se calcula la $CL_{50} = 0.777 \text{ g/l}$

Para determinar el intervalo de confianza se utiliza la ecuación: 6.8 (Muhammad, 2009).

$$\text{Error Estándar de } CL_{50} = (\text{Log } CL_{84} - \text{Log } CL_{16}) / (2N)^{0.5} \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.8}$$

Donde: Log CL₈₄= Concentración en la que el 84 % de las lombrices de tierra presentan mortalidad.

Log CL₁₆= Concentración en la que el 16 % de las lombrices de tierra presentan mortalidad.

N= número de lombrices de tierra presentes en las 4 repeticiones por cada tratamiento.

Para determinar el CL₈₄ y el CL₁₆ se hace uso de la ecuación 6.5

Y el error estándar de CL₅₀ = (Log0.90-Log0.648) / (8)^{0.5} = 0.05 g/l

Así el intervalo del 95% de confianza para la CL₅₀ = 0.777 g/l +/- 0.05 g/l; (0.827g/l-0.727g/l) para la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 48 horas.

Transformamos el valor de CL₅₀ a unidades de µg/cm² para poder compararlo con el valor reportado de 45 a 92 µg/cm² encontrado por Neuhauser (2000).

$$(0.777\text{g/l})(5 \times 10^{-3}\text{l}) = 3.885 \times 10^{-3} \text{ g}$$

Se multiplica por 5x10⁻³ l debido a que fue el volumen final al realizar las diluciones.

$$3.885 \times 10^{-3} \text{ g}/80\text{cm}^2 = 4.85 \times 10^{-5} \text{ g /cm}^2$$

Se dividió por 80cm² porque es el área del papel filtro circular.

$$4.85 \times 10^{-5} \text{ g /cm}^2 (10^6 \mu\text{g}/1\text{g}) = 48.56 \mu\text{g/cm}^2$$

El mismo desarrollo se realiza para el intervalo de confianza obteniendo:

$$(0.05 \text{ g/l}) (5 \times 10^{-3}\text{l}) = 2.5 \times 10^{-4} \text{ g}$$

$$2.5 \times 10^{-4} \text{ g} / 80\text{cm}^2 = 3.125 \times 10^{-6} \text{ g /cm}^2$$

$$= 3.125 \times 10^{-6} \text{ g /cm}^2 (10^6 \mu\text{g}/1\text{g}) = 3.125 \mu\text{g/cm}^2$$

Así el intervalo del 95% de confianza para la CL₅₀ = 48.56 µg/cm² +/- 3.125 µg/cm² ; (45.435 µg/cm² -51.685 µg/cm²) para Pb(NO₃)₂ utilizando como organismo de prueba a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 48 horas.

El bioensayo ecotoxicológico se realizó bajo nuestras condiciones experimentales particulares especificadas en la tabla 4.4 lo que lo hace diferente a otros bioensayos realizados con los mismos compuestos y con el mismo organismo de prueba.

El valor de CL₅₀ se puede interpretar como un indicador de la peligrosidad de la sal en medio acuoso y resulta ser mayor a 5 mg/L que es el propuesto como límite máximo permisible en el extracto PECT (procedimiento de extracción de componentes tóxicos) en la NOM-053-SEMARNAT-2005. Dicho CL₅₀ no es aplicable para el género humano, pero se puede tomar

como un valor orientativo para compararlo con las concentraciones acuosas del metal Pb a partir de los jales mineros si se llegara a presentar lixiviación producto de una lluvia ácida. Dada la similitud entre el valor de CL_{50} determinado en este trabajo de tesis y el calculado por Neuhaser (2000) se verifica el correcto desempeño del experimentador y una aplicación adecuada del procedimiento efectuado en la realización del bioensayo acorde a la guía 207 de la Organización para la Cooperación y el desarrollo Económico (OECD) para la evaluación de sustancias (OECD,1984).

6.3.2 Prueba de Hosmer-Lemeshow

Para determinar la idoneidad del modelo de regresión logística a los datos experimentales se utiliza la prueba de Hosmer-Lemeshow. En dicha prueba se forman 10 grupos acorde a lo establecido por Hosmer y Lemeshow (2000). Para ello se utiliza la sintaxis 2 correspondiente a la prueba de bondad de ajuste en el programa R arrojando un valor de $p\text{-value} = 0.9999$ para el estadístico H de Hosmer y Lemeshow. Dado el valor de $p\text{-value}$ a un α fijado de 0.05 se confirma la idoneidad del modelo.

En este caso la H_0 = el modelo de regresión logística se ajusta a los datos observados.

6.4 Resultados de la prueba con suelo artificial con la sal de $NaAsO_2$ (mg/kg)

Anteriormente se prepararon soluciones acuosas de $NaAsO_2$ para homogeneizar el suelo artificial y alcanzar las concentraciones en mg/kg reportadas en las figuras 6.20 a 6.24 donde también se muestra el comportamiento de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* en contacto con las muestras de suelo artificial a distintas concentraciones de $NaAsO_2$ en mg/kg. En la figura 6.20 se presenta una muestra de suelo artificial a una concentración de 500 mg/kg donde se presentaron todos los organismos con pérdida de coloración, enroscados y muertos, en la figura 6.21 con una muestra a una concentración de 400 mg/kg se presentaron 5 organismos con pérdida en la coloración y muertos, en la figura 6.22 con una muestra a una concentración de 300 mg/kg se extrajeron las lombrices de tierra de la muestra de suelo artificial y se presentaron 4 organismos muertos, en la figura 6.23 a una concentración de 50 mg/kg se presentaron todos los organismos vivos.

En el blanco de suelo artificial también se presentaron todos los organismos vivos. En la tabla 6.6 se indican los resultados para la prueba con suelo artificial en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando la sal de NaAsO_2 (mg/kg).



Figura 6.20 Con una muestra de NaAsO_2 a 500 mg/kg. Se presentaron todos los organismos enroscados y muertos. 13



Figura 6.21 Con una muestra de NaAsO_2 a 400 mg/kg. Se presentaron 5 organismos enroscados y muertos.



Figura 6.22 Con una muestra de NaAsO_2 a 300mg/kg. Se presentaron 4 organismos muertos fuera de la muestra de suelo artificial al ser extraídos manualmente.



Figura 6.23 Con una muestra de NaAsO_2 a 50mg/kg. Se presentaron todos los organismos vivos.



Figura 6.24 Blanco con una muestra de suelo artificial donde todos los organismos se presentan vivos.

Figuras de la 6.20 a la 6.24 con muestras de NaAsO_2 (mg/kg) a diferentes concentraciones en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Tabla 6.6 Resultados de la prueba en suelo artificial con lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando la sal de NaAsO₂ (mg/kg).

Distintas concentraciones de NaAsO₂ (mg/kg) para las pruebas en suelo artificial.	Cambios observados en las pruebas de suelo artificial.
500	Todos los organismos se encuentran muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presenta enroscamiento, rigidez, pérdida de la coloración rojiza y sequedad en su estructura corporal.
400	Se encontraron 5 organismos muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, pérdida de la coloración rojiza y sequedad en su estructura corporal. Se reportó una lombriz viva al responder a un estímulo mecánico pero presento rigidez, sequedad y lentitud en su movimiento.
300	Se reportaron 4 organismos muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, sequedad y ruptura en su estructura corporal. Los 2 restantes se presentaron vivas al responder a estímulos mecánicos pero con lentitud en su movimiento, sequedad y rigidez en su estructura corporal.
50	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan una coloración rojiza, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda.
Blanco.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan una coloración rojiza, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda. Los organismos tienden a aglomerarse entre sí mismos.

6.4.1 Aplicación del modelo logístico para la comprobación de la prueba de hipótesis y el cálculo de la CL₅₀

Al ingresar la sintaxis para el diseño 3 en el programa estadístico *R* Versión 2.14.0-2011 mostrada en el anexo 1 para la aplicación del modelo logístico a las concentraciones de la sal de NaAsO₂ (mg/kg) en conjunto con los valores de la variable de respuesta se genera la tabla 6.7 donde en la primer columna se indica el valor de los predictores lineales estimados α y β

y en la segunda columna se presenta el valor de p-value asociado a cada coeficiente mencionado para probar que el predictor correspondiente es igual a cero.

Tabla 6.7 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de NaAsO₂ (mg/kg).

Predictores.	Coefficientes estimados	p-value
α	-2.86084	3.14e-09
β	0.01107	9.36e-11

El modelo de regresión logística para la sal de NaAsO₂ (mg/kg) se expresaría de la siguiente forma:

$$\log[\pi_{ij}(x)/1-\pi_{ij}(x)] = \alpha + \beta x_{ij} = -2.86 + 0.011 x_{ij} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.9}$$

$i = 1, 2 \dots 5.$
 $j = 1, 2 \dots 4.$

Utilizando la prueba de hipótesis propuesta en el capítulo 5 (vuelta a enunciar de nueva cuenta en la ecuación 6.10) para verificar la dependencia de la concentración de la sal con la mortalidad de una lombriz de tierra.

$$H_0: \beta = 0 \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.10}$$

Y en conjunto con un valor indicado en la tabla 6.7 para β distinto de cero, con su respectivo valor de p-value asociado que es menor al α (nivel de significancia de 0.05), se rehaza H_0 y se manifiesta la dependencia de la probabilidad de mortalidad de lombriz de tierra con la concentración de la sal de NaAsO₂ (mg/kg) en la ecuación 6.9

En la figura 6.25 se muestra la gráfica generada por el programa R al utilizar la sintaxis para el diseño 3 presentada en el anexo 1. En el eje y se presenta la mortalidad de las lombrices de tierra por muestra siendo de 1 a 6 por unidad experimental y en eje x la concentración de la sal de NaAsO₂ (mg/kg). La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales y representa a una función de regresión logística creciente al ser $\beta > 0$ lo que implica que $\pi(x)$ aumenta al incrementar x (la concentración de la sal de NaAsO₂ acorde a la ecuación 6.9).

