

Proyecto Fin de Carrera



**Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza**

APLICACIÓN DE LA BACTERIA *VIBRIO FISCHERI* EN LA MEDIDA DE LA TOXICIDAD EN AGUAS

Realizado por:

Eduardo Reinado Lansac

Dirigido por:

Rosa Mosteo Abad

*Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del
Medio Ambiente*

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Universidad de Zaragoza

Septiembre 2011

APLICACIÓN DE LA BACTERIA *VIBRIO FISCHERI* EN LA MEDIDA DE LA TOXICIDAD EN AGUAS

RESUMEN

La investigación en ecotoxicología con diferentes especies de bacterias luminiscentes ocupa un importante lugar en la evaluación de los contaminantes del agua en ciertos ecosistemas. Sus características genéticas, fisiológicas, nutricionales y funcionales han sido evaluadas comparando los cambios que se producen en estos organismos, fundamentalmente en presencia de agentes tóxicos. Ello ha dado lugar a la existencia de protocolos normalizados con bacterias luminiscentes para ensayos de toxicidad.

La investigación desarrollada en este PFC tiene como objetivo principal la puesta en marcha de un método de análisis de toxicidad en aguas mediante el uso de bacterias luminiscentes, como la *Vibrio Fischeri*.

Como objetivo secundario del trabajo se procede al control de la toxicidad en muestras acuosas de distintos orígenes que se someten a tratamientos de mejora de calidad del agua.

Los métodos existentes para analizar toxicidad en aguas son variados pero todos ellos tienen la problemática de trabajar con bacterias que son sensibles a muchos factores.

Dentro de las técnicas existentes, la utilización de la bacteria *Vibrio Fischeri* para analizar la toxicidad de aguas es recomendable, ya que el estudio realizado en este proyecto final de carrera muestra que el método analítico puesto en marcha es bastante repetitivo medianate el control del blanco.

La utilización de la bacteria *Vibrio Fischeri* en el análisis de toxicidad de muestras reales es apta, así como para el control de la evolución de la toxicidad en muestras tratadas mediante distintos procesos. El inconveniente principal es el coste económico de las bacterias.

INDICE DE LA MEMORIA

1-ALCANCE Y OBJETIVOS DEL PFC	1
2-CONTROL DE TOXICIDAD EN AGUAS	2
2.1-Introducción	2
2.2-Parámetros de control	4
2.3-Metodología Analítica	7
2.4-Legislación Aplicable	10
3-CONTAMINACION DE LAS AGUAS POR SUSTANCIAS PELIGROSAS	13
3.1-Introducción	13
3.2-Los Plaguicidas	15
3.2.1-Clasificación	15
3.2.2-Presencia de plaguicidas en aguas	19
3.3-Tratamientos avanzados de degradación de plaguicidas	22
4-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	26
4.1-Muestras objeto de estudio	26
4.1.1-Aguas superficiales	26
4.1.2-Aguas residuales urbanas depuradas	26
4.1.3-Fortificación de las muestras	28
4.2-Metodología Analítica	31
4.2.1-Análisis de toxicidad mediante test de bioluminiscencia	31
4.3-Descripción de los tratamientos aplicados a las muestras	42
4.3.1-Materiales y reactivos	42
4.3.2-Experimentación con procesos de oxidación avanzada	44
5-RESULTADOS	45
5.1-Puesta en marca del equipo	45
5.1.1-Preparación del patrón	45
5.1.2-Acondicionamiento del patrón y de muestras	46
5.1.3-Blanco	47

5.1.4-Acondicionamiento de las bacterias <i>Vibrio Fischeri</i>	47
5.1.5-Método operativo con Isopropanol y H ₂ O ₂ (puesta en marcha)	48
5.2-Análisis de toxicidad en muestras reales	58
5.3-Comparativa entre muestras iniciales Fortificadas y muestras tratadas	64
6-CONCLUSIONES	65
7-BIBLIOGRAFIA	66
8- ANEXOS	
8.1. Anexo I. Orden MAM 85/2008.	
8.2. Anexo II. Propiedades y estructura química de los plaguicidas estudiados.	

1. ALCANCE Y OBJETIVOS DEL PFC

La evaluación de la toxicidad de agentes químicos es una necesidad considerada a nivel internacional. En numerosos contextos legales y socio-políticos se contempla el fomento de la investigación mediante el uso de alternativas a la experimentación animal. El uso de estos métodos está ampliamente aceptado por la comunidad científica aunque es preciso la normalización y validación de los métodos para tener plena utilidad en investigación básica y aplicada.

La investigación en ecotoxicología con diferentes especies de bacterias luminiscentes ocupa un importante lugar en la evaluación de los contaminantes del agua en ciertos ecosistemas. Sus características genéticas, fisiológicas, nutricionales y funcionales han sido evaluadas comparando los cambios que se producen en estos organismos, fundamentalmente en presencia de agentes tóxicos. Ello ha dado lugar a la existencia de protocolos normalizados con bacterias luminiscentes para ensayos de toxicidad.

La investigación desarrollada en este PFC tiene como objetivo principal la puesta en marcha de un método de análisis de toxicidad en aguas mediante el uso de bacterias luminiscentes, como la *Vibrio Fischeri*.

Como objetivo secundario del trabajo se procede al control de la toxicidad en muestras acuosas de distintos orígenes que se someten a tratamientos de mejora de calidad del agua.

El presente proyecto se ha realizado en el grupo de investigación de “Calidad y Tratamiento de Aguas” perteneciente al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza. Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “Regeneración de aguas mediante procesos de oxidación avanzada” (CTM2008-01876/TECNO) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y los fondos FEDER de la Unión Europea.

2. CONTROL DE TOXICIDAD EN AGUAS

2.1 INTRODUCCION

Los análisis convencionales sobre toxicidad son efectuados de manera estática, es decir, incorporando el agente tóxico en el medio en el que viven estos organismos y comprobando posteriormente el porcentaje de inmovilización en relación al número total de bacterias luminiscentes empleadas.

Los ensayos de toxicidad han sido empleados para diversos fines, que incluyen:

- Constatación de la aptitud de las condiciones ambientales para el desarrollo de las determinadas formas de vida acuática.
- Establecimiento de las concentraciones aceptables de los diferentes parámetros convencionales en las aguas receptoras (oxígeno disuelto, turbidez, pH, temperatura).
- Estudio de la influencia de los parámetros de calidad de las aguas residuales para múltiples variedades de especies de peces marinos y de agua dulce.
- Establecimiento de la sensibilidad relativa de un conjunto de organismos acuáticos a los efluentes y a los contaminantes habituales.
- Determinación del nivel de tratamiento de las aguas residuales necesario para alcanzar los límites establecidos por la legislación relativa al control de la contaminación de aguas.
- Determinación de la efectividad de los procesos de tratamientos de aguas residuales.
- Establecimiento de los límites autorizados de descarga de efluentes.
- Determinación del cumplimiento de la legislación relativa a la conservación de la calidad del agua.

Estos ensayos proporcionan resultados útiles para la protección de la salud pública y de la vida acuática frente al impacto causado por la descarga de contaminantes a las aguas superficiales.

Durante las últimas décadas, las medidas de control de la contaminación se circunscribían, principalmente, a los contaminantes convencionales identificados como causantes de la degradación de la calidad del agua (materiales responsables de la demanda de oxígeno, sólidos en suspensión, etc.). Recientemente, se ha prestado mayor atención al control de las substancias tóxicas, especialmente a aquellas presentes en los vertidos de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Las sustancias peligrosas son sustancias tóxicas, dan positivo en ensayos de toxicidad son persistentes (no se degradan) y/o bioacumulables (se acumulan a lo largo de la cadena trófica). Se pueden distinguir dos tipos generales:

- ✓ **Orgánicas:** Compuestos organohalogenados, DDT, PCBs, Dioxinas. Y compuestos no organohalogenados.
- ✓ **Inorgánicas:** Metales, aniones, ácidos o bases fuertes, gases, etc.

La toxicidad es una medida usada para medir el grado tóxico o venenoso de algunos elementos. La toxicidad puede referirse al efecto de esta sobre un organismo completo, como un ser humano, una bacteria o incluso una planta, o a una subestructura. La toxicidad que experimentan los organismos tras los ensayos puede ser de dos tipos:

- ✓ **Toxicidad aguda:** efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo, usualmente de pocos días. Esta toxicidad es suficientemente alta como para producir una respuesta rápida en los organismos (48 a 96 horas) y no implica necesariamente la muerte.
- ✓ **Toxicidad crónica:** efectos tóxicos a largo plazo, que pueden mantenerse en alrededor de la décima parte de la vida media de la especie. Están relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia (muerte y reducción de la capacidad reproductora).

Para evaluar el daño que pueden producir estas sustancias peligrosas en los seres vivos se han desarrollado los denominados test de toxicidad que tienen en cuenta que la toxicidad es función de la concentración del contaminante y del tiempo de exposición al que está sometido el ser vivo al tóxico.

2.2 **PARAMETROS DE CONTROL**

Los parámetros de caracterización de sustancias peligrosas se dividen en dos grandes grupos:

1. **Parámetros individuales:** expresados en mg/L o μ g/L.
 2. **Parámetros globales:** De entre los cuales destacan, la EC50, LD50, LC50, NEANO, CENO, MCEO.
-
- ✓ *Concentración efectiva (EC50):* Concentración del efluente que produce efectos negativos en el 50% de la población de ensayo. Se obtiene a partir de ensayos con bacterias tales como *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* y también con algas.
 - ✓ *Dosis letal (LD50):* Es la dosis de una sustancia ó radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales del ensayo. Obtenida a partir del ensayo con conejos, ratas.
 - ✓ *Concentración letal (LC50):* Concentración del efluente que produce la muerte del 50% de la población del ensayo. Obtenida a partir del ensayo con cangrejos, peces.
 - ✓ *NEANO (nivel de efectos agudos no observados):* mayor concentración del efluente para la cual la mortalidad registrada es del 10% o menor.

- ✓ *CENO (concentración de efectos no observables):* mayor concentración continuada medida de un efluente para la cual no se observa reacción crónica alguna de las especies ensayadas.
- ✓ *MCEO (menor concentración que produce efectos observables):* se define como la menor concentración del efluente para la que puede observarse algún efecto sobre la especie ensayada. Se determina con técnicas de análisis de varianzas.

Para emplear y utilizar los resultados de los ensayos de toxicidad se emplean las unidades de toxicidad (UT), que son las que se utilizan como criterio base:

- ✓ **Unidad tóxica aguda (UT_a):** inversa de la dilución del efluente que causa la respuesta aguda al finalizar el periodo de exposición de la especie. Se puede calcular mediante la siguiente ecuación (ec. 1):

$$UT_a = 100/CL_{50} \quad [1]$$

- ✓ **Unidad tóxica crónica (UT_c):** inversa de la dilución del efluente para la cual no se observa respuesta alguna en ninguno de los organismos al final del periodo de exposición crónica o continua. Se puede calcular mediante la siguiente ecuación (ec. 2):

$$UT_c = 100/CENO \quad [2]$$

Una vez determinados todos los parámetros anteriores, se definen los criterios de calidad de las aguas, que establecen normas y limitaciones en la presencia de agentes tóxicos, para de esta forma asegurar la protección de los usos específicos del agua. Los criterios actuales sobre el control de la calidad del agua intentan proteger las aguas por un lado, de la toxicidad aguda y, por otro de la toxicidad crónica.

1. Protección contra la toxicidad aguda:

Se utiliza el criterio de máxima concentración (CMC), que no debe ser superiores a 0.3 veces la UT_a de los resultados del ensayo más sensible de los realizados. Se calcula mediante la ecuación 3.

$$\mathbf{CMC = UT_a / DCI \leq 0.3 * UT_a} \quad [3]$$

En donde:

DCI: dilución crítica inicial. En los vertidos al mar es la dilución alcanzada en la zona más cercana a donde se produce el vertido suponiendo que se producen las peores condiciones ambientales. En los vertidos a ríos es la dilución alcanzada en la frontera de la zona de mezcla.

Normalmente la CMC hace referencia a la concentración media en cuatro días que no puede ser superada más que una vez cada tres años.

2. Protección contra la toxicidad crónica:

Se utiliza el criterio de concentración continua (CCC), que no debe ser superior a 1.0 veces la UT_c de los resultados de los ensayos de la más sensible de entre al menos tres especies ensayadas, se determina mediante la ecuación 4:

$$\mathbf{CCC = UT_c / DCI \leq 1.0 * UT_c} \quad [4]$$

En donde DCI es la dilución crítica inicial.

El criterio de concentración continua previene los efectos crónicos en el entorno exterior de la zona inicial de mezcla de los vertidos y hace referencia a la concentración media horaria que no puede ser superada en más de una ocasión cada tres años.

En este proyecto final de carrera, la toxicidad se va a expresar como el % de inhibición de las bacterias *Vibrio Fischeri*, es decir, el porcentaje de luminosidad de dichas bacterias que es inhibido por acción de los diferentes contaminantes.

2.3 METODOLOGIA ANALITICA

Según recoge el anexo IV de la ORDEN MAM/85/2008, de 16 de Enero, (ver *Anexo I*), por la que se establecen los criterios técnicos para la valoración de los daños al dominio público e hidráulico y las normas sobre la toma de muestras y análisis de los vertidos de aguas residuales, la toxicidad de una muestra se mide mediante los ensayos de toxicidad aguda sobre peces, *daphnia* y algas realizados conforme a las siguientes normas:

1. Test de toxicidad aguda en peces. Ensayo CEE C.1., OCDE 203:

El objeto de este ensayo es determinar la toxicidad letal aguda de una sustancia en peces de agua dulce. Se exponen los peces a la sustancia o sustancias de ensayo añadidas al agua, durante un período de 96 horas y en un intervalo de concentraciones determinado. Se registra la mortalidad, como mínimo, cada 24 horas y se calculan, si es posible, las concentraciones causantes de la muerte del 50% de los peces (LC50) en cada período de observación.

2. Test de inmovilidad de Daphnia magna. Ensayo CEE C.2., OCDE 202:

La finalidad de esta prueba es determinar la concentración efectiva media de una sustancia (EC50) para la inmovilización de *Daphnia* en agua dulce. Se exponen las *Daphnia* a un abanico de concentraciones de la sustancia a ensayar añadida al agua durante 48 horas. En condiciones de ensayo idénticas, y un rango adecuado de concentración de la sustancia de ensayo, diferentes concentraciones de una sustancia de ensayo ejercen efectos diferentes sobre la capacidad de movilidad de la *Daphnia*. En consecuencia, al final del ensayo, a cada concentración, corresponderá un porcentaje diferente de inmovilización de las *Daphnia*. Las concentraciones que causan una inmovilización de 0 a 100% se determinan directamente de las observaciones del ensayo, mientras que la CE50 en 48 horas se determina, a ser posible, por cálculo.

3. Test de inhibición del crecimiento de algas. Ensayo CEE C.3., OCDE 201:

El objeto de este ensayo es determinar los efectos de una sustancia sobre el crecimiento de una especie de alga verde unicelular. Ensayos relativamente breves (72 horas) pueden valorar los efectos sobre varias generaciones. Este método puede adaptarse para ser utilizado con diferentes especies de algas unicelulares, en cuyo caso se proporcionará, junto con el informe del ensayo, una descripción del método utilizado. Se exponen cultivos de algas verdes seleccionadas en fase exponencial de crecimiento a diversas concentraciones de la sustancia de ensayo durante varias generaciones bajo condiciones definidas. Las soluciones de ensayo se incuban durante un período de 72 horas, durante el cual se mide la densidad celular en cada una de ellas al menos cada 24 horas. Se determina la inhibición del crecimiento en relación a un cultivo testigo.

El estudio de la toxicidad llevado a cabo en este proyecto final de carrera se basa en monitorizar los cambios en las emisiones de luz natural de una bacteria luminiscente, denominada *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*). El método seguido es el **test de bioluminiscencia ISO 11348-2:2007**.