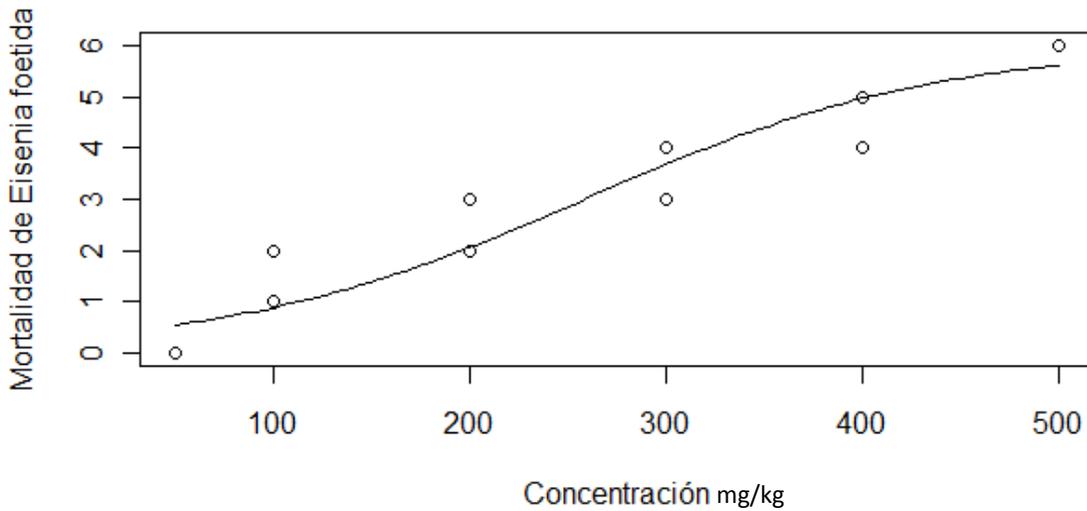


Figura 6.25 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* vs concentración de NaAsO_2 (mg/kg).

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales estimados del modelo de regresión logístico ajustado y la ecuación 6.11.

$$CL_{50} = -\alpha / \beta = -(-2.86)/0.011 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.11}$$

Haciendo uso de la ecuación 6.11 se calcula la $CL_{50} = 258.364 \text{mg/kg}$

Para determinar el intervalo de confianza se utiliza la ecuación 6.12 (Muhammad, 2009).

$$\text{Error Estándar de } CL_{50} = (\text{Log } CL_{84} - \text{Log } CL_{16}) / (2N)^{0.5} \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.12}$$

Donde: $\text{Log } CL_{84}$ = Concentración en la que el 84 % de las lombrices de tierra presentan mortalidad.

$\text{Log } CL_{16}$ = Concentración en la que el 16 % de las lombrices de tierra presentan mortalidad.

N = suma de lombrices de tierra presentes en las 4 repeticiones por cada tratamiento.

Para determinar el CL_{84} y el CL_{16} se hace uso de la ecuación 6.9

$$\text{Y el error estándar es de } CL_{50} = (\text{Log } 323.40 - \text{Log } 193.3) / (48)^{0.5} = 0.0321 \text{mg/kg}$$

Así el intervalo del 95% de confianza para la $CL_{50} = 258.364 \text{ mg/kg} \pm 0.0321 \text{ mg/kg}$; ($258.3319 \text{ mg/kg} - 258.396 \text{ mg/kg}$) para la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 14 días. El valor de la CL_{50} se considera como un indicador de la peligrosidad de la sal NaAsO_2 (mg/kg) presente en la muestra de suelo artificial. Refiriéndonos a la tabla 4.11 encontramos que la concentración del As presente en las muestras de jales mineros sobrepasa el valor de la CL_{50} , ya que se encuentra en un intervalo de 202.5 mg/kg a 659.51 mg/kg. En el caso de que el metaloide As se encontrará en forma biodisponible y bioaccesible en los relaves mineros representaría un peligro para las lombrices de tierra.

Se verifica un empleo correcto de la metodología para la evaluación de la CL_{50} y una acertada práctica por parte del experimentador al comparar el CL_{50} calculado de $258.364 \text{ mg/kg} \pm 0.0321 \text{ mg/kg}$ con el obtenido en una prueba por Zhifeng y sus colaboradores (2016) de $294.0 \pm 9 \text{ mg/kg}$ para NaAsO_2 en un periodo de 14 días utilizando a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como organismo de prueba.

6.4.2 Prueba de la Devianza.

Para confirmar la idoneidad del modelo de regresión logístico se aplica el estadístico devianza para comprobar la $H_0 =$ El modelo de regresión logística se ajusta a los datos experimentales. Se utiliza la sección correspondiente a la prueba de la devianza de la sintaxis para el diseño 3 del anexo 1 en el programa R para calcular un valor de p-value = 0.8849 asociado a este estadístico y confirmar el buen ajuste del modelo.

6.5 Resultados de la prueba en suelo artificial con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg)

Anteriormente se prepararon soluciones acuosas de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ para homogeneizar el suelo artificial y alcanzar las concentraciones en mg/kg reportadas en las figuras 6.26 a 6.30 donde también se presenta el comportamiento de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* en contacto con las muestras de suelo artificial a distintas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en mg/kg.

En la figura 6.26 se presenta con una muestra de suelo artificial a 4000 mg/kg donde se presentaron todo los organismos muertos y con pérdida en su coloración, en la figura 6.27 con una muestra a una concentración de 3000 mg/kg se presentan 4 organismos muertos y

con pérdida en coloración encerrados en un cuadro rojo, en la figura 6.28 con una muestra a una concentración de 2000 mg/kg se indican dentro de un rectángulo rojo dos organismos decolorados y muertos, en la figura 6.29 a una concentración de 500 mg/kg se presentan todos los organismos vivos con una coloración brillante y aglomeradas entre sí, el aglomeramiento de lombrices de tierra es un comportamiento característico de las lombrices de tierra vivas. En la figura 6.30 se presenta el blanco de suelo artificial con todos los organismos vivos. En la tabla 6.8 se presentan los resultados de la prueba con suelo artificial con $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg).



Figura 6.26 Con una muestra de $Pb(NO_3)_2$ a 4000mg/kg con todos los organismos muertos y con pérdida en su coloración.18



Figura 6.27 Con una muestra de $Pb(NO_3)_2$ a 3000mg/kg con 4 organismos muertos indicados en un rectángulo rojo.



Figura 6.28 Con una muestra de $Pb(NO_3)_2$ a 2000 mg/kg con 2 organismos muertos indicados en cuadrado rojo.



Figura 6.29 Con una muestra de $Pb(NO_3)_2$ a 500 mg/kg con todos los organismos vivos en una coloración brillante.



Figura 6.30 Con una muestra de suelo artificial con todos los organismos vivos en una coloración brillante.

Figuras de la 6.26 a la 6.30 con $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) a distintas concentraciones en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Tabla 6.8 Resultados de la prueba con suelo artificial en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg).

Distintas concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) para las pruebas en suelo artificial.	Cambios observados en las pruebas de suelo artificial.
4000.	Todos los organismos se encuentran muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, una coloración rojiza oscura e hinchazón en su estructura corporal.
3000.	Se encontraron 4 organismos muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, una coloración rojiza oscura e hinchazón en su estructura corporal. Los 2 restantes se presentaron vivos al responder lentamente al estímulo mecánico y con la presencia de enroscamiento y rigidez en su estructura corporal.
2000.	Se presentaron 2 organismos muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves, además de presentar enroscamiento, rigidez, una coloración rojiza oscura e hinchazón en su estructura corporal. Los 4 organismos restantes se encontraron vivos con una coloración rojiza y una estructura corporal blanda y húmeda.
500.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves y presentan una coloración rojiza oscura, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda. Las lombrices de tierra tienden a aglomerarse entre sí.
Blanco de suelo artificial.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves y presentan una coloración rojiza oscura, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda.

6.5.1 Aplicación del modelo logístico para la comprobación de la prueba de hipótesis y el cálculo de la CL₅₀

Al ingresar la sintaxis para el diseño 4 en el programa estadístico *R* Versión 2.14.0-2011 mostrada en el anexo 1 para la aplicación del modelo logístico a las concentraciones de la sal de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) en conjunto con los valores de la variable de respuesta se genera la tabla 6.9 donde en la primer columna se indica el valor de los predictores lineales estimados α y β y en la segunda columna se presenta el valor de p-value asociado a cada coeficiente mencionado para probar que el predictor correspondiente es igual a cero.

Tabla 6.9 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de Pb(NO₃)₂ (mg/kg).

Predictores.	Coefficientes estimados	p-value
α	-5.7576	1.86e-08
β	0.002218	7.5e-09

El modelo de regresión logística para la sal de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) se expresaría de la siguiente forma:

$$\log[\pi_{ij}(x)/1-\pi_{ij}(x)] = \alpha + \beta x_{ij} = -5.7576 + 0.0022 x_{ij} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.13}$$

i= 1,2...5.
j = 1,2...4.