4. Test de bioluminiscencia ISO 11348-2:2007:

La bacteria *Vibrio Fischeri* es una bacteria gram negativa, es decir, que se tiñe de color rosáceo para su visualización, anaerobia facultativa, que pueden vivir en presencia ó en ausencia de oxígeno. Pertenece a la familia Vibrionaceae cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción de luz por parte de ciertos organismos vivos). Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas.

La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia. En presencia de agentes contaminantes, la bioluminiscencia natural de *Vibrio Fischeri* disminuye.

El test de bioluminiscencia utilizado este trabajo de investigación consiste en la medida de la luz emitida por las bacterias *Vibrio Fischeri* antes de entrar en contacto con la muestra y después de contactar con ella pasado un tiempo de incubación. Es asumible que la diferencia de luminosidad observada es debida al efecto de la muestra. El grado de pérdida de luz indica el grado de toxicidad de la muestra.

2.4 LEGISLACION APPLICABLE AL CONTROL DE TOXICIDAD EN AGUAS

En la actualidad, existen muy pocos documentos legislativos en los que se incluye el análisis de toxicidad mediante parámetros globales.

A modo de ejemplo, la Tabla 3.1, recogida en el Decreto 38/2004 del 24 de Febrero del Gobierno de Aragón por el que se aprueba el Reglamento de los vertidos de aguas residuales a las redes municipales de alcantarillado, muestra los valores límite de vertido que se deben de cumplir:

Tabla 2.1. Valores límite de vertido de los contaminantes.

Parámetro	Concentración diaria máxima	Concentración instantánea máxima
pH	5.5-9.5	5.5-9.5
Sólidos en suspensión (mg/l)	500	1000
Materiales Sedimentables (mL/L)	15	20
Sólidos Gruesos	Ausentes	Ausentes
DBO5 (mg/L)	500	1000
DQO (mg/L)	1000	1500
Temperatura (°C)	40	50
Conductividad eléctrica a 25°C (mS/cm)	2.00	4.00
Color a una dilución de 1/40	Inapreciable	Inapreciable
Aluminio (mg/L)	10	20
Arsénico (mg/L)	1	1
Bario (mg/L)	20	20
Boro (mg/L)	3	3
Cadmio (mg/L)	0.2	0.4
Cromo (III) (mg/L)	5	5
Cromo (IV) (mg/L)	1	1
Hierro (mg/L)	10	10
Manganoso (mg/L)	5	10
Níquel (mg/L)	2	5
Mercurio (mg/L)	0.05	0.10
Plomo (mg/L)	1	1
Selenio (mg/L)	1	1
Estaño (mg/L)	2	5
Cobre (mg/L)	2	3
Zinc (mg/L)	5	10
Cianuros (mg/L)	2	2
Cloruros (mg/L)	20000	2000
Sulfuros (mg/L)	2	5
Sulfitos (mg/L)	2	2
Sulfatos (mg/L)	1000	1000
Fluoruros (mg/L)	12	15
Fósforo total (mg/L)	15	30
Nitrógeno amoniacial(mg/L)	35	85
Nitrógeno nítrico (mg/L)	20	65
Aceites y grasas (mg/L)	100	150
Fenoles totales (mg/L)	5	5
Aldehídos (mg/L)	2	2
Detergentes (mg/L)	6	6
Pesticidas (mg/L)	0.1	0.5
Toxicidad (U.T.)	15	30

Tal y como aparece reflejado en el Decreto 38/2004, esta toxicidad se determina mediante el bioensayo de inhibición de la luminiscencia en *Vibrio Fischeri*. Las U.T. son unidades de toxicidad y se definen como la inversa de la dilución del agua residual

(expresada como partes por uno) que provoca una inhibición del 50% (CE50). Como se observa en la tabla 2.1 una dilución 1/30 de la muestra vertida al alcantarillado que produce el 50% de inhibición corresponde con el límite de concentración instantánea máxima permitida.

3. CONTAMINACION DE LAS AGUAS POR SUSTANCIAS PELIGROSAS

3.1 INTRODUCCION

La primera Directiva Europea (Directiva 76/464/CEE) a tener en cuenta en materia de contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad estableció una primera lista, denominada lista I, que incluye determinadas sustancias individuales escogidas principalmente por su toxicidad, persistencia y bioacumulación, con excepción de las biológicamente inofensivas o que se transforman rápidamente en sustancias biológicamente inofensivas, así como una segunda lista, denominada lista II, que incluye sustancias que tienen un efecto perjudicial sobre el medio acuático que sin embargo pueda limitarse a una determinada zona según las características de las aguas receptoras y su localización, que todo vertido de dichas sustancias debería someterse a autorización previa que fije las normas de emisión. Esta Directiva se aplica a las aguas interiores superficiales, aguas marinas territoriales, aguas interiores del litoral y a las aguas subterráneas.

A continuación se indican las sustancias o grupos de sustancias incluidas en esta Directiva:

Listas I

- ✓ Compuestos organohalogenados y sustancias individuales que pueden dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático.
- ✓ Compuestos organofosfóricos.
- ✓ Compuestos organoestánicos.

- ✓ Sustancias en las que esté demostrado su poder cancerígeno en el medio acuático o transmitido por medio de este.
- ✓ Mercurio y compuestos de mercurio.
- ✓ Cadmio y compuestos de cadmio.
- ✓ Aceites minerales persistentes e hidrocarburos de origen petrolífero persistentes.
- ✓ Materias sintéticas persistentes que puedan flotar, permanecer en suspensión o hundirse y causar perjuicio a cualquier utilización de aguas.

Lista II

- ✓ Metaloides y los metales siguientes y sus compuestos:

Zinc, cobre, níquel, cromo, plomo, selenio, arsénico, antimonio, molibdeno, titanio, estaño, bario, berilio, boro, uranio, vanadio, cobalto, talio, teluro, plata.
- ✓ Biocidas y sus derivados que no figuren en la lista I.
- ✓ Sustancias que no tengan efectos perjudiciales para el sabor y/o el olor de los productos de consumo humano obtenidos del medio acuático, así como los compuestos que puedan dar origen a sustancias de esta clase en las aguas.
- ✓ Compuestos organosilílicos tóxicos o persistentes y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en las aguas, excluidos los biológicamente inofensivos o que dentro del agua se transforman rápidamente en sustancias inofensivas.

- ✓ Compuestos inorgánicos de fósforo y fósforo elemental.
- ✓ Aceites minerales no persistentes e hidrocarburos de origen petrolífero no persistentes.
- ✓ Cianuros y fluoruros.
- ✓ Sustancias que influyan desfavorablemente en el balance de oxígeno, en particular las siguientes: Amoniaco, nitritos.

Como se puede observar en las listas I y II de la Directiva 76/464/CEE existen gran variedad de contaminantes que pueden estar presentes en las aguas, estos contaminantes pueden ser peligrosos en ciertos valores por lo que es necesario tener un control exhaustivo de ellos. Por lo tanto, hay numerosos decretos, directivas, etc. que los controlan.

3.2 *LOS PLAGUICIDAS*

Las sustancias peligrosas seleccionadas en este trabajo de investigación para analizar su toxicidad en aguas son ciertos plaguicidas. A continuación se muestra la clasificación de estas sustancias en función de diversos criterios.

3.2.1 *CLASIFICACION*

Los plaguicidas se clasifican atendiendo a varios criterios:

- ✓ Según su actividad biológica.
- ✓ Según su naturaleza química.
- ✓ Según su toxicidad.

A continuación se describen dichas clasificaciones:

Clasificación según actividad biológica:

Según su efecto sobre distintos seres vivos los plaguicidas se pueden clasificar principalmente en:

- ✓ *Insecticidas*: son tóxicos para los insectos.
- ✓ *Herbicidas*: atacan las malas hierbas.
- ✓ *Acaricidas*: son tóxicos para los ácaros.
- ✓ *Fungicidas*: son tóxicos para los hongos.
- ✓ *Nematicidas*: son tóxicos para los nematodos (gusanos parásitos del hombre).
- ✓ *Rodenticidas*: causan la muerte a roedores.
- ✓ *Avicidas*: causan la muerte a aves.
- ✓ *Molusquicidas*: eliminan los moluscos.
- ✓ *Bactericidas*: inhiben el crecimiento de microorganismos.

Clasificación según naturaleza química:

Según la estructura química de los plaguicidas, éstos pueden ser principalmente clasificados en:

- ✓ *Organoclorados*: son compuestos que contienen átomos de cloro en su molécula y son muy utilizados contra insectos actuando sobre su sistema nervioso.
- ✓ *Organofosforados*: son ésteres o amidas derivadas del ácido fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico, fosfónico y fosfínico. Su mayor actividad es como insecticida, aunque también poseen actividad herbicida, fungicida y nematicida. Su acción se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa, enzima que se encuentra en el sistema nervioso de los insectos.
- ✓ *Carbamatos*: son derivados del ácido carbámico, tiocarbámico y ditiocarbámico. Presentan su mayor actividad como insecticidas y herbicidas y su acción también se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa.
- ✓ *Derivados de la urea y tiourea*: Su mayor actividad es como herbicidas. Actúan inhibiendo la reacción de Hill y, por tanto, impidiendo el proceso normal de fotosíntesis.
- ✓ *Compuestos heterocíclicos*: Su mayor actividad es como herbicidas. Su acción se basa en el bloqueo de la fotosíntesis reduciendo la fijación de CO₂ e inhibiendo la síntesis de glucosa.
- ✓ *Compuestos inorgánicos*: son moléculas inorgánicas que principalmente contienen cobre, azufre y mercurio.

Clasificación según toxicidad:

Esta clasificación se realiza según la toxicidad relativa de los plaguicidas (LD50), dosis letal media, que se corresponde con la cantidad de plaguicida capaz de causar la muerte

al 50% de los individuos que constituyen el lote del ensayo. Según este valor, los plaguicidas se pueden clasificar en:

- ✓ *Supertóxicos*: LD50 < 5 mg/kg.
- ✓ *Extremadamente tóxicos*: LD50 5-50 mg/kg.
- ✓ *Muy tóxicos*: LD50 50-500 mg/kg.
- ✓ *Moderadamente tóxicos*: LD50 500-5000 mg/kg.
- ✓ *Ligeramente tóxicos*: LD50 5-15 g/kg
- ✓ *Prácticamente no tóxicos*: LD50 > 15 g/kg

Tabla 3.2. Clasificación de los plaguicidas estudiados.

Plaguicida	Actividad Biológica	Naturaleza Química	Toxicidad
Alacloro	Herbicida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
Aldrin	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
Ametrina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Moderadamente tóxico
Atrazina	Herbicida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
Clorpirifos	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
Clorfenvinfos	Insecticida	Organoclorado	Extremadamente tóxico
pp'-DDD	Insecticida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
pp'-DDE	Insecticida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
op'-DDT	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
pp'-DDT	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
Desetilaatrazina	Herbicida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
3,4-Dicloroanilina	Herbicida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
4,4-Diclorobenzofenona	Acaricida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
Dicofol	Acaricida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
Dieldrin	Insecticida	Organoclorado	Extremadamente tóxico
Dimetoato	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
Diuron	Herbicida	Derivado de la Urea	Moderadamente tóxico
α-Endosulfan	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
Endosulfan-sulfato	Insecticida	Organoclorado	Muy toxic
Endrin	Insecticida	Organoclorado	Extremadamente tóxico

Tabla 3.2. Continuación.

α -HCH	Insecticida	Organoclorado	Muy toxico
β -HCH	Insecticida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
γ -HCH	Insecticida	Organoclorado	Muy toxico
δ -HCH	Insecticida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
Heptacloro	Insecticida	Organoclorado	Muy toxico
Heptacloro epoxi A	Insecticida	Organoclorado	Muy toxico
Heptacloro epoxi B	Insecticida	Organoclorado	Muy toxico
Hexaclorobenceno	Fungicida	Organoclorado	Muy toxico
Isodrín	Insecticida	Organoclorado	Extremadamente tóxico
4-IsopropilAnilina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Moderadamente tóxico
Isoproturón	Herbicida	Derivado de la Urea	Moderadamente tóxico
Metolacloro	Herbicida	Organoclorado	Moderadamente tóxico
Metoxicloro	Insecticida	Organoclorado	Ligeramente tóxico
Molinato	Herbicida	Carbamato	Muy toxico
Paration metil	Acaricida/Insecticida	Organoclorado	Extremadamente tóxico
Paration etil	Acaricida/Insecticida	Organofosforado	Extremadamente tóxico
Prometón	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Moderadamente tóxico
Prometrina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Ligeramente tóxico
Propazina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Ligeramente tóxico
Simazina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Moderadamente tóxico
Terbutilazina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Moderadamente tóxico
Terbutrina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Moderadamente tóxico
Tetradifón	Acaricida/Insecticida	Organoclorado	Ligeramente tóxico
Trifluralina	Herbicida	Compuesto heterocíclico	Ligeramente tóxico

En el *Anexo II* de la memoria se muestran las propiedades y estructura química de los plaguicidas estudiados.

3.2.2 PRESENCIA DE PLAGUICIDAS EN AGUAS

De especial interés es la presencia de plaguicidas en aguas superficiales y en aguas residuales depuradas debido al uso final de estas aguas. Las aguas superficiales son una fuente importante de aguas de abastecimiento humano y las aguas residuales urbanas pueden ser utilizadas para muchos usos según su calidad tal y como marca el Real

Decreto 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.

3.2.2.1 AGUAS SUPERFICIALES

La presencia de plaguicidas en aguas superficiales se debe principalmente a contaminación difusa debido a su uso en jardinería, agricultura etc. que se vierten de manera incontrolada. Las prácticas más contaminantes son:

- ✓ Fertilización, en especial con abonos nitrogenados.
- ✓ Control de plagas, enfermedades y malezas, con productos aplicados directamente al suelo.
- ✓ Labranza del suelo.
- ✓ Riego como precursor de erosión y potenciador de la contaminación difusa.
- ✓ Manejo del ganado.

3.2.2.2 AGUAS RESIDUALES URBANAS DEPURADAS

En general, la composición de las aguas de salida de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) depende fundamentalmente de los aportes industriales al vertido urbano y del tipo de tratamiento al que han sido sometidas en la EDAR correspondiente. A pesar de ello, se puede decir que en general, estas aguas se caracterizan por:

- ✓ La presencia de altas concentraciones de sólidos en suspensión.

- ✓ Elevada turbidez.
- ✓ La presencia de gran variedad de gérmenes patógenos. Es el factor de riesgo más importante asociado la reutilización del agua. Supone la exposición del hombre a agentes biológicos como son bacterias patógenas, helmintos, protozoos o virus entéricos.
- ✓ La presencia de contaminantes inorgánicos, como cloruros, nitrógeno y fósforo (en concentración variable según proceda de instalaciones con o sin eliminación de nutrientes) y en algunos casos de metales pesados, no eliminados en el tratamiento de depuración y cuya concentración depende en gran medida de la componente industrial que tenga el vertido urbano.
- ✓ La presencia de materia orgánica. Dentro de este grupo genérico, se distingue:

-Materia orgánica No Peligrosa: Formada mayoritariamente por compuestos que no han sido degradados en las instalaciones de depuración, bien por que son refractarios al tratamiento o bien porque no se han alcanzado rendimientos del 100%; se trata de sustancias orgánicas como los ácidos carbóxilicos, ésteres, proteínas, hidratos de carbono, aminoácidos, alcoholes polihidroxilados, etc.

-Materia orgánica Peligrosa: sustancias persistentes que no han sido eliminadas en el tratamiento de depuración, que si bien están presentes en una muy baja concentración, pueden resultar un problema ambiental y sanitario. Dentro de este grupo se encuentran los **plaguicidas**.

3.3 TRATAMIENTOS AVANZADOS DE DEGRADACION DE PLAGUICIDAS

Los procesos avanzados de oxidación (POAs) se pueden utilizar para la degradación de sustancias orgánicas no biodegradables, como son los plaguicidas. Estos tratamientos se están aplicando desde hace años para la degradación de plaguicidas en el grupo de investigación “Calidad y Tratamiento de las aguas” de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.

Los procesos avanzados de oxidación (POAs) se definen como aquellos procesos de oxidación que implican la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cantidad suficiente para interaccionar con los compuestos orgánicos del medio. Se trata de una familia de métodos que utilizan la elevada capacidad oxidante de dichas especies y que se diferencian entre sí en la forma en la que los generan.

Los ROS son altamente reactivas y de ataque poco selectivo capaces de mineralizar los contaminantes sin producir en un principio ningún tipo de subproducto. Las principales ROS que se generan en estos procesos se pueden dividir en dos grupos: ROS primarias, formadas por los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y las ROS secundarias, formadas por los radicales hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), ozónido ($\text{HO}_3^{\cdot}/\text{O}_3^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}_2$).

Los procesos de oxidación avanzada se suelen clasificar de diferentes formas, teniendo en cuenta la fase de reacción (heterogénea u homogénea) o el método de generación de radicales hidroxilo (químico, electroquímico, sonoquímico, fotoquímico). Los POAs más utilizados se muestran en la figura 3.1.

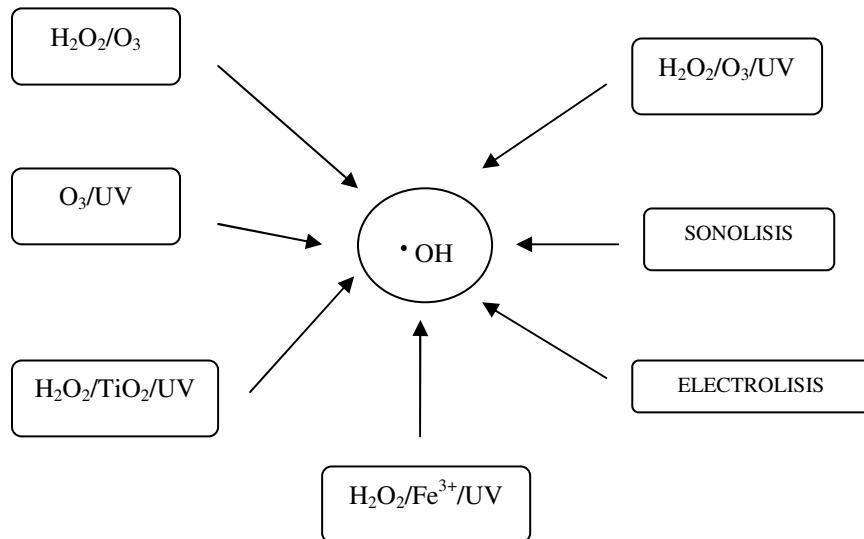


Figura 3.1. Principales procesos de oxidación avanzada.

Dentro de los POAs mostrados en la figura 3.1 caben destacar los procesos catalíticos ya que presentan numerosas ventajas en el tratamiento de agua porque se ha comprobado que producen la degradación de una gran variedad de contaminantes orgánicos tóxicos. Es posible utilizar luz solar como fuente de irradiación y además, a diferencia de la mayoría de los procesos fotoquímicos, no son selectivos y pueden emplearse para tratar mezclas complejas de contaminantes.

Los procesos photocatalíticos hacen uso de un óxido metálico semiconductor como catalizador y el oxígeno como agente oxidante. Pueden llevarse a cabo de forma homogénea o heterogénea. El inconveniente de los procesos en fase homogénea es la separación del catalizador una vez realizado el tratamiento. Por esta razón, se plantea la fijación del catalizador sobre superficies para su implantación en forma heterogénea.

La superficie de los óxidos metálicos semiconductores proporciona un entorno en el cual es posible iniciar mediante irradiación reacciones de oxidación-reducción. Los

semiconductores poseen bandas asociadas con niveles de energía espaciados entre sí. La de menor energía presenta la mayor densidad electrónica y está asociada con los enlaces covalentes entre átomos., recibiendo el nombre de banda de valencia. Por otra parte, los niveles de más alta energía se encuentran vacíos y se denominan bandas de conducción, ya que están relacionadas con esta propiedad en los materiales. La diferencia de energía entre la banda de valencia y la de conducción define, entre otros aspectos, la sensibilidad del semiconductor a la irradiación con una cierta longitud de onda.

La fotoexcitación con una energía igual o mayor que la del espacio entre las bandas promueve un electrón (e^-) de la banda de valencia (BV) a la banda de conducción (BC), creando un hueco (h^+) deficiente de electrones. Si un hueco fotogenerado alcanza la superficie del semiconductor, puede reaccionar con un sustrato adsorbido a través de la transferencia electrónica interfacial. Por tanto, un agente reductor puede oxidarse al transferir un electrón al hueco fotogenerado en la superficie, y un oxidante adsorbido puede reducirse al aceptar un electrón de la superficie.

Entre los semiconductores utilizados en fotocatálisis, el dióxido de titanio se considera particularmente práctico debido a la formación del par hueco-electrón bajo la incidencia de luz del UV cercano según la siguiente reacción, (Figura 3.2):



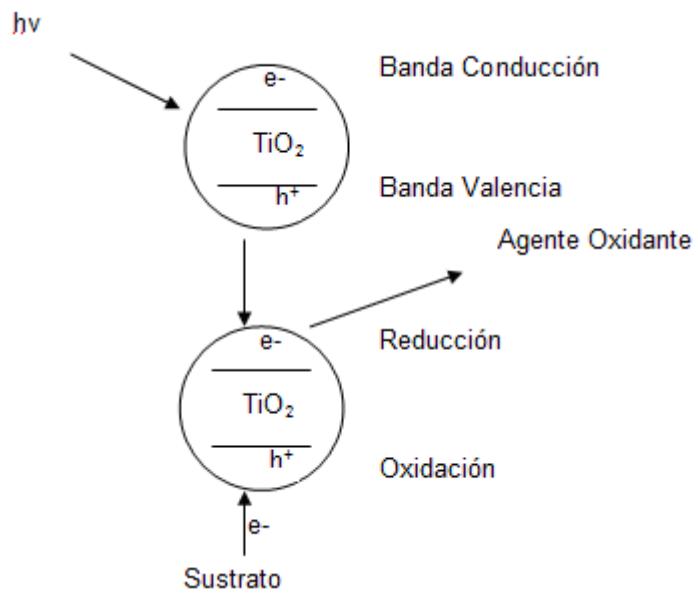


Figura 3.2. Reducción redox fotoinducida sobre la superficie de TiO_2 .

Las especies fotogeneradas pueden participar en reacciones redox con diversas especies químicas ya que el hueco en la banda de valencia es fuertemente oxidante y el electrón en la banda de conducción es reductor.

El dióxido de titanio tiene múltiples cualidades: una gran estabilidad, disponibilidad comercial, diferentes formas alotrópicas con alta fotoactividad, es inocuo para el medio ambiente, completamente reciclabl e una vez terminada la reacción, etc. Todas estas propiedades hacen que el dióxido de titanio sea el semiconductor más utilizado en fotocatálisis.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO

En este proyecto fin de carrera las muestras acuosas en las que se analiza la toxicidad por plaguicidas son de dos tipos:

- ✓ Muestras de aguas superficiales.
- ✓ Muestras de aguas residuales urbanas depuradas.

4.1.1 AGUAS SUPERFICIALES

En este estudio se utiliza una muestra del Canal Imperial de Aragón. Se toma un volumen total de muestra de 40l. Dicha agua se recoge en el tramo del Canal Imperial que corta con la Avenida de Valencia, ciudad de Zaragoza. El agua fue captada en una zona intermedia del ancho de canal con la intención de recoger una muestra lo más representativa posible del mismo. El agua se recoge en botellas de 5l de capacidad, las cuales son posteriormente guardadas en los congeladores habilitados en el laboratorio del grupo “Calidad y Tratamiento de Aguas” ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.

4.1.2 AGUAS RESIDUALES URBANAS DEPURADAS

Obtención del agua sintética:

Con el objeto de tener agua de forma continua, suficiente y similar al agua de salida de una EDAR real como la estudiada en este trabajo se dispone en el laboratorio del grupo

de investigación de “Calidad y Tratamiento de las aguas” ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza de una planta piloto de lodos activos. Esta planta (Figura 4.1) presenta un tratamiento biológico de fangos activados con recirculación.

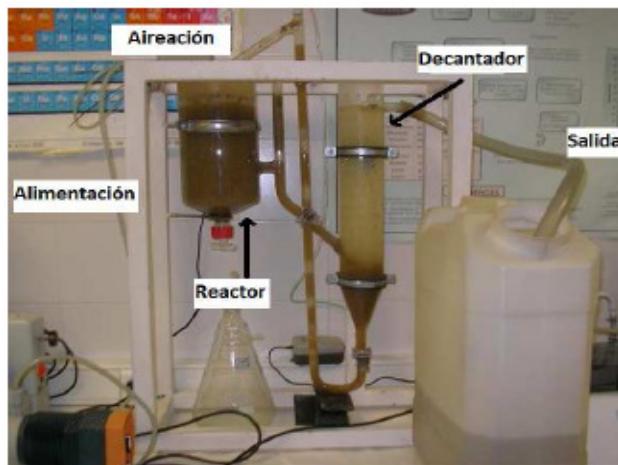


Figura 4.1. Descripción planta de tratamiento.

La planta consta de un reactor biológico que contiene lodos activos, formados por microorganismos, continuamente aireados y agitados para obtener condiciones aeróbicas. Este reactor se alimenta con un agua de características similares al agua de entrada de una EDAR real. Esta alimentación es una disolución de agua destilada y los reactivos y dosis que se muestran en la tabla 4.1. Se introduce en el reactor mediante una bomba con un caudal continuo de 1 L/h. En el reactor la materia orgánica es oxidada principalmente a CO_2 y nuevos microorganismos. Del reactor el agua pasa al decantador donde sedimenta el fango biológico y parte de él es recirculado al reactor para mantener constante la concentración de microorganismos en el mismo, 3000-3500 mg/L. Por la parte superior del decantador rebosa el agua y es recogida y congelada a -8°C para que no se degrade la materia orgánica presente en la muestra.

Tabla 4.1. Dosis de los distintos reactivos añadidos para simular un agua de características similares a la de entrada de una EDAR. Directiva 82/243/CEE.

Reactivos	Concentración (mg/L)
Peptona de carne	116
Extracto de carne	110
Urea	30
Glucosa	200
NaCl	7
K ₂ HPO ₄	28
CaCl ₂ 2H ₂ O	4
MgSO ₄ 7H ₂ O	2

4.1.3 FORTIFICACION DE LAS MUESTRAS:

Las muestras utilizadas en este proyecto fin de carrera se fortifican con plaguicidas con el objeto de poder determinar de manera más precisa su evolución en los tratamientos aplicados así como para la puesta en marcha del análisis de toxicidad.

Fortificación aguas superficiales

El agua superficial proveniente del Canal es fortificada con una mezcla de 44 plaguicidas. Los plaguicidas se han seleccionado teniendo en cuenta cuales son aquellos que están presentes en la cuenca del Ebro como consecuencia de la actividad agrícola. Las concentraciones seleccionadas se basan en estudios previos realizados en el grupo de investigación “Calidad y Tratamiento de las aguas”.

En la tabla 4.2 se muestran las diferentes concentraciones utilizadas para la fortificación.

Tabla 4.2. Concentraciones de los plaguicidas presentes en las muestras fortificadas.

Plaguicida	Concentración (ng/L)
Alacloro	505
Aldrin	512
Ametrina	501
Atrazina	551
Clorpirifos	520
Clorfenvinfos	492
pp'-DDD	510
pp'-DDE	480
op'-DDT	482
pp'-DDT	482
Desetilaatrazina	593
3,4-Dicloroanilina	658
4,4-Diclorobenzofenona	519
Dicofol	568
Dieldrin	508
Dimetoato	608
Diuron	501
α -Endosulfan	475
Endosulfan-sulfato	483
Endrin	486
α -HCH	511
β -HCH	519
γ -HCH	521
δ -HCH	504
Heptacloro	491
Heptacloro epoxi A	495
Heptacloro epoxi B	487
Hexaclorobenceno	503
Isodrín	516
4-IsopropilAnilina	512
Isoproturón	521
Metolacloro	524
Metoxicloro	519
Molinato	551
Paration metil	508

Tabla 4.2. Continuación.

Paration etil	507
Prometón	492
Prometrina	489
Propazina	508
Simazina	554
Terbutilazina	514
Terbutrina	514
Tetradifón	493
Trifluralina	566

La suma de las concentraciones de todos los plaguicidas corresponde con la concentración final de estos contaminantes peligrosos y es igual a 22.7 $\mu\text{g/L}$.

Fortificación aguas residuales urbanas depuradas

El agua de salida de la planta piloto no contiene sustancias peligrosas. El agua de salida de una EDAR real puede contener sustancias peligrosas. Por ello, las muestras sintéticas obtenidas se fortifican con plaguicidas.

Las concentraciones elegidas para fortificar las muestras sintéticas garantizan su presencia antes del tratamiento y así se puede estudiar la toxicidad producida en el agua. Los plaguicidas añadidos son seleccionados como consecuencia de estudios de caracterización de aguas de salida de Edar realizados en el grupo de investigación “Calidad y Tratamiento de las aguas”. Los plaguicidas son: 3,4-dicloroanilina, terbutilazina, metolacloro, clorpirifos, dimetoato, terbutrina, simazina, clorfenvinfos e isoproturo; cada uno de ellos se fortifica con 0.5 $\mu\text{g/L}$. Las características de todas estas sustancias peligrosas se encuentran en el *Anexo II*.

4.2 METODOLOGIA ANALITICA

4.2.1 ANALISIS DE TOXICIDAD MEDIANTE TEST DE BIOLUMINISCENCIA

4.2.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos son los siguientes:

- ✓ Bacterias *Vibrio Fischeri* LCK 480.
- ✓ Solución salina de NaCl al 2% de Dr Lange.
- ✓ Solución salina de NaCl al 7.5% Dr Lange.
- ✓ Dicromato potásico sólido puro de PANREAC.

Algunos de los reactivos tienen un coste elevado (como es el caso de las bacterias) y por lo tanto se debe rentabilizar su uso. Tanto las bacterias, la solución salina de NaCl al 7.5% y 2% son proporcionadas por Hach-Lange.

Los materiales que se utilizan son:

- ✓ Micropipetas y puntas de plástico, tanto estériles (a utilizar con las bacterias) como no estériles.
- ✓ Tubos de ensayo adecuados para Lumistox 300.
- ✓ Matraces aforados.

4.2.1.2 DESCRIPCION DEL EQUIPO LUMISTOX 300

El lumistox 300 es un equipo de medición concebido a su vez como unidad de medida y análisis para el test de bacterias luminosas. En combinación con el incubador lumistherm cumple los requisitos técnicos exigidos por la norma internacional ISO DIS 11348 sobre la determinación de la inhibición de la bacteria *Vibrio Fischeri* en muestras acuosas. Además es posible realizar con este equipo test de bacterias luminosas destinados al análisis de funcionamiento, así como el test crónico lumis-24-tox (LCK480). El lumistox 300 dispone, igual que un ordenador, de un sistema operativo propio. Al conectar el equipo, éste arranca igual que un ordenador mediante un disquete que contiene todos los datos y programas necesarios para su funcionamiento. En la figura 4.2 se muestra una fotografía del lumistox 300 y del lumitherm.



Figura 4.2. Lumistox 300 y lumistherm (bloque incubador) para el análisis de toxicidad.