Utilizando la prueba de hipótesis propuesta en el capítulo 5 (vuelta a enunciar de nueva cuenta en la ecuación 6.14) para verificar la dependencia de la concentración de la sal con la probabilidad de la mortalidad para una lombriz de tierra.

$$H_0 : \beta = 0 \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.14}$$

Y en conjunto con un valor indicado en la tabla 6.9 para β distinto de cero, con su respectivo valor de p-value asociado que es menor al α (nivel de significancia de 0.05 fijado por el programa *R*), se rehaza H_0 y se manifiesta la dependencia de la probabilidad en mortalidad

de la lombriz de tierra con la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) en la ecuación 6.13.

En la figura 6.31 se muestra la gráfica generada por el programa R al utilizar la sintaxis para el diseño 4 presentada en el anexo 1. La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales. En el eje y se presenta la mortalidad de las lombrices de tierra por muestra siendo de 1 a 6 por unidad experimental y en eje x la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg). La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales y representa a una función de regresión logística creciente al ser $\beta > 0$ lo que implica que $\pi(x)$ aumenta al incrementar x (la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg)) acorde a la ecuación 6.13.

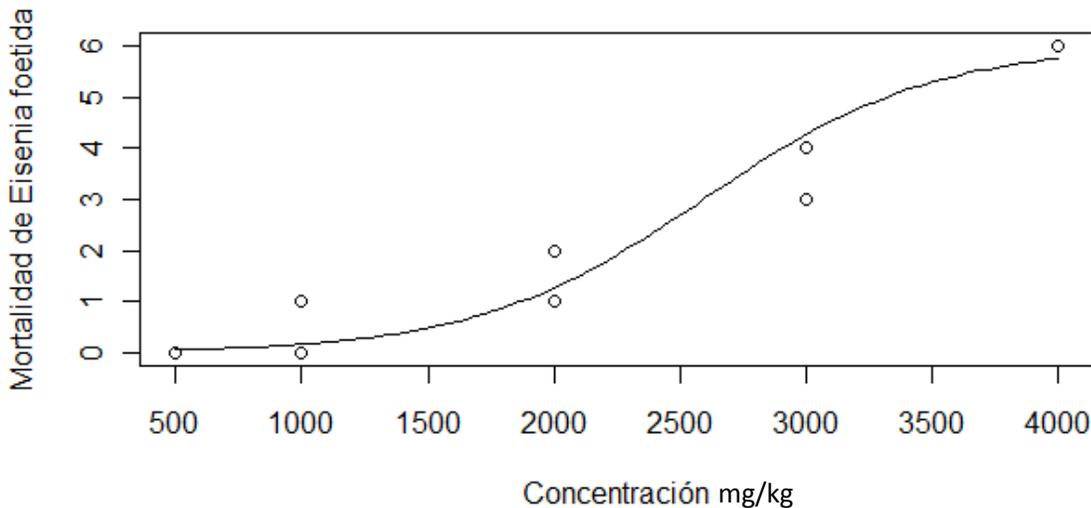


Figura 6.31 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* vs concentración de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) en muestra de suelo artificial.

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales estimados del modelo de regresión logístico ajustado y la ecuación 6.13.

$$CL_{50} = -\alpha / \beta = -(-5.7576)/0.0022 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.13}$$

Haciendo uso de la ecuación 6.13 se calcula la $CL_{50} = 2593.103$ mg/kg

Para determinar el intervalo de confianza se utiliza la ecuación 6.14 (Muhammad, 2009).

Error Estándar de $CL_{50} = (\text{Log } CL_{84} - \text{Log } CL_{16}) / (2N)^{0.5}$ Ecuación 6.14

Para determinar el CL_{84} y el CL_{16} se hace uso de la ecuación 6.13

Y el error estándar es de $CL_{50} = (\text{Log}2920.54 - \text{Log}2270.16) / (48)^{0.5} = 0.016 \text{ mg/kg}$

Así el intervalo del 95% de confianza para la $CL_{50} = 2593.103 \text{ mg/kg} \pm 0.016 \text{ mg/kg}$; (2593.087mg/kg-2593.119mg/kg) para la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 14 días.

El CL_{50} calculado en el presente bioensayo es un indicador de la peligrosidad de la sal $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) presente en la muestra de suelo artificial. Refiriéndonos a la tabla 4.11 encontramos que la concentración del Pb presente en las muestras de jales mineros sobrepasa el valor de la CL_{50} , ya que se encuentra en un intervalo de 2880 mg/kg a 4525.54 mg/kg. En el caso de que el metal Pb se encontrará en forma biodisponible y bioaccesible en los relaves mineros representaría un peligro para las lombrices de tierra.

Se comprueba la pericia del realizador del bioensayo ecotoxicológico y la adecuada aplicación del procedimiento indicado en la guía 207 para la evaluación de sustancias (OECD,1984) ya que el CL_{50} obtenido en esta tesis es de: (2593.087mg/kg-2593.119mg/kg) y el CL_{50} obtenido por Zhifeng y sus colaboradores, (2016) es de 2589 \pm 381 mg/kg para la sal de $Pb(NO_3)_2$ en un periodo de 14 días utilizando a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como organismo de prueba.

6.5.2 Prueba de la Devianza

Para confirmar la idoneidad del modelo de regresión logístico se aplica el estadístico devianza para comprobar la $H_0 =$ El modelo de regresión logística se ajusta a los datos experimentales. Se utiliza la sección correspondiente a la prueba de la devianza de la sintaxis 4 del anexo 1 en el programa R para calcular un valor de p-value= 0.978 asociado a este estadístico y confirmar el buen ajuste del modelo.

6.6 Resultados de la prueba en suelo artificial manteniendo constante la concentración del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) y variando la concentración de NaAsO_2 (mg/kg)

Anteriormente se prepararon soluciones acuosas de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y de NaAsO_2 para homogeneizar el suelo artificial y alcanzar las concentraciones en mg/kg reportadas en las figuras 6.32 a 6.36 se presenta el comportamiento de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* en contacto con las muestras de suelo artificial a distintas concentraciones de NaAsO_2 (mg/kg) y manteniendo constante en 500 mg/kg la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

En la figura 6.32 se presenta con una muestra de suelo artificial a 300 mg/kg de NaAsO_2 donde se presentaron todos los organismos muertos y degradados encerrados en un cuadro rojo, en la figura 6.33 con una muestra a una concentración de 200 mg/kg se presentan todos los organismos muertos y degradados encerrados en un cuadro rojo, en la figura 6.34 con una muestra a una concentración de 100 mg/kg se indican dentro de un rectángulo rojo dos organismos decolorados y vivos, en la figura 6.35 a una concentración de 25mg/kg se presentan todos los organismos vivos con una coloración brillante y aglomeradas entre sí. En todas las muestras anteriores se mantuvo constante la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en 500 mg/kg En la figura 6.36 se presenta el blanco de suelo artificial con todos los organismos vivos. En la tabla 6.10 se registran los resultados para la prueba mencionada.



Figura 6.32 Con una muestra de NaAsO_2 a 300 mg/kg y 500 mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con todos los organismos muertos y degradados.



Figura 6.33 Con una muestra de NaAsO_2 a 200mg/kg y 500 mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con todos los organismos muertos y degradados.



Figura 6.34 Con una muestra de NaAsO_2 a 100mg/kg y 500 mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con dos organismos vivos.



Figura 6.35 Con una muestra de NaAsO_2 a 25 mg/kg y 500mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con todos los organismos vivos.



Figura 6.36 Muestra de suelo artificial con todos los organismos vivos.

Figuras de la 6.32 a la 6.36 con NaAsO_2 (mg/kg) a diferentes concentraciones y a un valor constante para $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg).

Tabla 6.10 Resultados de la prueba en suelo artificial manteniendo constante la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en 500 mg/kg y variando la concentración de NaAsO_2 (mg/kg).

Distintas concentraciones de NaAsO_2 (mg/kg) para las pruebas en suelo artificial.	Cambios observados en las pruebas de suelo artificial.
300.	Todos los organismos se encuentran muertos presentando un estado de descomposición con ruptura de segmentos y sequedad en su estructura corporal.
200.	Todos los organismos se encuentran muertos presentando un estado de descomposición con ruptura de segmentos, disminución y sequedad de su estructura corporal.
100.	Se encuentran 2 organismos vivos al responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan una coloración rojiza oscura y una estructura corporal blanda y húmeda. .
25.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves y presentan una coloración rojiza oscura, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda. Las lombrices de tierra tienden a aglomerarse entre sí.
Muestra de suelo artificial.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves y presentan una coloración rojiza oscura, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda. Las lombrices de tierra tienden a aglomerarse entre sí.

6.6.1 Aplicación del modelo logístico para la comprobación de la prueba de hipótesis y el cálculo de la CL₅₀

Al ingresar la sintaxis para el diseño 5 en el programa estadístico R Versión 2.14.0-2011 mostrada en el anexo 1 para la aplicación del modelo logístico a las concentraciones de la sal de NaAsO₂ (mg/kg) y manteniendo constante la concentración de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) en 500 mg/kg en conjunto con los valores de la variable de respuesta (mortalidad de la lombriz de tierra) se genera la tabla 6.11 donde en la primera columna se indica el valor de los predictores lineales estimados α y β y en la segunda columna se presenta el valor de p-value asociado a cada coeficiente mencionado para comprobar que el predictor correspondiente es igual a cero.

Tabla 6.11 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de NaAsO₂ (mg/kg) con un valor constante de 500 (mg/kg) para la sal de Pb(NO₃)₂.

Predictores.	Coefficientes estimados	p-value
α	-2.73	1.30e-07
β	0.028227	1.87e-07

El modelo de regresión logística para la sal de NaAsO₂ (mg/kg) con un valor constante para Pb(NO₃)₂(mg/kg) se expresaría de la siguiente forma:

$$\log[\pi_{ij}(x)/1-\pi_{ij}(x)] = \alpha + \beta x_{ij} = -2.73 + 0.0028 x_{ij} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.15}$$

$$i = 1,2,3\dots5.$$

$$j = 1,2,3..4.$$

Utilizando la prueba de hipótesis propuesta en el capítulo 5 (vuelta a enunciar de nueva cuenta en la ecuación 6.16) para verificar la dependencia de la concentración de la sal con la probabilidad en mortalidad de una lombriz de tierra.

$$H_0 : \beta = 0 \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.16}$$

Y en conjunto con un valor indicado en la tabla 6.11 para β distinto de cero, con su respectivo valor de p-value asociado que es menor al α (nivel de significancia de 0.05), se rehaza H_0 y

se manifiesta la dependencia de la probabilidad en mortalidad de la lombriz de tierra con la concentración de la sal NaAsO_2 (mg/kg) con un valor constante para $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) en la ecuación 6.15.

En la figura 6.37 se muestra la gráfica generada por el programa *R* al utilizar la sintaxis 5 presentada en el anexo 1. En el eje *y* se presenta la mortalidad de las lombrices de tierra por muestra siendo de 1 a 6 por unidad experimental y en eje *x* la concentración de la sal de NaAsO_2 (mg/kg).La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales y representa a una función de regresión logística creciente al ser $\beta > 0$ lo que implica que $\pi(x)$ aumenta al incrementar *x* (la concentración de la sal de NaAsO_2 (mg/kg) en conjunto con un valor constante para la sal de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) acorde a la ecuación 6.15.

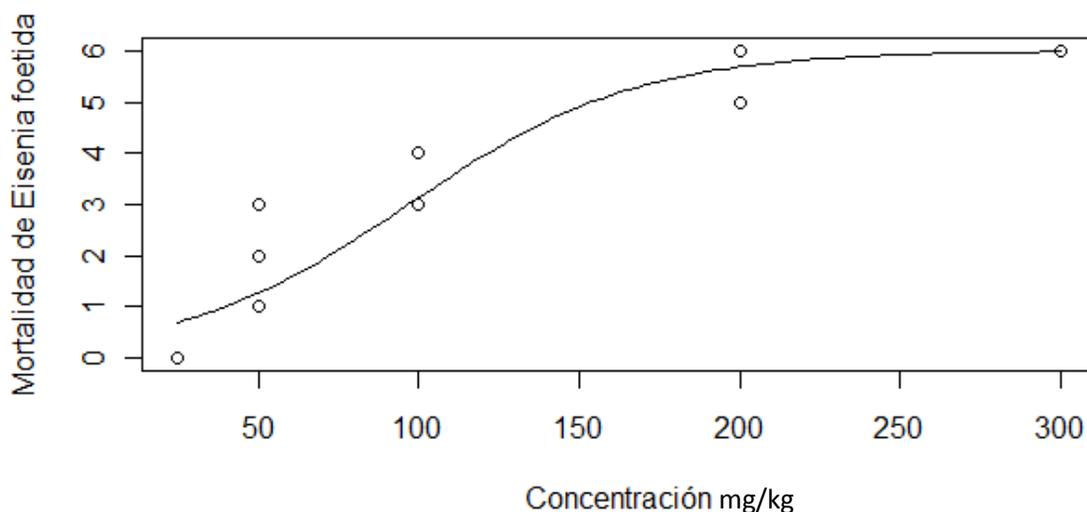


Figura 6.37 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* vs concentración para la sal de NaAsO_2 (mg/kg) y manteniendo constante la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_3$ (mg/kg) en una muestra de suelo artificial.

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales estimados del modelo de regresión logístico ajustado y la ecuación 6.17.

$$CL_{50} = -\alpha / \beta = -(-2.73)/0.028 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.17}$$

Haciendo uso de la ecuación 6.17 se calcula la $CL_{50} = 97.0015$ mg/kg

Para determinar el intervalo de confianza se utiliza la ecuación 6.18 (Muhammad, 2009).

Error Estándar de $CL_{50} = (\text{Log } CL_{84} - \text{Log } CL_{16}) / (2N)^{0.5}$ Ecuación 6.18

Para determinar el CL_{84} y el CL_{16} se hace uso de la ecuación 6.15

Y el error estándar es de $CL_{50} = (\text{Log } 122.22 - \text{Log } 71.20) / (48)^{0.5} = 0.034 \text{ mg/kg}$

Así el intervalo del 95 % de confianza para la $CL_{50} = 97.0015 \text{ mg/kg} \pm 0.034 \text{ mg/kg}$; $(96.9675 \text{ mg/kg} - 97.0355 \text{ mg/kg})$ utilizando a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 14 días en una mezcla de NaAsO_2 (mg/kg) y manteniendo constante la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg).

El valor de la CL_{50} es un indicador numérico de la peligrosidad de la mezcla de NaAsO_2 (mg/kg) con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) en la muestra de suelo artificial. Se pone de manifiesto una reducción del valor del $CL_{50} = (96.9675 \text{ mg/kg} - 97.0355 \text{ mg/kg})$ para la sal de NaAsO_2 (mg/kg) en el caso de estar combinada con el compuesto $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) respecto a que si estuviera de forma individual $CL_{50} = (258.3319 \text{ mg/kg} - 258.396 \text{ mg/kg})$. Las concentraciones de As en las muestras de jal minero oscilan entre 202.5 mg/kg a 659.51 mg/kg siendo superiores al CL_{50} obtenido en este bioensayo lo que indicaría un peligro para las lombrices de tierra en el caso de que el metaloide estuviera en forma biodisponible y bioaccesible.

6.6.2 Prueba de la Devianza

Para confirmar la idoneidad del modelo de regresión logístico se aplica el estadístico devianza para comprobar la $H_0 =$ El modelo de regresión logística se ajusta a los datos experimentales. Se utiliza la sección correspondiente a la prueba de la devianza de la sintaxis 5 del anexo 1 en el programa R para calcular un valor de p-value= 0.760 asociado a este estadístico y confirmar el buen ajuste del modelo.

6.7 Resultados de la prueba con suelo artificial manteniendo constante la concentración de NaAsO_2 (mg/kg) y variando la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg)

Anteriormente se prepararon soluciones acuosas de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y de NaAsO_2 para homogeneizar el suelo artificial y alcanzar las concentraciones en mg/kg reportadas en la tabla 6. 5. En las figuras 6.38 a 6.42 se presenta el comportamiento de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* en contacto con las muestras de suelo artificial a distintas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) y manteniendo constante en 50 mg/kg la concentración de NaAsO_2 .

En la figura 6.38 se presenta con una muestra de suelo artificial a 3000mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ donde se presentaron todo los organismos muertos y degradados encerrados en un cuadro rojo, en la figura 6.39 con una muestra a una concentración de 2000 mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ se presentan todos los organismos muertos y encerradas en un cuadro rojo, en la figura 6.40 con una muestra a una concentración de 1000 mg/kg se indican dentro de un rectángulo rojo cuatro organismos decolorados y muertos, en la figura 6.41 a una concentración de 250 mg/kg se presentan todos los organismos vivos con una coloración brillante y aglomerados entre sí. En todas las muestras anteriores se mantuvo constante la concentración de NaAsO_2 en 50 mg/kg En la figura 6.42 se presenta el blanco de suelo artificial con todos los organismos vivos.



Figura 6. 28 Muestra de NaAsO_2 a 50mg/kg y 3000mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con todos los organismos muertos.



Figura 6. 29 Muestra de NaAsO_2 a 50mg/kg y 2000mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con todos los organismos muertos.



Figura 6. 30 Muestra de NaAsO_2 a 50 mg/kg y 1000 mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con 4 organismos muertos.



Figura 6. 31 Muestra de NaAsO_2 a 50mg/kg y 250 mg/kg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con todos los organismos vivos.



Figura 6. 32 Muestra de suelo artificial con todos los organismos vivos.

Figuras de la 6.38 a la 6.42 con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a diferentes concentraciones y con un valor constante de NaAsO_2 (mg/kg) en una muestra de suelo artificial en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Tabla 6.12 Resultados de la prueba en suelo artificial manteniendo constante la concentración de NaAsO_2 en 50 mg/kg y variando la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en mg/kg.

Distintas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en mg/kg para las pruebas en suelo artificial.	Cambios observados en las pruebas de suelo artificial.
3000.	Todos los organismos se encuentran muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, una coloración rojiza oscura e hinchazón en su estructura corporal.
2000.	Todos los organismos se encuentran muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, una coloración rojiza brillante e hinchazón en su estructura corporal.
1000.	Se encuentran 4 organismos muertos al no responder a estímulos mecánicos suaves. Presentan enroscamiento, rigidez, una coloración rojiza brillante e hinchazón en su estructura corporal.
250.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves y presentan una coloración rojiza brillante, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda. Las lombrices de tierra tienden a aglomerarse entre sí.
Muestra de suelo artificial.	Todos los organismos se encuentran vivos al responder a estímulos mecánicos suaves y presentan una coloración rojiza brillante, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda. Las lombrices de tierra tienden a aglomerarse entre sí.