Mediante una función fotométrica incorporada y una rutina de medición y análisis, el lumistox 300 reconoce los diversos efectos del color en los test de bacterias luminosas, y los tiene en cuenta a la hora de calcular los resultados del test. La función fotométrica permite además realizar una estimación previa de la influencia del color, permitiendo determinar, así mismo, la extinción (como OD = densidad óptica) de las suspensiones

bacteriológicas para valorar inhibiciones de crecimiento en el test de bacterias luminosas lumis-24-tox (**LCK480**).

Antes de realizar cualquier test de bacterias luminosas, el lumistox 300 comprueba la funcionalidad de todo el trayecto de medición mediante un control automático de referencias.

En la figura 4.3 se muestra un esquema del equipo y las partes que lo componen.

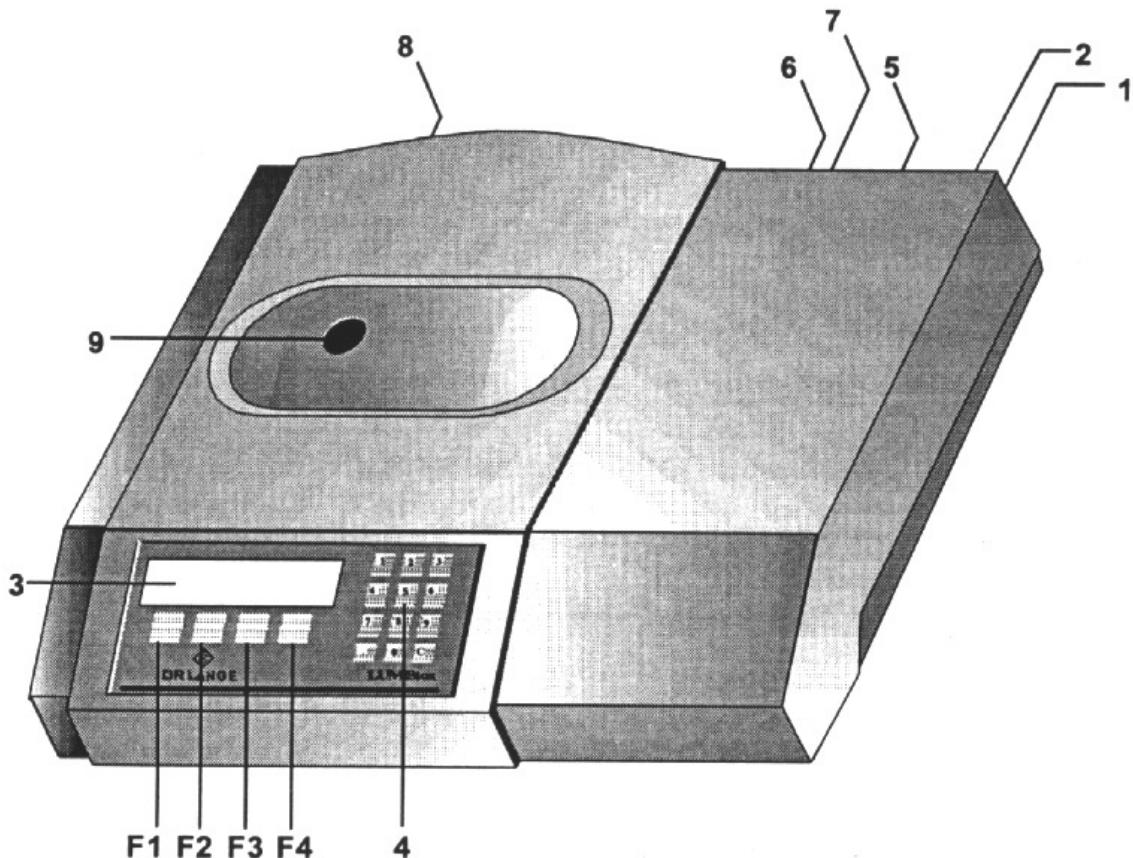


Figura 4.3. Descripción de los componentes del Lumistox 300.

1 Toma de tierra.

2 Conector de red con fusible.

3 Pantalla de cristal líquido

4 Teclado numérico

5 Conector serie 9 polos.

6 Conector paralelo 25 polos.

7 Disquetera de 3,5”.

8 Placa de características.

9 Pozo para cubetas.

F1-F4 Teclas de función.

4.2.1.3 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO CON EL LUMISTOX 300

Para el uso adecuado del equipo y el análisis de toxicidad es necesario seguir los pasos que se indican a continuación:

1. Encender la impresora o el PC.
2. Introducir el disquete del sistema en el lumistox 300.
3. Poner en marcha el equipo lumistox 300.
4. Conectar el bloque incubador lumistherm.
5. Esperar 30 minutos de “tiempo de calentamiento”.
6. Durante el tiempo de calentamiento:
 - Seleccionar el test de bacterias luminosas y preparar las bacterias según las instrucciones del ensayo.
 - Añadir NaCl a la muestra y controlar los valores de pH .
 - Si fuera necesario, fabricar una serie de diluciones de la muestra.
7. Conectar la corrección automática de color, si fuera preciso.

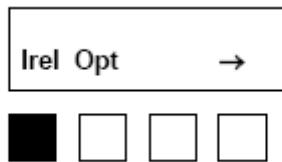
8. Seleccionar en el lumistox 300 el modo de análisis deseado (Valor GL, EC ó IREL) o el test a emplear (por ejemplo **LCK480**, test de bacterias utilizado en esta investigación).
9. Introducir las preconfiguraciones necesarias en el lumistox 300.
10. Ejecutar el ensayo según las prescripciones e instrucciones de menú del lumistox 300.
11. Leer el resultado.
12. Cerrar la cámara de medida.

4.2.1.4 DETERMINACION DE LA EC50

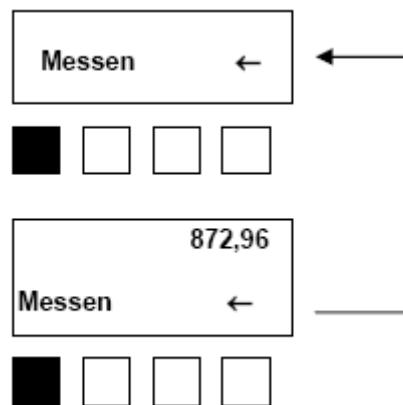
El valor EC indica la concentración de una muestra que provoca un 50% de inhibición en el test de bacterias luminosas. El lumistox 300 sólo será capaz de calcular un valor de EC, si éste se encuentra dentro de las concentraciones para las que se midieron inhibiciones del 10 al 90% en el test.

4.2.1.5 DETERMINACION DE LA INTENSIDAD LUMINOSA RELATIVA IREL

En este modo de análisis, que es el que se utiliza en esta investigación para la determinación del **% de inhibición de las *Vibrio Fischeri***, el lumistox 300 realiza la función de luminómetro para la determinación de la intensidad luminosa de las muestras. El máximo de emisión de la muestra a medir deberá situarse alrededor de los 480 nm.



Seleccionar en el 3er nivel del menú principal el modo de análisis <Irel>



Medir la muestra. Aparece el valor de la intensidad luminosa.

Para determinar el valor de EC en el test de bacterias luminosas se requiere tres o más etapas diluidas de una muestra. A continuación se explica el procedimiento de dilución utilizado.

➤ Serie de dilución geométrica

La muestra se diluye sucesivamente por el factor 2. Se forma así una serie de diluciones de la muestra:

muestra sin diluir 1:2 1:4 1:8 1:16 etc muestra diluida

Durante el test de bacterias luminosas se mezcla una parte de la muestra con una parte igual de las bacterias luminosas en suspensión. A las diluciones del test se añade así otra dilución más de las muestras diluidas descritas antes.

1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 etc diluciones en el test

Se colocan las cubetas de medición lumistox necesarias en la fila A del lumistherm (Figura 4.4). En el lumistherm, se pueden llegar a colocar 8 cubetas de medición de 10 disponibles, las dos sobrantes se reservan para la solución de control y para el patrón.

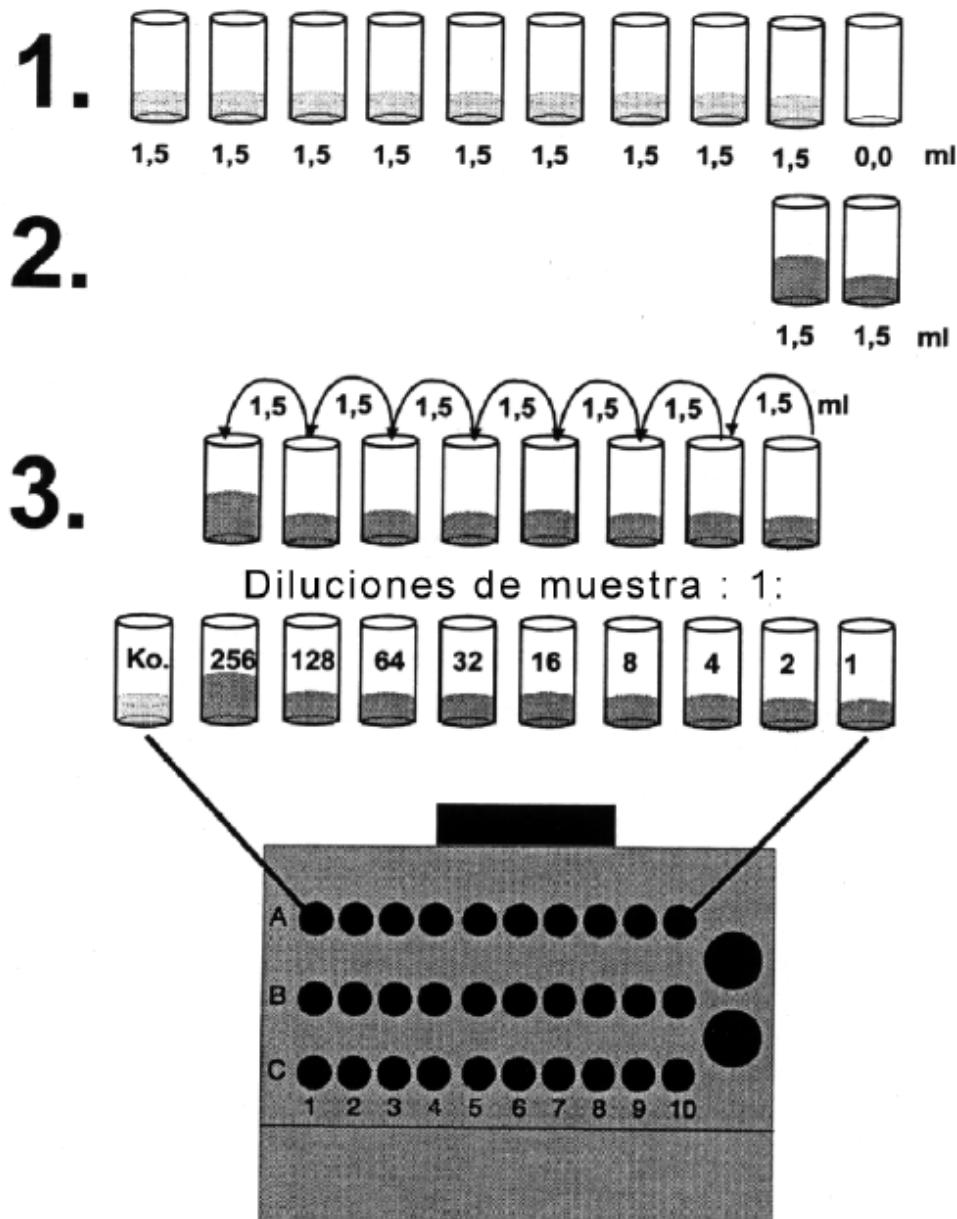


Figura 4.4. Ilustración de la serie de dilución geométrica.

Con una pipeta se traspasa de la cubeta izquierda a la cubeta derecha 1,5 ml de la muestra. Se mezcla cada dilución de la muestra homogeneizando dos o tres veces con la pipeta. En A1 se halla siempre la solución de control de NaCl al 2% sin muestra. En A2 estará el patrón de Dicromato de Potasio y en A10 siempre estará la muestra con la concentración más alta.

En la fila A del lumistherm se coloca:

- En la columna 1: 3 mL de solución salina de NaCl al 2% que será el blanco.
- En la columna 2: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 3: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 4: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 5: 3 mL de la muestra problema.

Quedarían libres las celdillas 6,7, 8, 9, 10 que podrían dedicarse a otra muestra distinta o para ampliar el rango de dilución de la misma.

Se pipetea 1.5 mL de muestra problema de la celdilla 5 de A, a la celdilla 4 de A, con lo cual tendríamos 3 mL en total y la muestra problema estará al 50%.

Se pipetea 1.5 mL de la muestra que está al 50% en la celdilla 4, a la celdilla 3 de A, con lo cual en esta tendremos 3 mL de una solución al 25% de la muestra original.

Igualmente se hace con la celdilla 3, se pipetea 1.5mL de la muestra que está al 25% en la celdilla 3, a la celdilla 2 de A, con lo cual se tiene 3mL en total y la muestra problema estará al 12.5%. El resultado final es el siguiente:

- En la celdilla 1 hay 3 mL de solución salina que será el blanco.
- En la celdilla 2 hay 3 mL de solución de patrón de dicromato de potasio.
- En la celdilla 2 hay 1.5 mL de muestra diluida a.
- En la celdilla 3 hay 1.5 mL de muestra diluida b.
- En la celdilla 4 hay 1.5 mL de muestra de diluida c.

-En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de inicial d.

Se pipetean 0.5 mL de la disolución de bacterias atemperadas y se depositan sobre las celdillas de las filas B y C y se dejan atemperar durante 15 minutos. La Figura 4.3 muestra la situación de las celdillas en el Lumistox 300.

Se hace una lectura inicial I_0 sin muestra, para ello:

-Medimos I_0 de B_1 , añadimos 0.5 mL de A_1 a B_1 .

-Medimos I_0 de C_1 , añadimos 0.5 mL de A_1 a C_1 .

-Medimos I_0 de B_2 , añadimos 0.5 mL de A_2 a B_2 .

Así hasta medir todos los viales de la serie.

El tiempo transcurrido entre la medición de B_1 hasta C_1 será aproximadamente el mismo para todas las sucesivas medidas de toda la serie.

Lectura posterior I_{15} :

Transcurridos 15 minutos se miden todos los viales.

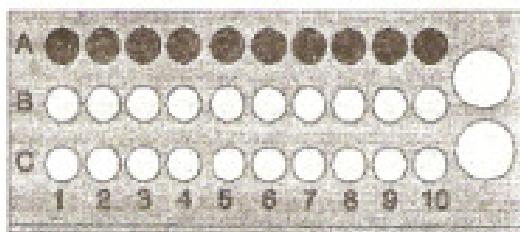


Figura 4.3. Situación de las celdillas del bloque incubador.

Todos los datos tomados se traspasan a una hoja Excel como la que muestra la Figura 4.4 en donde se realizan los cálculos pertinentes para obtener el % de inhibición.

Bacterias: Vibrio Fischeri (LCK 480) FECHA 16/03/2010

Patrón=K2Cr2O7 4mg/l
pH=6-8
Blanco= 2%NaCl

	I ₀	I ₁₅	f _k =I _{tk} /I _{0k}	I _{ct}	% inhibición
B1(blanco)					
C1(blanco)					
B2 (patrón)					
C2 (patrón)					
B3					
C3					
B4					
C4					
B5					
C5					
B6					
C6					
B7					
C7					
B8					
C8					
B9					
C9					
B10					
C10					

Figura 4.4. Tabla a modo de ejemplo para el cálculo del % de Inhibición de una muestra de agua.

Donde:

I₀ es el valor de luminiscencia emitido a tiempo 0.

I₁₅ es el valor de luminiscencia emitido a los 15 minutos.