6.7.1 Aplicación del modelo logístico para la comprobación de la prueba de hipótesis y el cálculo de la CL₅₀

Al ingresar la sintaxis para el diseño 6 en el programa estadístico R Versión 2.14.0-2011 mostrada en el anexo 1 para la aplicación del modelo logístico a las concentraciones de la sal de Pb(NO₃)₂(mg/kg) y manteniendo constante la concentración de NaAsO₂(mg/kg) en 50 mg/kg en conjunto con los valores de la variable de respuesta se genera la tabla 6.13 donde en la primer columna se indica el valor de los predictores lineales estimados α y β y en la segunda columna se presenta el valor de p-value asociado a cada coeficiente mencionado para probar que el predictor correspondiente es igual a cero.

Tabla 6.13 Valores obtenidos al aplicar el modelo logístico a la sal de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) con un valor constante de 50 mg/kg para la sal de NaAsO₂ (mg/kg).

Predictores.	Coefficientes estimados.	p-value
A	-2.5700395	3.59e-07
B	0.0027922	3.20e-07

El modelo de regresión logística para la sal de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) con un valor constante para NaAsO₂(mg/kg) se expresaría de la siguiente forma:

$$\log[\pi_{ij}(x)/1-\pi_{ij}(x)] = \alpha + \beta x_{ij} = -2.57 + 0.00279 x_{ij} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.19}$$

i = 1, 2, 3...5.
j = 1, 2, 3...4.

Utilizando la prueba de hipótesis propuesta en el capítulo 5 (vuelta a enunciar de nueva cuenta en la ecuación 6.20) para verificar la dependencia de la concentración de la sal con la probabilidad de mortalidad para una lombriz de tierra.

$$H_0 : \beta = 0 \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.20}$$

Y en conjunto con un valor indicado en la tabla 6.13 para β distinto de cero, con su respectivo valor de p-value asociado que es menor al α (nivel de significancia de 0.05), se rehaza H₀ y

se manifiesta la dependencia de probabilidad de mortalidad para la lombriz de tierra con la concentración de la sal $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) con un valor constante para $NaAsO_2$ (mg/kg) en la ecuación 6.19.

En la figura 6.43 se muestra la gráfica generada por el programa R al utilizar la sintaxis para el diseño 6 presentada en el anexo 1. En el eje y se presenta la mortalidad de las lombrices de tierra por muestra siendo de 1 a 6 lombrices por unidad experimental y en el eje x la concentración de la sal de $NaAsO_2$ (mg/kg).La curva en negro indica el ajuste del modelo logístico a los datos experimentales y representa a una función de regresión logística creciente al ser $\beta > 0$ lo que implica que $\pi(x)$ aumenta al incrementar x (la concentración de la sal de $Pb(NO_3)_2$ (mg/kg) en conjunto con un valor constante para la sal de $NaAsO_2$ (mg/kg)) acorde a la ecuación 6.19.

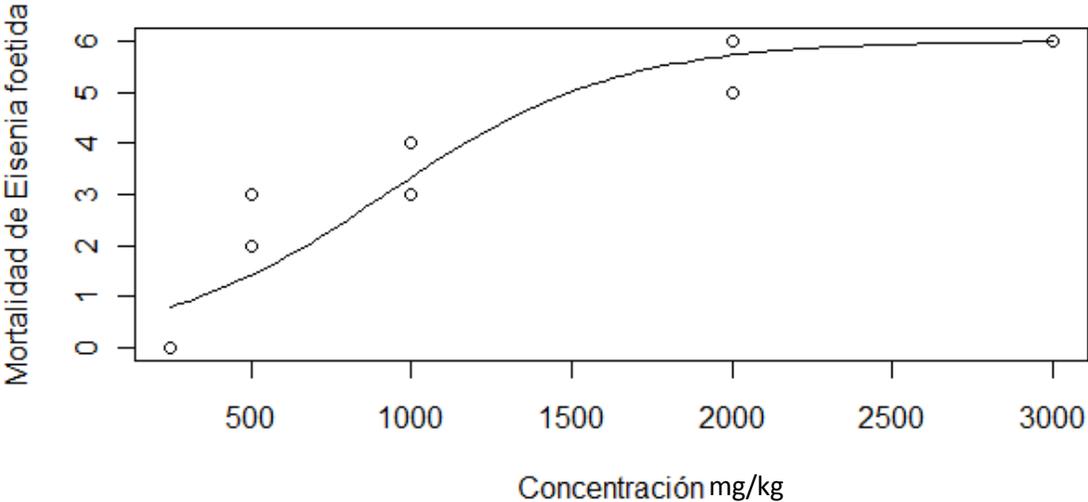


Figura 6.43 Gráfica de mortalidad de lombriz de tierra Eisenia foetida vs concentración de la sal $Pb(NO_3)_2$ y manteniendo constante la concentración de $NaAsO_2$ (mg/kg) en una muestra de suelo artificial.

Para calcular la CL_{50} se utilizan los parámetros lineales del modelo de regresión logístico y la ecuación 6.21.

$$CL_{50} = -\alpha / \beta = -(-2.57) / 0.00279 \dots \dots \dots \text{Ecuación 6.21}$$

Haciendo uso de la ecuación 6.21 se calcula la $CL_{50} = 920.4269$ mg/kg

Para determinar el intervalo de confianza se utiliza la ecuación 6.22 (Muhammad, 2009).

Para determinar el CL_{84} y el CL_{16} se hace uso de la ecuación 6.19

Y el error estándar es de $CL_{50} = (\text{Log}1179.21 - \text{Log}662.72) / (48)^{0.5} = 0.036 \text{ mg/kg}$

Así el intervalo del 95 % de confianza para la $CL_{50} = 920.4269 \text{ mg/kg} \pm 0.036 \text{ mg/kg}$; (942.3902mg/kg-940.4629mg/kg) para la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en un periodo de 14 días en una mezcla de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) con un valor constante de NaAsO_2 (mg/kg).

El valor de CL_{50} se puede interpretar como un indicador de la peligrosidad de la mezcla de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) con NaAsO_2 (mg/kg) en la muestra de suelo artificial. El citado CL_{50} es menor que las concentraciones de Pb encontradas en las muestras de jales mineros y reportadas en la tabla 4.1 que se encuentran en un intervalo de 2880 mg/kg a 4525.54 mg/kg. Se interpreta que en el caso de tener al metal Pb en forma biodisponible y bioaccesible en las muestras de relaves mineros representaría un peligro para las lombrices de tierra.

También se manifiesta una disminución en el $CL_{50} = (942.3902\text{mg/kg}-940.4629\text{mg/kg})$ de la sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) combinada con NaAsO_2 (mg/kg) respecto si se encontrará de forma individual $CL_{50} = (2593.087\text{mg/kg}-2593.119\text{mg/kg})$.

6.7.2 Prueba de la Devianza

Para confirmar la idoneidad del modelo de regresión logístico se aplica el estadístico devianza para comprobar la $H_0 =$ El modelo de regresión logística se ajusta a los datos experimentales. Se utiliza la sección correspondiente a la prueba de la devianza de la sintaxis para el diseño 6 del anexo 1 en el programa R para calcular un valor de p-value= 0.719 asociado a este estadístico y confirmar el buen ajuste del modelo.

6.8 Resultados de las pruebas en muestras de jales de mina la Prieta en Hidalgo del Parral Chihuahua

En las figuras 6.44 a 6.50 se presentan los ensayos ecotoxicológicos haciendo uso de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como organismo de prueba realizados con las muestras de jales. Los puntos HP están codificados para las concentraciones de Pb y de As en la tabla 4.11. En las figuras 6.44 a 6.50 se presenta la no mortalidad de las lombrices de tierra después de haber sido expuestas a las muestras de jales mineros por un periodo de 2 meses. En la tabla 6.14 se presentan los resultados para las pruebas mencionadas.



Figura 6.44 Muestra de jal minero del punto de HP2 con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.

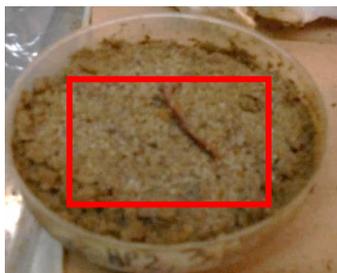


Figura 6.45 Muestra de jal minero del punto HP3 con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.

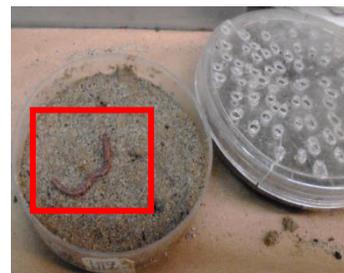


Figura 6.46 Muestra de jal minero del punto HP5 con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.



Figura 6.47 Muestra de jal minero del punto HP7 con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.



Figura 6.48 Muestra de jal minero del punto HP16 con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.



Figura 6.49 Muestra de jal minero del punto HP17 con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.



Figura 6.50 Blanco de suelo artificial con una lombriz de tierra *Eisenia foetida* viva.

Figuras de la 6.44 a la 6.50 con distintas muestras de jales mineros en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Tabla 6.14 Resultados en pruebas ecotoxicológicas con lombriz de tierra *Eisenia foetida* aplicando muestras de jales de mina la Prieta en Hidalgo del Parral Chihuahua.

Muestra de jal minero con la clave HP correspondiente.	Cambios observados en las pruebas con jales mineros.
HP2	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda.
HP3	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante y una estructura corporal blanda y húmeda.
HP5	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante y una estructura corporal blanda y húmeda.
HP7	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda.
HP16	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante y una estructura corporal blanda y húmeda.
HP17	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante y una estructura corporal blanda y húmeda.
Blanco de suelo artificial.	La lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> se encuentra viva al responder a estímulos mecánicos suaves y presenta una coloración rojiza brillante, enroscamiento y una estructura corporal blanda y húmeda.

En el caso de las muestras de jales mineros no se presenta mortalidad para las lombrices de tierra *Eisenia foetida* en ninguno de los casos estudiados. Ni tampoco evidencia de presencia visual de efectos tóxicos en la estructura corporal de los organismos sometidos a los bioensayos ecotoxicológicos al término de 2 meses de estar en contacto con las muestras de jales mineros. Caso distinto a todos los demás bioensayos ecotoxicológicos donde las sales de NaAsO_2 y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ se encuentran en forma soluble, biodisponible y bioaccesible para las lombrices de tierra *Eisenia foetida*.

El resultado anterior indica que la biodisponibilidad del metaloide As y del metal Pb presentes en las muestras de jales mineros en la mina la Prieta en Hidalgo del Parral Chihuahua no es suficiente para causar la mortalidad de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* ni tampoco para provocar efectos tóxicos observables bajo las condiciones de una humedad del 45 % y a los pH indicados en la tabla 4.4. Caso contrario a los bioensayos ecotoxicológicos en presencia de las sales de NaAsO_2 mg/kg y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg donde en ambos casos los compuestos mencionados se encuentran en forma soluble y biodisponible para los organismos estudiados ocasionando su mortalidad y la presencia de efectos tóxicos observables.

Las pruebas realizadas con las sales de NaAsO_2 mg/kg y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg/kg tanto en forma individual como combinada en las muestras de suelo artificial demuestran que concentraciones menores del metaloide As y del metal Pb respecto a las encontradas a las muestras de jales mineros causan un efecto tóxico refleja en la mortalidad de las lombrices de tierra y por ende en primera instancia se podría pensar en el peligro de los jales mineros. Aunque son los valores de los pH de la tabla 4.4 ocasionados por la presencia de minerales amortiguadores (Barraza, 2015) para las muestras de jales la clave para entender la no mortalidad de las lombrices de tierra puesto que siendo todos ellos neutros o ligeramente básicos no permiten que ni el As ni el Pb se encuentren en una forma lo suficientemente biodisponible para los organismos estudiados. Sólo bajo el evento de que se presentará lluvia ácida sobre la zona de estudio el metaloide As y el metal Pb podrían lixiviar y encontrarse en forma biodisponible originando un peligro para los organismos estudiados. Pero en la región de la mina la Prieta en Hidalgo del Parral Chihuahua las lluvias son tan escasas que se encuentran entre los 300 y 500 mm anuales respecto a los 625 mm promedio de la Ciudad de México (CONEVyT, 2014). No se encontró evidencia en la bibliografía de que se presente lluvia ácida en la zona de estudio.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a la revisión bibliográfica en los últimos 50 años se han realizado estudios con el uso de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* para manejos ambientales denominados como vermicomposteo. Así mismo, en los últimos 30 años países como China, India, Chile, España y Colombia han realizado estudios ecotoxicológicos involucrando a estos organismos de prueba. Por otro lado, en los últimos 10 años en países como Chile se han puesto a la vanguardia en cuanto a estudios ecotoxicológicos utilizándolos en evaluaciones en muestras de jales mineros.

Derivado de la investigación en cuanto a las leyes y reglamentos, se encontró que en la NORMA-141-SEMARNAT-2003 se establece un método de extracción de metales y metaloides a partir de jales mineros, cuyo objetivo es determinar su peligrosidad basados en la comparación de la concentración de dicho extracto con los valores establecidos en la NOM-052-SEMARNAT-2005.

Se utilizó un diseño completamente al azar para exponer a las lombrices de tierra *Eisenia foetida* al metal Pb y al metaloide As en diferentes unidades experimentales. Los bioensayos realizados fueron los siguientes: prueba en papel filtro con NaAsO_2 (ac) y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (ac) de forma individual, prueba en muestras de suelo artificial con NaAsO_2 (mg/kg) y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) de forma individual y posteriormente de manera combinada manteniendo constante el valor de la concentración de una de ellas. En todos los casos estudiados con la aplicación del modelo logístico se demostró la dependencia de la mortalidad de la lombriz de tierra con la concentración de las sales estudiadas. El mismo modelo se utilizó para determinar la CL_{50} para cada sal en todos los bioensayos efectuados.

El mismo diseño experimental se utilizó para realizar la prueba ecotoxicológica con las muestras de jales mineros. Y a diferencia de los bioensayos con las sales de NaAsO_2 y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no se presentó mortalidad en las lombrices de tierra *Eisenia Foetida* ni signos de toxicidad visuales al término de extender la prueba por 2 meses. Lo anterior pone de manifiesto una diferencia en la biodisponibilidad y bioaccesibilidad del metaloide As y metal Pb presentes en las muestras de jales mineros respecto a las muestras de suelo artificial.

Considerando que los bioensayos con las muestras de jal minero son a nivel laboratorio y no resultan ser equiparables al ecosistema de la mina la Prieta de Hidalgo del Parral se concluye que el grado en que son absorbidos los contaminantes metálicos presentes en dichos jales por las lombrices de tierra *Eisenia foetida* no es el requerido para que se presenten efectos tóxicos observables en estos organismos.

Los resultados de ecotoxicidad utilizando a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* con las muestras de jales mineros obtenidos en el presente trabajo de tesis son complementarios al conjunto de estudios de la NOM-141-SEMARNAT-2003 para determinar su toxicidad y peligrosidad. Cabe mencionar que los estudios mencionados en la citada norma no involucran la evaluación de la ecotoxicidad en base a la interacción de un organismo de prueba con la muestra del jal minero ya que sólo se basa en una cuantificación y caracterización química.

Como recomendación a este trabajo se propone realizar extracciones del metaloide As y del metal Pb a partir de las muestras de jales mineros según lo establecido en la NOM-141-SEMARNAT-2003 y efectuar nuevos bioensayos ecotoxicológicos con estos extractos para comprobar lo ocurrido con las muestras de suelo artificial.

Finalmente la hipótesis en donde se plantea que “La exposición de las muestras de jales mineros de la mina La Prieta en Hidalgo del Parral, Chihuahua, a la lombriz de tierra *Eisenia foetida* pueden causar su mortalidad” se rechaza dado que los organismos permanecieron vivos durante las pruebas efectuadas en el laboratorio. Se concluye que bajo las condiciones en las que se encuentran los relaves mineros no representan un peligro para las lombrices de tierra.

REFERENCIAS.

- Adriano, D. (2004). Juego de la atenuación natural en remediación ambiental. Revista *Geoderma*(122), pag.121-122.
- Agresti, A. (2007). *Una introducción al análisis de datos categóricos*. Nueva York: Jhon Wiley and Sons, pag. 37-42.
- Alexander, M. (2000). Biodisponibilidad sobreestimación de riesgo ambiental de contaminante. *Ciencias Ambientales y Tecnologia*, 34, pag. 4259-4265.
- Annette, J. (2002). *Una introducción a los modelos lineales generalizados*. Nueva York: Chapman and Hall, pag. 78-83.
- Barnthouse, L. W. (2000). *Métodos para Toxicología Ecologica*. Nueva York: Ann.Arbor.Sci, pag. 112-116.
- Barraza , L. A. (2015). *Evaluación de la Contaminación del suelo por arsénico, plomo y mercurio en la zona de presa de jales de mina la prieta en Hidalgo del Parral, Chihuahua.Tesis de Maestria en Ing. Ambiental Posgrado en Ingeniería UNAM*. México D.F.
- Bori, J. (2015). Geoquímica y tratamientos ambientales de suelos de una mina de mercurio. *Ciencias Ambientales e Investigación en contaminación.*, pag 41-54.
- Braz, J. (2011). Estimación de la Toxicidad combinada en Mezclas de Furadan y Monofos sobre *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotox-Brazil*, 23-29.
- Cañadas, J.L. (2013). Regresión Logística. Tratamiento computacional con R. Tesis de Maestría en Estadística Aplicada. Universidad de Granada. España, pag. 71-73.
- Capó, M. M. (2007). *Principios de Ecotoxicología*. Ed. Tebar. Madrid, España.pág.56.
- Collet, D. (2003). Análisis de Datos Binarios. (Segunda edición), Ed. Champan y Hall, Nueva York, pág. 64-68.

CONEVyT .(2014). Clasificación y distribución de los climas en México. Antología.

Unidad 4. Lectura 4.13. Consejo Nacional de Educación para la vida y el Trabajo.

Rescatado de Internet el 02-05-2014 en:

http://www.conevy.org.mx/cursos/cursos/cnaturales_v2/interface/main/recursos/antología/cnant_4_13.htm.

Cuevas, D. (2006). Respuesta de *Esenia foetida* a TPH'S y pireno en pruebas agudas. *Congreso de Ecotoxicología y Química Ambiental*, pag.78.

Dallal, G. (2012). *El pequeño libro de Estadística práctica*.Ed. Iberoamerica. Nueva York. pag. 34-36.

Díaz, A. (2013). *Estadística aplicada*.Ed MC Graw Hill. México D.F. pag. 26-28.

Díaz, M. C. (2004). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de calidad*. México: IMTA.

Dorn, P. (2008). Prueba de toxicidad de aceites en suelo usando lombrices de tierra. *Quimioatmósfera*, 845-860.

Edwards, C. (1992). El uso de lombrices de tierra en el manejo ambiental. *Biología y Bioquímica del Suelo*, 1683-1689.