I_{tk}/I_{0k} son el valor de luminiscencia inicial y final de la soluciones de control

F_k es el factor de corrección.

I_{ct} es la intensidad inicial de la solución, corregida por el factor de corrección.

% inhibición es el porcentaje de inhibición de la luminiscencia después de un periodo de incubación, t.

4.2.1.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE NACL, EL pH, EL COLOR Y LA TURBIDEZ DE LA MUESTRA EN EL TEST DE BACTERIAS LUMINISCENTES

Concentración salina:

Las concentraciones salinas bajas y muy altas de las soluciones de muestra producen perturbaciones en el ensayo. Es recomendable proceder a la adición de NaCl en las muestras desconocidas en tanto que la concentración salina propia de la muestra no sobrepase de manera considerable el 2%. No obstante, en el caso de muestras que se sabe que son muy salinas no se debe salar.

Valor de pH:

El test de bacterías bioluminiscentes no se ve afectado por muestras con valores de pH que se encuentren entre 5 y 10. Soluciones de muestra con valores de pH por debajo de 5 y por encima de 10 interfieren en el test de bacterias bioluminescentes, por lo que previamente deberán ser ajustadas a un pH que se encuentre en la zona neutral.

Color:

Debido a que las fotobacterias emiten luz con el máximo de emisión de 490nm, para las soluciones de color que absorben luz con longitudes de onda entre 450 y 550 nm hay que contar con una alteración en el test de fotobacterias. Pero también las soluciones de muestra coloreadas que presentan una absorción máxima fuera de esta gama afectan al test.

Turbidez:

Es necesaria una sedimentación ó una centrifugación de las muestras para evitar la posible turbidez de las mismas.

4.2.1.7 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL ENSAYO

La figura 4.5 muestra el diagrama de bloques que resume el ensayo completo de toxicidad. En el diagrama se muestra una foto de cada bloque para mayor aclaración y visualización del ensayo completo.

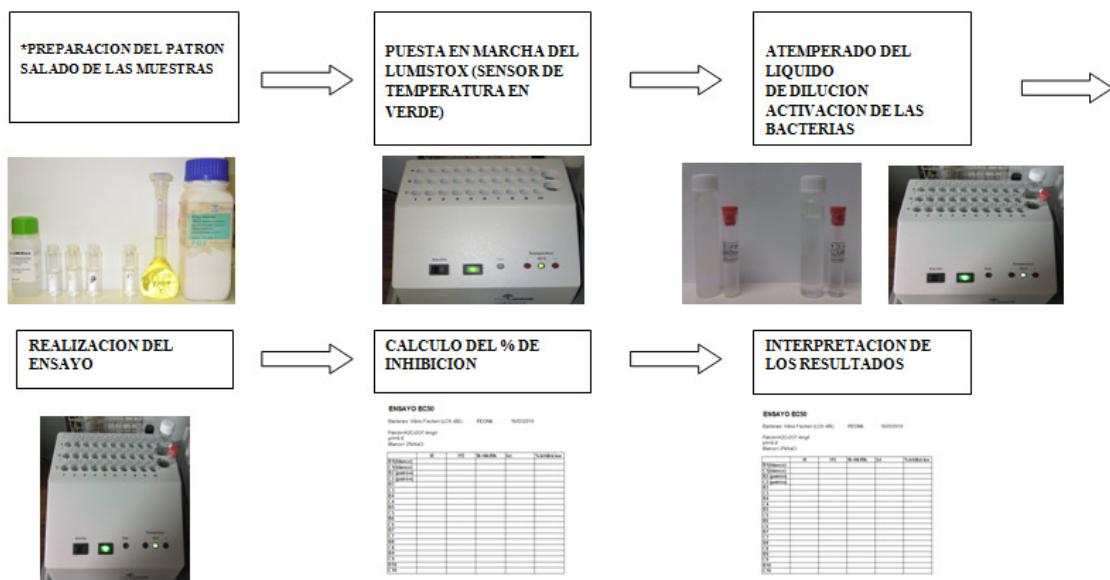


Figura 4.5. Diagrama de bloques del ensayo de toxicidad.

4.3 DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS MUESTRAS

4.3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

A continuación se describen los materiales y reactivos utilizados para los tratamientos aplicados a las muestras acuosas con el objetivo de estudiar la evolución de la toxicidad.

✓ *Catalizador de dióxido de titanio.*

Se usa dióxido de titanio comercial P25 Degussa, que está formado por dos fases cristalinas en la siguiente proporción: 80% anatasa y 20% rutilo. Posee una superficie específica de 35-65 m²/g. La dosis de dióxido de titanio que se usa es de 1 g/L, ya que es la dosis más utilizada en estudios previos y determinada como óptima en los mismos.

✓ *Fuente de luz*

La fotoactivación del dióxido de titanio se lleva a cabo en el UV cercano (300-370 nm). Es necesario utilizar una fuente de radiación artificial para activar el catalizador. En este caso se emplea una lámpara de Xenon que se encuentra dentro de una cámara ATLAS SUNTEST CPS+/XLS+ (Figura 4.6). La cámara solar posee un filtro de cuarzo con capa selectiva de reflexión que evita que llegue la radiación de infrarrojo al interior por lo que la cámara solar produce radiación entre 290-780 nm simulando la radiación solar, objetivo principal de la utilización de este tipo de fuente lumínica. La intensidad de radiación seleccionada es de 500 W/m² lo que corresponde al 50% de la intensidad lumínica de la radiación solar durante el mediodía meridional.



Figura 4.6 Cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+

✓ *Peróxido de hidrógeno*

Se utiliza una solución de peróxido de hidrógeno del 30% m/m de Panreac.

4.3.2 EXPERIMENTACION CON PROCESOS DE OXIDACION AVANZADA

Antes de realizar el experimento fotocatalítico es necesario ajustar el pH de la muestra a pH básico mediante la adición de NaOH. Seguidamente, se añaden los reactivos correspondientes en cada caso y se introduce la muestra en la cámara solar con agitación durante el tiempo de tratamiento. Posteriormente la muestra se deja reposar, con ello se consigue que decante el TiO₂.

Las condiciones de trabajo seleccionadas son 1g/L de TiO₂, H₂O₂ 10nM y 30 minutos de tratamiento. Estas condiciones se seleccionan en base a estudios previos realizados en el grupo de investigación “Calidad y Tratamiento de las aguas” de la Universidad de Zaragoza. Los tratamientos que se van a aplicar para los dos tipos de agua son: procesos de UV/TiO₂ y procesos de UV/TiO₂/H₂O₂.

5. RESULTADOS

En este capítulo se muestran tanto los resultados de la puesta en marcha del método como los análisis de toxicidad de muestras acuosas.

5.1 PUESTA EN MARCHA DEL EQUIPO

En la puesta en marcha del equipo se siguieron los siguientes pasos:

5.1.1 PREPARACIÓN DEL PATRÓN.

Antes de comenzar con el ensayo, y con el fin de llevar a cabo las mediciones correctamente, se tiene que preparar un patrón. Hach-Lange recomienda una serie de patrones y el rango de % de inhibición en el que se debe de situar el patrón experimental para que el ensayo sea correcto. Se utiliza un patrón de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) de 4 mg/L cuyo rango marcado por Hach-Lange es de 20-80% de inhibición.

Se parte de $K_2Cr_2O_7$ sólido puro y se prepara una disolución de 8000 mg/L.

$8000 \text{ mg/L} \times 50 \times 10^{-3} \text{ L} = 400 \text{ mg} \rightarrow \text{Se toma } 0.4 \text{ g de } K_2Cr_2O_7 \text{ a enrasar con agua destilada en un matraz aforado de 50mL.}$

A partir de la disolución de 8000 mg/L se prepara una de 8 mg/L,

$8 \text{ mg/L} \times 50 \times 10^{-3} \text{ L} = 8000 \text{ mg/L} \times V_2 \rightarrow V_2 = 50 \mu\text{L enrasando con agua destilada en un matraz aforado de 50mL.}$

Se prepara una disolución de 8 ppm de dicromato potásico pero en realidad se va a medir el % de inhibición de una de 4 ppm de dicromato potásico ya que durante el ensayo se produce una dilución del 50% del patrón y del blanco. El patrón debe prepararse nuevamente cada semana.

Ejemplo de medición de una solución patrón:

Tabla 5.1. Ejemplo de medición de un patrón.

Muestra	Posición en el Lumistherm	Io	I15	fk	Ict	% Inhibición
Patrón	Replica 1 (B1)	1796	1376	1,10	1974	30,3
	Replica 2 (C1)	1592	1288	1,10	1750	26,4

El resultado del análisis del patrón que muestra la tabla 5.1 generó una inhibición del 28%, tal y como indica el manual para el buen funcionamiento del equipo.

5.1.2 ACONDICIONAMIENTO DEL PATRÓN Y DE LAS MUESTRAS.

Para que las bacterias sobrevivan tienen que tener un medio salino (2% de NaCl), por lo que el patrón se debe salar.

A la disolución de 8 ppm de dicromato que se tiene en un matraz aforado de 50mL, se calcula el volumen de NaCl al 2% a añadir:

$$50\text{mL} \times 0.02 = 1\text{mL de NaCl al 2\%}$$

Hach-Lange suministra NaCl al 7.5%, por lo tanto el volumen a añadir es:

$$(1 \times 100)/7.5 = 13.3 \text{ mL de NaCl al 7.5\%}$$

A las muestras también se les debe añadir NaCl al 2%.

5.1.3 *BLANCO.*

En lo que respecta al blanco, no es necesaria su preparación ya que Hach-Lange proporciona NaCl al 2% exclusivamente para el uso como blanco.

5.1.4 *ACONDICIONAMIENTO DE LAS BACTERIAS VIBRIO FISCHERI.*

El lumistox 300 consta de 10 celdillas, 8 para muestras a analizar, otra para el blanco y otra para el patrón. Al lado de estas existen dos celdas de diámetro más grande que se utilizan para atemperar las bacterias y el líquido de dilución.

El líquido de dilución procedente del congelador se introduce en una de las celdas grandes del aparato cuando el lumistox 300 tiene el sensor de temperatura en verde (ha alcanzado una temperatura de aproximadamente 15°C). (Ver Figura 5.1). Se deja atemperar durante 15 minutos. A continuación, se sacan las bacterias del congelador y se dejan durante 2 minutos en la otra celda de diámetro más grande del Lumistox 300.



Figura 5.1. Lumistherm.

Se añade a las bacterias 0.5 mL de líquido de dilución. Se pipetean con punta estéril las bacterias junto con esos 0.5 mL que se han añadido unas 3 o 4 veces con el fin de activarlas, hasta que se forme una suspensión perfecta, manteniendo luego el vial al menos 10 minutos en el aparato para atemperar.

Se pasan las bacterias (vial pequeño) al vial grande del líquido de dilución, pipeteando varias veces su contenido y se homogeniza volteando varias veces suavemente. En la figura 5.2 se observan los viales de las bacterias y del líquido de dilución.



Figura 5.2. Bacterias y líquido de dilución.

5.1.5 MÉTODO OPERATIVO CON ISOPROPANOL Y H_2O_2 (PUESTA EN MARCHA).

En la puesta en marcha del Lumistox 300, en primer lugar se procedió a calcular el porcentaje de inhibición con el Lumistox 300 utilizando isopropanol (PANREAC 99.8% en peso) y agua oxigenada (PANREAC 30% en volumen) como sustancia modelo. Se seleccionó este alcohol y este peróxido para la puesta en marcha del equipo debido a que son desinfectantes típicos, utilizados para destruir microorganismos. Se utilizó como blanco NaCl al 2%, con un 2% de concentración salina en todas las muestras. El pH de todas las muestras comprendía entre 6-8. El procedimiento seguido fue el de una serie de diluciones de forma geométrica como el explicado en apartado 4.2.1.5 del capítulo “Procedimiento Experimental”.

Se realizaron ensayos realizando diluciones de las sustancias modelo (isopropanol y peróxido de hidrógeno) para la puesta en marcha del equipo. A continuación se muestran los resultados de los ensayos realizados.

ENSAYO 1 UTILIZANDO ISOPROPANOL COMO SUSTANCIA MODELO.

Para este ensayo se selecciona la sustancia modelo al 50%.

En la fila A del lumistherm se coloca:

- En la columna 1: 3 mL de solución salina de NaCl al 2% que será el blanco.
- En la columna 2: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 3: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 4: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 5: 3 mL de la muestra problema.

Se realizan las diluciones del isopropanol de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.1.5.

El resultado final es el siguiente:

- En la celdilla 1 hay 3 mL de solución salina que será el blanco.
- En la celdilla 2 hay 3 mL de solución de patrón de dicromato de potasio.
- En la celdilla 2 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 6.25%.
- En la celdilla 3 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 12.5%.
- En la celdilla 4 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 25%.
- En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 50%.

Se procede a la medición de la luminiscencia tal y como se describe en el apartado 4.2.1.5. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 5.2. % Inhibición de Isopropanol a diferentes concentraciones.

Muestra	Posición	Io	I ₁₅	fk	Ict =fk medio*Io	% Inhibición= (Ict-I ₁₅)*100/Ict	% Inhibición media
Blanco	Replica 1 (B1)	41,6	38,9	0,93	40,352	3,60	-0,33
	Replica 2 (C1)	105,8	107,0	1,01	102,626	-4,26	
Patrón	Replica 1 (B2)	1495,0	1076,0		1450,15	25,80	25,75
	Replica 2 (C2)	1418,0	1022,0		1375,46	25,70	
6,25 % Isopropanol	Replica 1 (B2)	38,9	18,0		37,733	52,30	48,25
	Replica 2 (C2)	111,8	60,5		108,446	44,21	
12,5% Isopropanol	Replica 1 (B3)	57,5	10,4		55,775	81,35	81,15
	Replica 2 (C3)	115,8	21,4		112,326	80,95	
25% Isopropanol	Replica 1 (B4)	87	14,1		84,39	83,29	85,72
	Replica 2 (C4)	132,3	15,2		128,331	88,16	
50% Isopropanol	Replica 1 (B5)	65,8	3,0		63,826	95,30	87,75
	Replica 2 (C5)	70,8	13,6		68,676	80,20	
				fk medio	0,97		

Los resultados reflejados en la tabla 5.2 muestran una buena estabilidad del equipo como refleja el blanco y el patrón. Por otro lado, de las muestras estudiadas, diluciones de isopropanol del 50, 25, 12.5 y 6.25% muestran inhibiciones del 88, 86, 81 y 43% respectivamente. Por lo tanto una concentración de 48.75 g/L produce una inhibición de del 50% aproximadamente. Por lo tanto la EC50 es igual a 49000 mg/L.

Si comparamos con el límite que aparece en el Decreto 78/2004 sobre toxicidad (Dilución 1/15 ó dilución 1/30 que produce el 50% de inhibición) cabe destacar que esta sustancia es poco toxica en el agua.

ENSAYO 2 UTILIZANDO ISOPROPANOL COMO SUSTANCIA MODELO EN OTRAS CONCENTRACIONES.

Para este ensayo se selecciona la sustancia modelo diluida al 0.11%, con una concentración inicial de 858 mg/L.

En la fila A del lumistherm se coloca:

- En la columna 1: 3 mL de solución salina de NaCl al 2% que será el blanco.
- En la columna 2: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 3: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 4: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 5: 3 mL de la muestra problema.

Se realizan las diluciones del isopropanol de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.1.5.

El resultado final es el siguiente:

- En la celdilla 1 hay 3 mL de solución salina que será el blanco.
- En la celdilla 2 hay 3 mL de solución de patrón de dicromato de potasio.
- En la celdilla 2 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 0.027%.
- En la celdilla 3 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 0.055%.
- En la celdilla 4 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 0.08%.
- En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de isopropanol al 0.11%.

Se procede a la medición de la luminiscencia tal y como se describe en el apartado 4.2.1.5. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 5.3. % de Inhibición de Isopropanol a diferentes concentraciones.

Muestra	Posición	Io	I ₁₅	fk	Ict =fk medio*Io	% inhibición= (Ict-I ₁₅)*100/Ict	% Inhibición media
Blanco	Replica 1 (B1)	121,2	117,5	0,97	121,2	3,05	0,18
	Replica 2 (C1)	111,2	114,2	1,03	111,2	-2,70	
0,027% Isopropanol	Replica 1 (B3)	137,2	122,1		137,2	11,01	9,83
	Replica 2 (C3)	119,1	108,8		119,1	8,65	
0,055% Isopropanol	Replica 1 (B4)	112,8	101,2		112,8	10,28	11,39
	Replica 2 (C4)	130,5	114,2		130,5	12,49	
0,08 % Isopropanol	Replica 1 (B5)	170,1	147,5		170,1	13,29	16,05
	Replica 2 (C5)	170,6	138,5		170,6	18,82	
0,11% Isopropanol	Replica 1 (B6)	143,6	119,1		143,6	17,06	19,34
	Replica 2 (C6)	140,6	110,2		140,6	21,62	
				fk medio	1,0		

Los resultados reflejados en la tabla 5.3 muestran una buena estabilidad del equipo como refleja el blanco, no se realizó la medición del patrón ya que se realizaron los ensayos de la tabla 5.2 y 5.3 seguidos. Por otro lado, de las muestras estudiadas, diluciones de isopropanol del 0.11, 0.08, 0.055, 0.027% muestran inhibiciones del 10, 11, 16 y 19% respectivamente. Conforme menor dilución de la muestra, mayor porcentaje de inhibición, siendo por tanto más tóxica.

ENSAYO 3 UTILIZANDO PEROXIDO DE HIDROGENO COMO SUSTANCIA MODELO.

Para este ensayo se utiliza peróxido de hidrógeno al 30% de pureza (Panreac). Se llevan a cabo tres diluciones, al 50% (dilución final del 15%), al 25% (dilución final del 7.5%) y al 12.5% (dilución final del 3.75%).

En la fila A del lumistherm se coloca:

- En la columna 1: 3 mL de solución salina de NaCl al 2% que será el blanco.
- En la columna 2: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 3: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 4: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 5: 3 mL de la muestra problema.

Se realizan las diluciones del peróxido de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.1.5.

El resultado final es el siguiente:

- En la celdilla 1 hay 3 mL de solución salina que será el blanco.
- En la celdilla 2 hay 3 mL de solución de patrón de dicromato de potasio.
- En la celdilla 2 hay 1.5 mL de muestra de H_2O_2 diluido al 12.5% (dilución final del 3,75%).
- En la celdilla 3 hay 1.5 mL de muestra de H_2O_2 diluido al 25% (dilución final del 7,5%).
- En la celdilla 4 hay 1.5 mL de muestra de H_2O_2 diluido al 50% (dilución final del 15%).
- En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de H_2O_2 sin diluir (dilución en botella del 30%).

Se procede a la medición de la luminiscencia tal y como se describe en el apartado 4.2.1.5. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 5.4. % de Inhibición de H₂O₂ a diferentes concentraciones.

Muestra	Posición	I ₀	I ₁₅	f _k	Ict =f _k medio*I ₀	% inhibición= (Ict-I ₁₅)*100/Ict	% Inhibición media
Blanco	Replica 1 (B1)	1044,0	1070,0	1,02	1033,56	-3,53	-0,82
	Replica 2 (C1)	1082,0	1051,0	0,97	1071,18	1,88	
Patrón	Replica 1 (B2)	1495,0	1076,0		1480,05	27,30	27,25
	Replica 2 (C2)	1418,0	1022,0		1403,82	27,20	
3,75% H ₂ O ₂	Replica 1 (B3)	1005,0	-0,06		994,95	100,01	100,00
	Replica 2 (C3)	913,5	-0,01		904,37	100,00	
7,5% H ₂ O ₂	Replica 1 (B4)	950,7	-0,08		941,19	100,01	100,01
	Replica 2 (C4)	821,0	-0,11		812,79	100,01	
15% H ₂ O ₂	Replica 1 (B5)	1050,0	-0,03		1039,50	100,00	100,00
	Replica 2 (C5)	984,8	0,05		974,95	99,99	
30% H ₂ O ₂	Replica 1 (B6)	1122,0	-0,08		1110,78	100,01	100,01
	Replica 2 (C6)	1072,0	-0,07		1061,28	100,01	
				f_k medio	0,99		

Como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 5.4 el equipo de medida muestra una buena repetitividad en la señal en el caso de los blancos. La intensidad inicial (I_0) y final (I_{15}) son bastante similares y como era de esperar no se observa tan apenas disminución en la señal, es decir, las bacterias están emitiendo aproximadamente la misma luz. Respecto a los resultados de las diluciones de H_2O_2 y como cabía esperar la inhibición es del 100% para todas las muestras debido a la alta capacidad desinfectante de esta sustancia en comparación al isopropanol.

ENSAYO 4 UTILIZANDO PEROXIDO DE HIDROGENO EN OTRAS CONCENTRACIONES.

En este caso se decidió diluir en mayor medida el peróxido como consecuencia de los resultados obtenidos en las diluciones anteriores.

En la fila A del lumistherm se coloca:

- En la columna 1: 3 mL de solución salina de NaCl al 2% que será el blanco.
- En la columna 2: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 3: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 4: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 5: 3 mL de la muestra problema.

Se realizan las diluciones del peróxido de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.1.5.

El resultado final es el siguiente:

- En la celdilla 1 hay 3 mL de solución salina que será el blanco.
- En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de H_2O_2 diluido al 0.39% (dilución total del 0.11%).

-En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 0.78% (dilución total del 0.23%).

-En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 1.56% (dilución total del 0.46%).

-En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 3.125% (dilución final del 0.93%).

-En la celdilla 2 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 6.25%. (dilución final del 1.87%).

-En la celdilla 3 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 12.5% (dilución final del 3.75%).

-En la celdilla 4 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 25% (dilución final del 7.5%).

-En la celdilla 5 hay 1.5 mL de muestra de H₂O₂ diluido al 50% (dilución final del 15%).

Se procede a la medición de la luminiscencia tal y como se describe en el apartado 4.2.1.5. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 5.5. % de Inhibición de H₂O₂ a diferentes concentraciones.

	Posición	I ₀	I ₁₅	fk	Ict =fk medio*I ₀	% inhibición= (Ict-I ₁₅)*100/Ict	% Inhibicion media
Blanco	Replica 1 (B1)	1488,0	1507,0	1,01	1517,76	0,71	-0,78
	Replica 2 (C1)	1440,0	1502,0	1,04	1468,80	-2,26	
0,11% H ₂ O ₂	Replica 1 (B2)	788,0	7,1		803,76	99,11	99,24
	Replica 2 (C2)	1226,0	7,9		1250,52	99,37	
0,23% H ₂ O ₂	Replica 1 (B3)	1237,0	5,2		1261,74	99,59	99,59
	Replica 2 (C3)	1381,0	5,7		1408,62	99,59	
0,46% H ₂ O ₂	Replica 1 (B4)	1195,0	8,3		1218,90	99,32	99,54
	Replica 2 (C4)	1175,0	2,74		1198,50	99,77	
0,93% H ₂ O ₂	Replica 1 (B5)	1333,0	2,15		1359,66	99,84	99,84
	Replica 2 (C5)	1234,0	2,04		1258,68	99,84	
1,87% H ₂ O ₂	Replica 1 (B6)	1356,0	1,08		1383,12	99,92	99,91
	Replica 2 (C6)	1264,0	1,39		1289,28	99,89	
3,75% H ₂ O ₂	Replica 1 (B7)	1305,0	0,32		1331,10	99,98	99,97
	Replica 2 (C7)	1377,0	0,38		1404,54	99,97	
7,5% H ₂ O ₂	Replica 1 (B8)	1282,0	0,25		1307,64	99,98	99,98
	Replica 2 (C8)	1388,0	0,19		1415,76	99,99	
15% H ₂ O ₂	Replica 1 (B9)	1494,0	0,01		1523,88	100,00	100,00
	Replica 2 (C9)	1439,0	0,10		1467,78	99,99	
				fk medio	1,02		

Como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 5.5 el equipo de medida muestra una buena repetitividad en la señal en el caso del blanco. El porcentaje de inhibición es prácticamente del 100%, lo que significa que la toxicidad es muy elevada, era de esperar ya que el peróxido de hidrógeno es mucho más desinfectante que el isopropanol.

5.2 ANALISIS DE TOXICIDAD EN MUESTRAS REALES

El método operativo con muestras acuosas fue el siguiente:

En la fila A del lumistherm se coloca:

- En la columna 1: 3 mL de solución salina de NaCl al 2% que será el blanco.
- En la columna 2: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 3: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 4: 1.5 mL de solución salina de NaCl al 2%
- En la columna 5: 3 mL de la muestra problema.

Quedarían libres las celdillas 6,7, 8, 9, 10 que podrían dedicarse a otras muestras distintas.

Se pipetean 0.5 mL de la disolución de bacterias atemperadas y se depositan sobre las celdillas de las filas B y C y se dejan atemperar durante 15 minutos. La Figura 5.1 muestra la situación de las celdillas en el Lumistox 300.

Se hace una lectura inicial I_0 sin muestra, para ello:

- Medimos I_0 de B_1 , añadimos 0.5 mL de A_1 a B_1 .
- Medimos I_0 de C_1 , añadimos 0.5 mL de A_1 a C_1 .
- Medimos I_0 de B_2 , añadimos 0.5 mL de A_2 a B_2 .

Así hasta medir todos los viales de la serie.

El tiempo transcurrido entre la medición de B_1 hasta C_1 será aproximadamente el mismo para todas las sucesivas medidas de toda la serie.

Lectura posterior I_{15} :

Transcurridos 15 minutos se miden todos los viales.

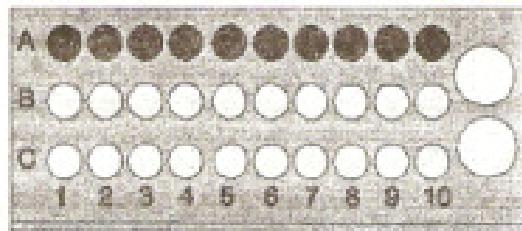


Figura 5.1. Situación de las celdillas del bloque incubador.

Todos los datos tomados se traspasan a una hoja Excel como la que muestra la Figura 5.2 en donde se realizan los cálculos pertinentes para obtener el % de inhibición.

Bacterias: Vibrio Fischeri (LCK 480) FECHA 16/03/2010

Patrón=K2Cr2O7 4mg/l
pH=6-8
Blanco= 2%NaCl

	I ₀	I ₁₅	f _k =I _{tk} /I _{0k}	I _{ct}	% inhibición
B1(blanco)					
C1(blanco)					
B2 (patrón)					
C2 (patrón)					
B3					
C3					
B4					
C4					
B5					
C5					
B6					
C6					
B7					
C7					
B8					
C8					
B9					
C9					
B10					
C10					

Figura 5.2. Tabla a modo de ejemplo para el cálculo del % de Inhibición de una muestra de agua.

Donde:

I₀ es el valor de luminiscencia emitido a tiempo 0.

I₁₅ es el valor de luminiscencia emitido a los 15 minutos.

I_{tk}/I_{0k} son el valor de luminiscencia inicial y final de la soluciones de control

F_k es el factor de corrección.

I_{ct} es la intensidad inicial de la solución, corregida por el factor de corrección.

% inhibición es el porcentaje de inhibición de la luminiscencia después de un periodo de incubación, t.

Aguas superficiales

En la tabla 5.6 se recogen los valores de toxicidad obtenidos en las muestras iniciales y en las muestras tratadas mediante procesos UV/TiO₂.

Tabla 5.6. Toxicidad de las muestras de agua superficial.

	Posición	I_o	I_{15}	f_k	$Ict = f_k \text{ medio} * I_o$	% inhibición= $(Ict - I_{15}) * 100 / Ict$	% Inhibicion media
Blanco	Replica 1 (B1)	1518	1475	0,97	1472,46	-0,17	0,8
	Replica 2 (C1)	1494	1475	0,99	1449,18	-1,78	
Patrón	Replica 1 (B2)	1463	882,3		1419,11	37,83	37
	Replica 2 (C2)	1522	959,2		1476,34	35,03	
Inicial fortificada con plaguicidas	Replica 1 (B3)	1475	989,8		1430,75	30,82	31
	Replica 2 (C3)	1446	974,2		1402,62	30,54	
UV/TiO ₂	Replica 1 (B4)	1528	1117		1482,16	24,64	22
	Replica 2 (C4)	1468	1166		1423,96	18,12	
UV/TiO ₂ /H ₂ O ₂	Replica 1 (B5)	1524	43,96		1478,28	97,03	97
	Replica 2 (C5)	1502	43,45		1456,94	97,02	
			f_k medio	0,97			

Se observa que la muestra inicial de agua presenta un 31% de inhibición, por lo que principalmente los plaguicidas presentes producen una inhibición del 31%. La concentración total de plaguicidas presente en la muestra es de 22.7 μ g/L. Al tratar esta agua con el proceso UV/TiO₂ la muestra es menos tóxica puesto que baja el porcentaje de inhibición reduciéndose la toxicidad en un 29%. Esto se debe a la degradación de los plaguicidas mediante esta técnica. Por otro lado, al utilizar el proceso UV/TiO₂/H₂O₂, se deduce que el peróxido de hidrógeno hace aumentar la toxicidad de la muestra ya que se produce un aumento considerable de porcentaje de inhibición. Como ya se conoce, el peróxido de hidrógeno es un desinfectante por lo que produce una inhibición casi total de las bacterias *Vibrio Fischeri*.

El análisis se volvió a realizar eliminando previamente el H₂O₂ y se obtuvo un % de inhibición del 71%, por lo que se puede decir que el peróxido produce toxicidad que interfiere en el ensayo.

Aguas de salida de depuradora

En este ensayo se procedió de manera similar que con las muestras de “aguas superficiales”, los resultados se muestran en la tabla 5.7, dicha tabla no contiene datos del análisis del blanco y del patrón ya que los ensayos se llevaron a cabo en una misma tanda (los análisis de los dos tipos de aguas en una misma tanda), aunque se expresen los resultados en distintas tablas.

Tabla 5.6. Toxicidad de las muestras de agua de salida de depuradora.

	Posición	I_o	I_{15}	f_k	$Ict = f_k \text{ medio} * I_o$	$\% \text{ inhibición} = (Ict - I_{15}) * 100 / Ict$	$\% \text{ Inhibición media}$
Inicial fortificada con plaguicidas	Replica 1 (B6)	2156	1344	0,97	2091,32	35,73	36
	Replica 2 (C6)	2267	1387	0,99	2198,99	36,93	
UV/TiO ₂	Replica 1 (B7)	2180	1390		2114,60	34,27	24
	Replica 2 (C7)	2122	1767		2058,34	14,15	
UV/TiO ₂ /H ₂ O ₂	Replica 1 (B8)	1422	7,62		1379,34	99,45	99
	Replica 2 (C8)	2165	30,53		2100,05	98,55	
		f_k medio	0,97				

Como se observa en la tabla 5.7, el agua de salida de depuradora produce una toxicidad en el agua (medida como % inhibición) del 36%. Por otro lado, la muestra que ha sido sometida al proceso UV/TiO₂ presenta una toxicidad del 24%, por lo que la disminución de toxicidad es apreciable. En el caso de la muestra tratada con mediante UV/TiO₂/H₂O₂ e igual que sucedía con la muestra superficial, la inhibición es total, como consecuencia de la presencia del H₂O₂.

Esta muestra se volvió a analizar eliminando previamente el H₂O₂ y el resultado obtenido fue del 82%, por lo que ocurre como en el caso de las aguas superficiales, el peróxido de hidrógeno produce una toxicidad en la muestra que interfiere en la medida.