Fathallahzadeh, H. (2014). Especiación de metales en sedimentos contaminados de Oskarshamn Suecia. *Revista de contaminación ambiental*, 2455-2464.

Fragoso, G. (2012). Las lombrices de tierra en México: diversidad, distribución y manejo. *II Simposium Internacional y Reunión Nacional de Lombricultura*, pag 322-326.

Galán, H., & Romero, B. A. (2000). Conferencia contaminación del suelo por metales pesados., (págs. 72-64).

Gonzalez S. F. (2016). *Tesis Propuestas para el aprovechamiento de residuos metalúricos no ferrosos*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Harmsen, J. (2007). Medida de la biodisponibilidad desde una aproximación científica a métodos estandares. *Revista de calidad ambiental*, 36, pag. 1420-1428.

Hosmer, D.W y Lemeshow,S. (2000). Regresión Logística Aplicada, (Segunda edición), Ed. Wiley, Nueva York, pág. 147-152.

ISO. (2001). Guía para determinar la calidad del suelo y caracterización toxicologica de materiales. . *Organización Nacional para la Estandarización*, pag 30.

Jaian, K. (2004). Modulación por vermicomposteo. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, pag.89-94.

Jager, S. (2003).Ensayos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad para matrices metálicas. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, pág 680-689.

Jansch, S. (2005). Identificación de los requerimientos ecológicos de importancia terrestre en pruebas ecotoxicologicas. *Analís Ambiental*, pag. 51-82.

Kaplan, D. R. (1980). Requerimientos fisicoquimicos en el ambiente para la lombriz *Eisenia foetida*. *Biología y Bioquímica de Suelos*, 347-352.

Lima , E. (16 de Febrero de 2012). *Mina la Prieta; Gobierno del Estado de Chihuahua*. Recuperado el 22 de septiembre de 2015, de <http://www.turismoporlaregion.com.mx>

Medrano, L. (2010). Análisis de datos categóricos. Informe UNAM. México D.F. 41-43.

Menchaca, A. (2015). Evaluación de la contaminación de suelo por arsénico (As) y plomo (Pb) en la zona minera de Parral Chihuahua mediante espectroscopia de absorción atómica.Tesis de Licenciatura en Química UNAM. México D.F.

Montgomery, C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos* (segunda ed.). Ed.Iberoamerica, Estados Unidos. pag.1-39.

Moriarty, F. (2007). *El estudio de los contaminantes en ecosistemas*. Ecotoxicología, Ed. Medios academicos. España, pag. 289-293.

Muro, R. (2013). La Minería mexicana, su evolución, retos y persepectivas. Minería de México, Ed. Trillas. México,pág. 24-27.

Muhammad, A. (2009). Cálculo del valor la CL_{50} a partir del método de Miller y Tainter. Revista Médica J Ayub, pág. 184-185.

Neuhauser, E. (2000). Toxicidad de los metales a la lombriz de tierra Eisenia foetida. *Biología y Fertilidad de suelos.*, pág. 149-152.

OECD. (1984). Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. Pruebas de Toxicidad para lombrices de tierra número 207. *OECD-Guideline*.

Pallavi, K. (2013). Ecotoxicidad de arsenito de sodio sobre Eisenia foetida. *Revista Internacional de Farmacia y Biociencias*, pág. 483-491.

Peña , R. (2008). *Fundamentos de Estadística* (3ed.), Ed. Reverte, México,pág.89-92.

Pereira, M. ., (2003). Vermicomposteo como Material Adsorbente Natural. *Sociedad Química*, pág.39-47.

Rauret, G. (1999). Mejoras en los pasos secuenciales del procedimiento de extracción para la certificación de nuevos sedimentos y suelo. *Revista de monitoreo ambiental*, pág. 57-61.

Rodríguez Vazquéz, L., Ferman Ávila, H., Torres Carrillo, E., & Sáenz Macías, L. (2010). Caracterización de muestras de suelo superficial y análisis de la distribución de metales pesados en Parral Chihuahua. *Ciencias Ambientales e Ingeniería*, 12-17.

Rodríguez, L. (2010). Caracterización de muestras de suelo superficial y análisis de la distribución de metales pesados en Parral Chihuahua. *Revista de Ciencias Ambientales e Ingeniería*, pág. 12-17.

Sheather, S.J (2009). Una moderna aproximación a la Regresión con R., Ed. Board, Estados Unidos, pág. 263-272.

Templeton, D. M. (2000). Química Pura y Aplicada. *Revista de Química*, pag.1453.

Truhaut, R. (1975). Ecotoxicología una nueva rama de la toxicología. *Investigación en Toxicología Ecológica*, pag.50-54.

Varga, A. (2002). *Métodos Multivariantes en Bioestadística*. Ed. Cera ,Colombia, pag 204-210.

Yates, D. (2003). *La practica de la Estadística*(segunda ed.) Ed. Freeman, Estados Unidos, pag. 128-130.

Zhifeng, W., Lei, L., & Zhaujie, C. (2016). Toxicidad y respuesta bioquímica de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* expuesta a suelo contaminado: Efecto de las especies de arsénico. *Quimiosfera*, pag. 161-170.

ANEXO 1

Código de programación que se elaboró en el software R versión 3.2.3, para el análisis estadístico.

Sintaxis para el Diseño 1 con el factor concentración NaAsO₂(ac).

```
setwd("E:/Logistico")
datos<-read.table('Ac2.txt',header=T)
datos
attach(datos)
Mortalidad
Concentración
names(datos)
is.numeric(Mortalidad)
is.factor(Concentración)
plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ", xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
M1 <- glm(cbind(Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family = binomial(link="logit"))
summary(M1)
b0.est<-coef(M1)[1]
b1.est<-coef(M1)[2]
b0.est
b1.est
curve(plogis(b0.est+b1.est*x),ad=T)
LD50<--coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
LD50
###Usar estadística Hosmer Lemeshow para bondad de ajuste del modelo.
### valores grandes del pvalue mejor modelo
hosmerlem = function(y, yhat, g=10) {
  cutyhat = cut(yhat,
breaks = quantile(yhat, probs=seq(0,
1, 1/g)), include.lowest=TRUE)
  obs = xtabs(cbind(1 - y, y) ~ cutyhat)
  expect = xtabs(cbind(1 - yhat, yhat) ~ cutyhat)
  chisq = sum((obs - expect)^2/expect)
  P = 1 - pchisq(chisq, g - 2)
  return(list(chisq=chisq,p.value=P))
}
```

```
HLgof.test(fit = fitted.values(M1), obs =Mortalidad,ngr=10)
```

Resultados para el diseño 1 con el factor concentración NaAsO₂(ac)

```
setwd("E:/Logistico")
> datos<-read.table('Ac2.txt',header=T)
> datos
  Concentración Mortalidad
1             0.6           1
2             0.6           1
3             0.6           1
4             0.6           1
5             0.4           1
6             0.4           1
7             0.4           1
8             0.4           1
9             0.3           1
10            0.3           1
11            0.3           1
12            0.3           0
13            0.2           1
14            0.2           0
15            0.2           0
16            0.2           0
17            0.1           0
18            0.1           0
19            0.1           0
20            0.1           0
> attach(datos)

  Concentración, Mortalidad
> Mortalidad
[1] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0
> Concentración
[1] 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.4 0.4 0.4 0.4 0.3 0.3 0.3 0.3 0.2 0.2 0.2 0.2 0.1 0.1 0.1
[20] 0.1
> names(datos)
[1] "Concentración" "Mortalidad"
> is.numeric(Mortalidad)
[1] TRUE
> is.factor(Concentración)
[1] FALSE
> plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ", xlab="Concentración",yла
b="Mortalidad de Eisenia foetida" )
> M1 <- glm(cbind(Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family = binomial(link="logit"))
> summary(M1)
```

```
Call:
glm(formula = cbind(Mortalidad) ~ Concentración, family = binomial(link = "logit"),
    data = datos)
```

```
Residuales de la Devianza:
  Mínimo      1Q  Mediana      3Q   Máximo
-1.78882 -0.17930  0.01152  0.17927  1.78865
```

```
Coefficientes:
      Estimado  Error Estándar.  z value  Pr(>|z|)
(Intercepto)  -6.871          3.315     -2.072  0.0382 *
Concentración  27.484         12.825      2.143  0.0321 *
```

```
---
Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

(Parámetro de dispersión para una familia binomial es igual a 1)

```
Devianza Nula: 26.9205 con 19 grados de libertad
Devianza residual: 9.3637 con 18 grados de libertad
AIC: 13.364
```

Número de iteraciones de Fisher: 7

```
> b0.est<-coef(M1)[1]
> b1.est<-coef(M1)[2]
> b0.est
(Intercepto)
-6.87092
> b1.est
Concentración
27.48443
> curve(plogis(b0.est+b1.est*x),ad=T)
> LD50<-coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
> LD50
(Intercepto)
0.2499932
```

###Usar estadística Hosmer Lemeshow para bondad de ajuste del modelo.

```
> HLgof.test(fit = fitted.values(M1), obs =Mortalidad,ngr=10)
```

```
Hosmer-Lemeshow H statistic
data: fitted.values(M1) and Mortalidad
X-squared = 0.244, df = 8, p-value = 1
#### el modelo ajusta bien
```

Sintaxis para el diseño 2 con el factor concentración de Pb(NO₃)₂(ac).