5.3 COMPARATIVA ENTRE MUESTRAS INICIALES FORTIFICADAS Y MUESTRAS TRATADAS

En cuanto a las muestras iniciales fortificadas, cabe destacar que el porcentaje de inhibición de las aguas de salida de depuradora es más elevado que el de las superficiales, la diferencia no es muy considerable, pero podemos encontrar una razón de este aumento. En las aguas de salida de depuradora puede existir un mayor número de elementos tóxicos, sin tener en cuenta la fortificación con plaguicidas, que no pueden ser depurados por las técnicas convencionales de depuración que existen en la actualidad, haciendo que la toxicidad aumente.

En cuanto a las muestras tratadas, se observa que utilizando el proceso UV/TiO₂ la toxicidad disminuye en ambos tipos de muestras, también se ve que utilizando el proceso UV/TiO₂/H₂O₂ el peróxido hace que el % de inhibición aumente y por tanto la toxicidad. También se observa que si inhibimos el peróxido antes de realizar el análisis la toxicidad el porcentaje de inhibición disminuye, por lo que se concluye que el peróxido es una interferencia en la medida de la toxicidad.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas del trabajo realizado en este PFC se resumen a continuación:

- Los métodos existentes para analizar toxicidad en aguas son variados pero todos ellos tienen la problemática de trabajar con bacterias que son sensibles a muchos factores.
- Dentro de las técnicas existentes, la utilización de la bacteria *Vibrio Fischeri* para analizar la toxicidad de aguas es recomendable, ya que el estudio realizado en este proyecto final de carrera muestra que el método analítico puesto en marcha es bastante repetitivo medianate el control del blanco.
- La puesta en marcha con desifectantes como el isopropanol y el peróxido de hidrógeno indicó una buena repetitividad de los ensayos.
- La utilización de la bacteria *Vibrio Fischeri* en el análisis de toxicidad de muestras reales es apta, así como para el control de la evolución de la toxicidad en muestras tratadas mediante distintos procesos. El inconveniente principal es el coste económico de las bacterias.
- La aplicación del proceso UV/TiO₂ tanto a muestras del canal como a muestras de agua de salida de EDAR produce una disminución de la toxicidad. En el caso del proceso UV/TiO₂/H₂O₂ es necesario eliminar la interferencia del peróxido para poder obtener el valor real de toxicidad.

7. BIBLIOGRAFIA

- ✓ **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 21st Edition. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

- ✓ **Decreto 38/2004** del 24 de Febrero del Gobierno de Aragón, por el que se aprueba el Reglamento de los vertidos de aguas residuales a las redes municipales de alcantarillado. (BOA Nº 30).

- ✓ **Directiva 2006/60/CE** de la Comisión de 7 de Julio de 2006 que modifica los anexos de la Directiva 90/642/CEE. (BOE Nº 83).

- ✓ **Directiva 76/464/CEE** del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.

- ✓ **Decreto 1620/2007** del 7 de Diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. (BOE Nº 294).

- ✓ **Directiva 82/243/CEE** del Consejo, de 31 de marzo de 1982, que modifica la Directiva 73/405/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensoactivos aniónicos.

- ✓ **Orden MAM 85/2008**, de 16 de enero, por la que se establecen los criterios técnicos para la valoración de los daños al dominio público hidráulico y las normas sobre toma de muestras y análisis de vertidos de aguas residuales. (BOE Nº 25).
- ✓ **Lumistox 300**. Manual de usuario. **DR LANGE**. Abril 1998 a partir de la versión 2.21. BDA318.
- ✓ Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización / Metcalf and Eddy ; McGraw-Hill, D.L. 2000.
- ✓ Miguel Salcedo, Natividad. “**Estudio de la eliminación de plaguicidas presentes habitualmente en aguas de la cuenca del Ebro mediante procesos de oxidación avanzada**”. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Zaragoza. 2010.
- ✓ Miguel Salcedo, Natividad. “**Eliminación de plaguicidas de aguas naturales mediante procesos de oxidación avanzada con dióxido de titanio**”. Proyecto Fin de Carrera. Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Zaragoza, 2006.
- ✓ López Martín, Andrea. “**Aplicación de procesos convencionales en la regeneración de aguas depuradas: Eliminación de contaminantes peligrosos**”. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza, 2010.

- ✓ Luzón Gil, Jorge. “**Influencia del proceso de oxidación en el tratamiento de aguas de abastecimiento**”. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza, 2010.

- ✓ **Norma ISO/DIS 11348.** Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio Fischeri* (Luminescent bacteria test).

- ✓ **Oppenländer, T.** **Photochemical Purification of Water and Air.** Wiley-VCH. ISBN 3-527-30563-7, Germany (2003).

- ✓ **Parsons, S.** **Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater treatment.** IWA. ISBN: 1843390175 (2004).

Páginas Web

www.aragob.es : Página web del Gobierno de Aragón.

www.mma.com : Página web del Ministerio de Medio Ambiente.

www.epa.gov : Página web de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos.

www.miliarium.com : Página web de Ingeniería Civil y Medio Ambiente.

www.drlange.com : Página web del sumistrador del equipo Lumistox 300.

<http://webbook.nist.gov/> : Página web de química del NIST.

ANEXO I

ORDEN MAM 85/2008

Provincia de Albacete: La comarca veterinaria de Alcaraz.

En la Comunidad de Madrid: Las comarcas veterinarias de Aranjuez, El Escorial, Grijón, Navalcarnero, San Martín de Valdeiglesias, Arganda del Rey, Villarejo de Salvanés, Alcalá de Henares, Torrelaguna, Colmenar Viejo y municipio de Madrid.

Provincia de Cáceres.

Provincia de Almería, las comarcas veterinarias de Poniente, Río Andarax, Alto Almanzora y Bajo Andarax.

Provincia de Granada, las comarcas veterinarias de Motril y Órgiva.

C).3 Zona estacionalmente libre desde el 15 de diciembre de 2007.

Provincia de Ávila, las comarcas veterinarias de Arenas de San Pedro, Candelada y Sotillo de la Adrada.

Provincia de Badajoz.

Provincia de Jaén: La comarca veterinaria de Andújar, Jaén, Alcalá la Real, Huelma, Ubeda, Linares y Santiesteban del Puerto.

Provincia de Huelva: Las comarcas veterinarias de Cortegana, Aracena, Puebla de Guzmán, Valverde del Camino, La Palma del Condado y Cartaya.

Provincia de Córdoba: Las comarcas veterinarias Montoro, Pozoblanco, Hinojosa del Duque, Peñarroya-Pueblo Nuevo, Posadas, Montilla, Lucena y Baena.

Provincia de Sevilla: Las comarcas veterinarias de Lebrija, Marchena, Osuna, San Lucar la Mayor, Utrera, El Ronquillo, Cazalla, Cantillana, Carmona y Écija.

Provincia de Málaga: Las comarcas veterinarias de Ronda y Antequera.

Provincia de Cádiz: Las comarcas veterinarias de Campiña y Sierra de Cádiz.

C).4 Zona estacionalmente libre desde el 30 de diciembre de 2007.

Provincia de Huelva: La comarca veterinaria de Almonte.

Provincia de Cádiz: La comarca veterinaria de Litoral.

C).5 Zona no estacionalmente libre

Provincia de Málaga: Las comarcas veterinarias de Málaga, Cartaya, Estepona y Vélez Málaga.

Provincia de Cádiz: La comarca veterinaria de Campo de Gibraltar y La Janda.

Ciudades de Ceuta y Melilla.

D) Zona restringida S-8:

Zona estacionalmente libre desde el 15 de diciembre de 2007.

En la Comunidad Autónoma de Asturias: Las comarcas veterinarias de Villaviciosa, Ribadesella y Llanes

E) Zona libre: El resto del territorio nacional.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE

1498

ORDEN MAM/85/2008, de 16 de enero, por la que se establecen los criterios técnicos para la valoración de los daños al dominio público hidráulico y las normas sobre toma de muestras y análisis de vertidos de aguas residuales.

El artículo 117.1 del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, determina que las infracciones administrativas por incumplimiento de lo establecido en la citada norma se

calificarán teniendo en cuenta, entre otros criterios, su repercusión en el orden y el aprovechamiento del dominio público hidráulico y el deterioro producido en la calidad del recurso.

De acuerdo con la anterior habilitación, en el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, se establecieron los criterios para la calificación de las infracciones, fijando, entre otros, uno de carácter objetivo para graduar las infracciones en función del valor de los daños ocasionados al dominio público hidráulico.

Por otro lado, el artículo 118.1 de la Ley de Aguas establece igualmente que, con independencia de las sanciones que se impongan, los infractores podrán ser obligados a reparar los daños y perjuicios ocasionados al dominio público hidráulico, así como a reponer las cosas a su estado anterior, con la precisión expresa de que será el órgano sancionador quien fijará ejecutoriamente las indemnizaciones que deban exigirse en estos casos. La anterior medida fue desarrollada en el artículo 325.1 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, según el cual, la obligación del infractor de indemnizar los daños y perjuicios causados, además del pago de la multa que corresponda, sólo resulta exigible cuando las cosas no puedan ser repuestas a su estado anterior o, en todo caso, cuando subsistan daños al dominio público hidráulico como consecuencia de la infracción.

Razones evidentes de seguridad jurídica y de garantía de la adecuada protección del recurso, aconsejan, por tanto, disponer de criterios objetivos que permitan una adecuada valoración de los daños causados al dominio público hidráulico.

En este sentido, el artículo 28.j) de la Ley de Aguas atribuye a la Junta de Gobierno de los organismos de cuenca la función de aprobar, en su caso, criterios generales para la determinación de las indemnizaciones por daños y perjuicios ocasionados al dominio público hidráulico. Del mismo modo, en el artículo 326.1 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico se indica que la valoración de los daños al dominio público hidráulico se realizará por el órgano sancionador, habilitando al Ministerio de Medio Ambiente para establecer los criterios técnicos para su determinación, sin perjuicio de las competencias ya comentadas de las Juntas de Gobierno de los organismos de cuenca.

Por otro lado, en el artículo 326.2 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico también se establece que si los daños se hubiesen producido en la calidad del agua, para su valoración se tendrá en cuenta el coste del tratamiento del vertido, así como su peligrosidad y la sensibilidad del medio receptor. En este sentido, los daños en la calidad de las aguas son normalmente de difícil cuantificación tanto por la propia peculiaridad del medio como por la compleja caracterización de los vertidos que los provocan, por lo que, para una adecuada valoración de los daños en la calidad de las aguas, resulta conveniente establecer además reglas objetivas sobre las metodologías de toma de muestras y análisis de vertidos de aguas residuales. Para ello, en la presente orden se establece, por un lado, una metodología de toma de muestras y análisis basada en las técnicas más actualizadas en la materia, de forma que se garantice tanto la fiabilidad del resultado analítico como el derecho de defensa del sujeto imputado en el correspondiente procedimiento sancionador. Igualmente, se establece un sistema objetivo de valoración de daños en la calidad del agua, a través de una fórmula que combina, a partir del coste de tratamiento, la peligrosidad del vertido con la sensibilidad del medio receptor.

Las normas establecidas en esta orden serán de aplicación en las cuencas hidrográficas de competencia estatal, de conformidad con lo establecido en el artículo 149.1.22 de la Constitución Española, si bien es preciso señalar que, según tiene declarado el Tribunal Constitucional, fun-

damentalmente en su sentencia 227/1988, de 29 de noviembre, los recursos hídricos no son solo un bien respecto del que es preciso establecer el régimen jurídico de dominio, gestión y aprovechamiento en sentido estricto, sino que constituyen además el soporte físico de una pluralidad de actividades, públicas o privadas, en relación con las cuales la Constitución Española y los Estatutos de Autonomía atribuyen competencias tanto al Estado como a las comunidades autónomas.

Por último cabe recordar que la Ley 26/2007, de 23 de octubre, de Responsabilidad Medioambiental, ha establecido un nuevo marco jurídico para la valoración de los daños causados al medio ambiente, en el que se incluyen los daños a las aguas. Por tal motivo, esta orden deberá adaptarse al futuro reglamento de ejecución previsto en la disposición final tercera de la citada ley, por la que se faculta al Gobierno para aprobar, entre otras cuestiones, la definición del método de evaluación del daño.

En su virtud, en función de la habilitación contenida en el artículo 326 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, dispongo:

CAPÍTULO I

Disposiciones generales

Artículo 1. *Objeto y ámbito de aplicación.*

1. Esta orden tiene por objeto determinar los criterios técnicos para la valoración de los daños ocasionados al dominio público hidráulico como consecuencia de la comisión de infracciones por incumplimiento de lo establecido en la legislación de aguas, así como, en los supuestos de conductas que puedan producir daños en la calidad del agua, las normas sobre toma de muestras y análisis de vertidos de aguas residuales.

2. Las disposiciones establecidas en esta orden serán de aplicación en los procedimientos sancionadores incoados en cuencas de competencia de la Administración General del Estado.

Artículo 2. *Valoración de daños al dominio público hidráulico.*

1. En los supuestos previstos en el artículo 326.1 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, los daños ocasionados al dominio público se valorarán de acuerdo con los criterios técnicos determinados en el Capítulo II y, en su caso, teniendo en cuenta los criterios generales que hayan acordado las Juntas de Gobierno de los organismos de cuenca, en aplicación de lo previsto en el artículo 28.j) de la Ley de Aguas.

A estos efectos, los organismos de cuenca tendrán en cuenta los criterios técnicos establecidos en esta orden a la hora de aprobar criterios generales sobre la determinación de las indemnizaciones por daños y perjuicios ocasionados al dominio público hidráulico.

2. En los supuestos previstos en el artículo 326.2 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, la valoración de los daños producidos en la calidad del agua se hará atendiendo al coste del tratamiento del vertido, a su peligrosidad y a la sensibilidad del medio receptor, de acuerdo con los criterios técnicos determinados en el Capítulo III.

3. En el supuesto contemplado en el apartado 1, el importe de los daños al dominio público hidráulico incluirá, además, el coste adicional de la restauración ambiental que, en su caso, sea necesario realizar para garantizar la reposición del dominio público hidráulico a su estado anterior, teniendo en cuenta su estado, el régimen hidrológico y hidráulico existentes y el tiempo de reversibilidad del daño causado, según la metodología expuesta en esta orden.

CAPÍTULO II

Criterios técnicos para la valoración de los daños al dominio público hidráulico, en los supuestos previstos en el artículo 326.1 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico

Artículo 3. *Criterios de valoración.*

La valoración de los daños al dominio público hidráulico se hará teniendo en cuenta la legislación general de aguas y las previsiones del correspondiente plan hidrológico de cuenca y tomando en consideración las bases establecidas en el artículo 2, y los criterios técnicos específicos establecidos en este capítulo.

De acuerdo con el artículo 2.3 la valoración de daños se realizará a partir de la siguiente expresión genérica:

$$V_{\text{Daño}} = V_{\text{DPH}} [\text{€}] \times K_x + C_{\text{RA}} [\text{€}] \times K_{\text{RV}} \times K_s$$

Donde:

V_{DPH} = Valor económico del dominio público hidráulico afectado, exponiéndose en cada artículo de este capítulo su metodología de cálculo específica.

K_x = Coeficiente adimensional que las circunstancias especiales del estado del dominio público hidráulico en el momento de cometerse la infracción. Sus valores se presentan en las tablas 1 y 2 del Anexo I.

C_{RA} = Coste de las medidas de restauración ambiental que restituyan el dominio público hidráulico a un estado lo más cercano posible al original. Las fases serán, al menos, los tratamientos necesarios para lograr la misma composición y estructura del terreno afectado, su revegetación, en su caso y los tratamientos selvícolas necesarios para garantizar su continuidad. Las unidades de obra en las que estas fases se descompongan se basarán en las tarifas oficiales de los medios propios de la Administración.