```
setwd("E:/Logistico")
datos<-read.table('Pb1.txt',header=T)
datos
attach(datos)
Mortalidad
Concentración
names(datos)
is.numeric(Mortalidad)
is.factor(Concentración)
plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ", xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
M1 <- glm(cbind(Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family = binomial(link="logit"))
summary(M1)
b0.est<-coef(M1)[1]
b1.est<-coef(M1)[2]
b0.est
b1.est
curve(plogis(b0.est+b1.est*x),ad=T)
LD50<-coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
LD50
###Usar estadística Hosmer Lemeshow para bondad de ajuste del modelo.
### valores grandes del pvalue mejor modelo
hosmerlem = function(y, yhat, g=10) {
  cutyhat = cut(yhat,
    breaks = quantile(yhat, probs=seq(0,
      1, 1/g)), include.lowest=TRUE)
  obs = xtabs(cbind(1 - y, y) ~ cutyhat)
  expect = xtabs(cbind(1 - yhat, yhat) ~ cutyhat)
  chisq = sum((obs - expect)^2/expect)
  P = 1 - pchisq(chisq, g - 2)
  return(list(chisq=chisq,p.value=P))
}
Hlgof.test(fit = fitted.values(M1), obs =Mortalidad,ngr=10)
```

Resultados para el diseño 2 con el factor concentración Pb(NO₃)₂ (ac)

```
> Mortalidad
[1] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0
Concentración
[1] 3.00 3.00 3.00 3.00 2.00 2.00 2.00 2.00 1.00 1.00 1.00 1.00 0.50 0.50 0.50
[16] 0.50 0.25 0.25 0.25 0.25
>names(datos)
[1] "Concentración" "Mortalidad"
>is.numeric(Mortalidad)
[1] TRUE
>is.factor(Concentración)
[1] FALSE
>plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ",
xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
>M1 <- glm(cbind(Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family = binomial(link="logit"))
>summary(M1)
```

```
Call:
glm(formula = cbind(Mortalidad) ~ Concentración, family = binomial(link = "logit"),
data = datos)
```

Residuales Devianza:

Mínimo	1Q	Mediana	3Q	Máximo
-1.73428	-0.31766	0.00274	0.04554	1.86979

Coefficientes:

	Estimado	Error Estándar	z value	Pr(> z)
(Intercepto)	-4.366	2.134	-2.046	0.0408 *
Concentración	5.618	2.773	2.026	0.0427 *

Códigos de Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Parametro de dispersión para familia binomial igual a 1)

Devianza Nula: 26.9205 con 19 grados de libertad.
Devianza residual: 9.5718 con 18 grados de libertad.
AIC: 13.572

Número de iteraciones de Fisher: 7

```
>b0.est<-coef(M1)[1]
>b1.est<-coef(M1)[2]
>b0.est
(Intercepto)
-4.366015
>b1.est
Concentración
5.618492
>curve(plogis(b0.est+b1.est*x),ad=T)
>LD50<--coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
>LD50
(Intercepto)
0.7770794
```

Para la Bondad de Ajuste se utiliza la prueba de Hosmer-Lemeshow.

```
Hlgof.test(fit = fitted.values(M1), obs =Mortalidad,ngr=10)
```

Hosmer-Lemeshow H statistic

data: fitted.values(M1) and Mortalidad

X-squared = 0.3891, df = 8, p-value = 0.9999

Sintaxis para el diseño 3 con el factor concentración de NaAsO₂ (mg/kg).

```
setwd("E:/Logistico")
datos<-read.table('Assu.txt',header=T)
datos
attach(datos)
Lombrices
Mortalidad
Concentración
names(datos)
is.numeric(Lombrices)
is.numeric(Mortalidad)
is.factor(Concentración)
plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ",
xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
M1 <- glm(cbind(Mortalidad, Lombrices-Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family = binomial(link="logit"))
summary(M1)
b0.est<-coef(M1)[1]
b1.est<-coef(M1)[2]
b0.est
```



```

(Intercepto)
-2.860841
>b1.est
Concentración
0.01107289
>curve(plogis(b0.est+b1.est*x)*6,ad=T)
>LD50<--coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
>LD50
(Intercepto)
258.3644
#### para la bondad de ajuste del modelo
>1-pchisq(M1$deviance,M1$df.residual)[1] 0.8849259
### el modelo ajusta bien

```

Sintaxis para el diseño 4 con el factor concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg) .

```

setwd("E:/Logistico")
datos<-read.table('Pbsu.txt',header=T)
datos
attach(datos)
Lombrices
Mortalidad
Concentración
names(datos)
is.numeric(Lombrices)
is.numeric(Mortalidad)
is.factor(Concentración)
plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ",
xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
M1 <- glm(cbind(Mortalidad, Lombrices-Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family = binomial(link="logit"))
summary(M1)
b0.est<-coef(M1)[1]
b1.est<-coef(M1)[2]
b0.est
b1.est
curve(plogis(b0.est+b1.est*x)*6,ad=T)
LD50<--coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
LD50
#### para la bondad de ajuste del modelo se utiliza la devianza
1-pchisq(M1$deviance,M1$df.residual)

```

Resultados para el diseño 4 con el factor concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (mg/kg).

```

Concentración, Mortalidad
>Lombrices
[1] 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6
>Mortalidad
[1] 6 6 6 6 4 4 4 3 2 1 1 2 0 1 0 0 0 0 0
>Concentración
[1] 4000 4000 4000 4000 3000 3000 3000 3000 2000 2000 2000 2000 1000 1000 1000
[16] 1000 500 500 500 500
>names(datos)
[1] "Concentración" "Lombrices" "Mortalidad"
>is.numeric(Lombrices)
[1] TRUE
>is.numeric(Mortalidad)
[1] TRUE

```

```

>is.factor(Concentración)
[1] FALSE
>plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ",
xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
>M1 <- glm(cbind(Mortalidad, Lombrices-Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family =
binomial(link="logit"))
>summary(M1)

```

```

Call:
glm(formula = cbind(Mortalidad, Lombrices - Mortalidad) ~ Concentración,
family = binomial(link = "logit"), data = datos)

```

```

Residuales Devianza:
  Minimo      1Q   Mediana      3Q   Máximo
-1.0825 -0.3382 -0.2532  0.7018  1.4195

```

```

Coeficientes:
              Estimado   Error Estándar   z value   Pr(>|z|)
(Intercepto) -5.7576926    1.0237029    -5.624    1.86e-08 ***
Concentración  0.0022187    0.0003839     5.779    7.50e-09 ***
---

```

```

Códigos de Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

(Parámetro de dispersion para una familia binomial es igual a 1)

```

      Devianza Nula: 97.0326   con 19   grados de libertad
Devianza Residual:  8.0346   con 18   grados de libertad
AIC: 30.941
Número de iteraciones de Fisher: 5

```

```

>b0.est<-coef(M1)[1]
>b1.est<-coef(M1)[2]
>b0.est
(Intercepto)
  -5.757693
>b1.est
Concentración
  0.002218676
>curve(plogis(b0.est+b1.est*x)*6,ad=T)
>LD50<--coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
>LD50
(Intercepto)
  2595.103
#### para la bondad de ajuste del modelo
> 1-pchisq(M1$deviance,M1$df.residual)
[1] 0.9781165
### el modelo ajusta bien

```

Sintaxis para el diseño 5 con el factor concentración de Pb(NO₃)₂ (mg/kg) constante y la concentración de NaAsO₂ variable.

```

setwd("E:/Logistico")
datos<-read.table('AsPbk.txt',header=T)
datos
attach(datos)
Lombrices
Mortalidad
Concentración
names(datos)
is.numeric(Lombrices)
is.numeric(Mortalidad)

```



```

>names(datos)
[1] "Concentración" "Lombrices"      "Mortalidad"
>is.numeric(Lombrices)
[1] TRUE
>is.numeric(Mortalidad)
[1] TRUE
>is.factor(Concentración)
[1] FALSE
>plot(Concentración,Mortalidad,main="Mortalidad de Eisenia foetida Vs Concentración ",
xlab="Concentración",ylab="Mortalidad de Eisenia foetida" )
>M1 <- glm(cbind(Mortalidad, Lombrices-Mortalidad) ~ Concentración, data = datos, family =
binomial(link="logit"))
>summary(M1)

```

```

Call:
glm(formula = cbind(Mortalidad, Lombrices - Mortalidad) ~ Concentración,
family = binomial(link = "logit"), data = datos)

```

```

Residuales Devianza:
  Mínimo   1Q   Mediana    3Q   Máximo
-1.3103 -1.0941  0.1898  0.5429  1.3994

```

```

Coeficientes:
             Estimado  Error Estándar  z value  Pr(>|z|)
(Intercepto) -2.5700395  0.5049626    -5.090  3.59e-07 ***
Concentración 0.0027922  0.0005463     5.111  3.20e-07 ***
---

```

```

Codigos de Significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

(Parámetro de dispersión para una familia binomial igual a 1)

```

```

Devianza Nula: 89.687 con 19 grados de libertad
Devianza Residual: 14.150 con 18 grados de libertad
AIC: 39.886
Número de iteraciones de Fisher: 6

```

```

>b0.est<-coef(M1)[1]
>b1.est<-coef(M1)[2]
>b0.est
(Intercepto)
-2.570040
>b1.est
Concentración
0.002792226
>curve(plogis(b0.est+b1.est*x)*6,ad=T)
>LD50<--coef(M1)[1]/coef(M1)[2]
>LD50
(Intercepto)
920.4269
#### para la bondad de ajuste del modelo
1-pchisq(M1$deviance,M1$df.residual)
>1-pchisq(M1$deviance,M1$df.residual)
[1] 0.7192468
### el modelo ajusta bien

```