K_{RV} = Coeficiente adimensional que pondera el tiempo que tardará en recuperar el dominio público hidráulico su estado original, en los casos en que sea posible. Sus valores se presentan en la tabla 3 del Anexo I.

K_s = Coeficiente adimensional que refleja la sensibilidad e importancia del medio receptor donde se comete la infracción. Sus valores se presentan en la tabla 4 del Anexo I. En caso de que el medio receptor tenga varias clasificaciones asignadas, se utilizará el K_s más alto.

Artículo 4. *Daños por extracción ilegal de agua.*

1. El importe de los daños al dominio público hidráulico será el resultado de aplicar la expresión del artículo 3, en la que el valor económico del dominio público hidráulico afectado se obtendrá al multiplicar el volumen de agua derivada o extraída por el coste unitario del agua.

2. En lo que se refiere al volumen de agua extraída, se estará a lo que determine el correspondiente contador volumétrico, si está instalado. Si no está instalado el citado contador, el volumen se determinará mediante los siguientes criterios indirectos:

a) En el caso de agua extraída para regadío, la cantidad de agua extraída se calculará aplicando a la superficie regada las dotaciones establecidas en el correspondiente plan hidrológico de cuenca para el tipo de cultivo de que se trate o las aprobadas por el organismo de cuenca, y notificadas a los interesados, en planes de explotación o normas provisionales de gestión. De no existir dotaciones en los instrumentos mencionados, la cantidad de agua extraída se determinará en función del tipo de cultivo, zona y sistema de riego utilizados. El cómputo se realizará por el periodo que medie entre el inicio de la correspondiente campaña de riego y la fecha en la que se hayan constatado los hechos que dieron lugar a la infracción.

b) En el caso de agua extraída para abastecimiento, la cantidad de agua extraída se calculará aplicando al

número de personas abastecidas la dotación por persona prevista en el correspondiente plan hidrológico de cuenca. Cuando el agua se destine a abastecimiento de poblaciones que constituyan generalmente la residencia habitual de sus habitantes, el cómputo se realizará por períodos anuales. En caso contrario, el cómputo se realizará por el periodo de tiempo que marque el correspondiente plan hidrológico de cuenca o, en su defecto, el organismo de cuenca, para las segundas residencias.

c) En el caso de agua extraída para usos industriales, la cantidad de agua extraída se calculará aplicando el volumen de agua previsto en la Orden de 24 de septiembre de 1992, por la que se aprueban las instrucciones y recomendaciones técnicas complementarias para la elaboración de los planes hidrológicos de cuencas intercomunitarias, o por la orden Ministerial que la sustituya.

3. En lo que se refiere al coste del recurso de los usos, será el que se derive de los análisis económicos del uso del agua que deben elaborar los organismos de cuenca en virtud de lo establecido en el párrafo segundo del artículo 41.5 de la Ley de Aguas, así como de los estudios sobre estos mismos aspectos que con posterioridad se incorporen a los correspondientes planes hidrológicos de cuenca, en aplicación de lo previsto en la Directiva 2000/60/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

Hasta que se incorporen al correspondiente plan hidrológico de cuenca los análisis y estudios señalados en el párrafo anterior, el coste del recurso se determinará mediante la aplicación de los criterios de valoración derivados del régimen económico financiero del uso del agua de la correspondiente cuenca, que podrán ser completados, o suplidos en su defecto, con otros criterios derivados de normas sectoriales o de razones de rentabilidad y de mercado.

4. Los organismos de cuenca determinarán los importes del metro cúbico de agua y los volúmenes o dotaciones de agua extraída que en cada caso resultarán como consecuencia de la aplicación de los criterios señalados en los apartados anteriores.

Artículo 5. Daños por extracción de áridos y aprovechamiento de materiales sin autorización.

1. El importe de los daños al dominio público hidráulico será el resultado de aplicar la expresión del artículo 3, en la que el valor económico del dominio público hidráulico afectado se obtendrá multiplicando los volúmenes de áridos o materiales extraídos o aprovechados, por el coste unitario de los mismos.

2. El coste de los áridos o materiales extraídos o aprovechados se determinará por el organismo de cuenca, teniendo en cuenta precios de mercado, si bien su importe no podrá ser inferior al que resultaría de aplicar, en el momento de la constatación de los hechos, el canon de utilización de los bienes de dominio público hidráulico (por aprovechamiento de los bienes de dominio público hidráulico), de acuerdo con lo establecido en el artículo 112.4.c) de la Ley de Aguas.

Artículo 6. Daños por obras, destrozos, sustracciones, actuaciones u ocupaciones no autorizadas, incluyendo el depósito de escombros y la instalación de estructuras móviles.

1. El importe de los daños al dominio público hidráulico será el resultado de aplicar la expresión del artículo 3, en la que el valor económico del dominio público hidráulico afectado será el equivalente a los costes de demolición o desmontaje de las obras o instalaciones y los de retirada de los escombros u otros productos indebidamente depositados, calculados a precios de mercado e incrementados con los costes de transporte de los mate-

riales retirados hasta instalaciones que resulten adecuadas en virtud de lo establecido en la legislación sectorial que resulte de aplicación.

En el supuesto de ocupaciones no autorizadas del dominio público hidráulico, el importe de los daños, excluidos los costes de restauración ambiental, no podrá ser inferior al que resultaría de aplicar, en el momento de la constatación de los hechos, el canon de utilización de los bienes de dominio público hidráulico (por ocupación de terrenos del dominio público hidráulico o por utilización del dominio público hidráulico), de acuerdo con lo establecido en el artículo 112.4.a) y b) de la Ley de Aguas.

En el supuesto de destrozos y sustracciones el valor económico del dominio público hidráulico se obtendrá como el coste de reposición de los elementos afectados.

2. Los organismos de cuenca determinarán las diferentes unidades de cómputo que se tomarán en consideración para determinar los diferentes costes (metro lineal o metro cúbico demolido y metro cúbico de material retirado, transportado y, en su caso, depositado en instalaciones de gestión final), así como su importe unitario.

Artículo 7. Daños por corta de arbolado.

1. El importe de los daños al dominio público hidráulico será el resultado de aplicar la expresión del artículo 3, en la que el valor económico del dominio público hidráulico afectado se obtendrá será el resultado de multiplicar la cantidad de árboles indebidamente talados por el valor de los mismos.

Tal importe, excluidos los costes de restauración ambiental, no podrá ser inferior al que resultaría de aplicar, en el momento de la constatación de los hechos, el canon de utilización de los bienes de dominio público hidráulico (por aprovechamiento de los bienes de dominio público hidráulico), de acuerdo con lo establecido en el artículo 112.4.c) de la Ley de Aguas.

2. En cada árbol, la cantidad de madera indebidamente talada se determinará de forma directa mediante el cálculo del volumen exacto del árbol cuando fuera posible su determinación. Cuando ello no fuera posible, el cálculo se hará de forma indirecta y tomando en consideración el rendimiento medio del árbol de que se trate.

3. El valor de cada árbol se determinará añadiendo al coste de la madera, el correspondiente, en su caso, a otros productos distintos. A los anteriores efectos, el coste de la madera talada se determinará de acuerdo con precios de mercado y en función de la especie de que se trate. En el caso de que determinados árboles tengan un valor especial se aplicarán sistemas de valoración que incluyan esas características.

4. Los organismos de cuenca determinarán los importes del metro cúbico de madera y de las diferentes unidades de cómputo que se tomen en consideración, así como, en su caso, el coste de otros productos distintos a la madera.

Artículo 8. Daños por aprovechamientos no autorizados de pastos o por arado, siembra y plantaciones no autorizadas.

1. El importe de los daños al dominio público hidráulico será el resultado de aplicar la expresión del artículo 3, en la que el valor económico del dominio público hidráulico afectado será el equivalente a los costes correspondientes al valor medio de aprovechamiento, multiplicado por el número de hectáreas indebidamente aprovechadas.

Cuando se trate de las plantaciones, siembras y labores de arado no autorizadas, para la determinación del valor económico del dominio público afectado se tendrán en cuenta, según sea el caso, los costes de eliminación del arbolado o la vegetación de que se componga la siembra o plantación en cuestión, el coste de la retirada de la materia vegetal extraída y su transporte hasta instalaciones que resulten adecuadas.

En todo caso, el importe de los daños señalados en este apartado, excluidos los costes de restauración ambiental, no podrá ser inferior al que resultaría de aplicar, en el momento de la constatación de los hechos, el canon de utilización de los bienes de dominio público hidráulico (por ocupación de terrenos del dominio público hidráulico o, en el caso de aprovechamientos no autorizados de pastos, por aprovechamiento de bienes del dominio público hidráulico), de acuerdo con lo establecido en el artículo 112.4.a) y c) de la Ley de Aguas, respectivamente.

2. Los organismos de cuenca determinarán los importes del precio medio de aprovechamiento de pastos por hectárea, según el terreno concreto de que se trate, así como el coste medio de las unidades que se tomen en consideración para calcular el valor de reposición de las zonas afectadas, a efectos de lo establecido en el apartado anterior.

CAPÍTULO III

Daños producidos en la calidad del agua

SECCIÓN 1.^a CRITERIOS TÉCNICOS PARA LA VALORACIÓN DE DAÑOS EN LA CALIDAD DEL AGUA

Artículo 9. Concepto y normas de aplicación.

1. La valoración del daño a la calidad del agua a los efectos de determinar la cuantía de las sanciones e indemnizaciones derivadas de las infracciones relacionadas con los vertidos se llevará a cabo, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 326.2 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, a través de la fórmula de estimación objetiva que se establece en los artículos 10 al 17, para vertidos de aguas residuales y en el Artículo 18, para vertidos de residuos de naturaleza líquida o de lodos.

2. El sistema objetivo de valoración de daños será válido para cualquier vertido en cualquier cauce y en cualquier momento. No obstante, se podrá prescindir de aplicar el sistema de valoración objetiva de daños en los siguientes casos:

a) Supuestos especiales en que las circunstancias exijan una valoración individualizada, previo acuerdo razonado del organismo de cuenca competente.

b) Cuando se considere la comisión de una infracción de carácter leve sin que se aprecien daños al dominio público.

Artículo 10. Fórmula de estimación objetiva de daños en la calidad del agua por vertidos de aguas residuales.

Los daños en la calidad del agua por vertidos de aguas residuales se valorarán atendiendo al coste del tratamiento del vertido, a su peligrosidad y a la sensibilidad del medio receptor, con arreglo a la siguiente fórmula de estimación objetiva:

Valoración de daños:

$$\text{Valor (€)} = \alpha \times V \times K_{PV} \times K_S \times K_{RV} = 0,12[\text{€}/\text{m}^3] \times Q[\text{m}^3/\text{d}] \times t[\text{d}] \times K_{PV} \times K_S \times K_{RV}$$

en la que:

α = Coste de referencia de tratamiento del vertido en euros por metro cúbico (€/m³), se establece como 0,12 €/m³.

V = Volumen de vertido en metros cúbicos (m³).

Q = Caudal de vertido en metros cúbicos por día (m³/d).

t = Duración del vertido en días (d).

K_{PV} = Coeficiente adimensional relativo a la peligrosidad del vertido.

K_S = Coeficiente adimensional relativo a la sensibilidad del medio.

K_{RV} = Coeficiente adimensional relativo a la reversibilidad del impacto.

Artículo 11. Determinación del caudal de vertido.

La determinación del caudal de vertido, a los efectos de la aplicación de la fórmula indicada en el artículo 10, se llevará a cabo conforme a los siguientes criterios:

a) Se presumirá, salvo prueba en contrario, que entre dos tomas de muestra de una actividad productiva constante, el caudal de vertido es también constante.

b) Se utilizará el valor del caudal medido en el momento de la toma de muestra. En caso de disponer de valores en continuo de caudal a lo largo de un día, se utilizará el valor medio de estos valores.

c) En el caso de no ser posible la medición del caudal se realizarán estimaciones indirectas, a partir de datos de consumo de agua, número de trabajadores, tipo de producción o cualesquiera otros debidamente justificados, incluidos los títulos administrativos de aprovechamiento de agua y autorización de vertido.

d) En el caso de vertidos de aguas residuales urbanas sin caudal medido o prefijado, el caudal de vertido se podrá determinar a partir de las dotaciones de vertido en litros por habitante y día, según la población abastecida y el nivel de actividad comercial de la tabla que figura en el Anexo II.

Artículo 12. Determinación de la duración del vertido.

La determinación del tiempo de vertido, a los efectos de la aplicación de la fórmula indicada en el artículo 10, se llevará a cabo conforme a los siguientes criterios:

a) El caudal de vertido medido o estimado en un determinado momento se considerará estable durante las 24 horas del día siempre que no se deduzca, justificadamente, otro valor a partir de los datos que obren en poder del organismo de cuenca correspondiente.

b) Permaneciendo las demás circunstancias constantes, se presumirá, salvo prueba en contrario, que entre dos tomas de muestra el vertido ha tenido lugar durante todo el período.

c) En el caso de vertidos ocasionales de aguas residuales, se presumirá salvo prueba en contrario que el tiempo de vertido es, como mínimo, de un día.

Artículo 13. Determinación de la peligrosidad del vertido (K_{PV}).

La determinación de la peligrosidad del vertido a través del coeficiente K_{PV} , a los efectos de la aplicación de la fórmula indicada en el artículo 10, se llevará a cabo conforme a los siguientes criterios:

a) El coeficiente K_{PV} se calculará para cada una de las muestras conforme a las siguientes fórmulas, en función de los grupos de parámetros indicados en el artículo 15 y del coeficiente de referencia U:

Parámetros del grupo A:

Para $1 < U < 100$. $K_{PV} = 0,7 U + 0,2$.

Para $U \geq 100$. $K_{PV} = 70,2$.

Parámetros del grupo B:

Para $1 < U < 100$. $K_{PV} = 0,5 U + 0,4$.

Para $U \geq 100$. $K_{PV} = 50,4$.

Parámetros del grupo C:

Para $1 < U < 100$. $K_{PV} = 0,13 U + 0,8$.

Para $U \geq 100$. $K_{PV} = 13,8$.

Parámetros grupos A, B y C:

Para $U \leq 1$. $K_{PV} = 0$.

b) En el caso de disponerse de dos muestras, el valor de K_{PV} que se utilizará en la valoración de los daños, será el correspondiente a la media aritmética del K_{PV} de cada una de las muestras.

c) En caso de disponerse de más de dos muestras, se realizará la media del K_{PV} de cada dos muestras consecutivas, la cual se considerará como K_{PV} de cada intervalo de tiempo transcurrido entre las dos tomas de muestra. Se tomará como K_{PV} de cálculo, la media ponderada por el tiempo del K_{PV} de cada intervalo.

d) En el caso de analizarse varios parámetros, se calculará K_{PV} para cada uno de ellos y se tomará, a efectos de la valoración, aquél que resulte con el valor más alto.

Artículo 14. Determinación del coeficiente de referencia (U).

El valor del coeficiente U para cada muestra, a los efectos de la aplicación de las fórmulas indicadas en el artículo anterior, se determinará de la siguiente forma:

a) El coeficiente U es igual al cociente entre el valor medido de un determinado parámetro en la muestra del vertido y el valor de referencia de dicho parámetro:

$$U = \frac{V_m}{V_r}$$

siendo:

V_m : Valor medido, es decir, el resultado analítico obtenido en la muestra del vertido.

V_r : Valor de referencia, es decir, el valor límite de emisión que figura en la autorización de vertido. Si se carece de autorización, o no está definido un valor límite de emisión para ese parámetro en dicha autorización, se aplicarán los valores que se indican en el Anexo 3.

b) Para los parámetros pH y temperatura, el valor del coeficiente U se obtendrá a partir de la siguiente expresión:

$$U = \frac{V_r + V_m}{V_r}$$

c) Cuando el valor de referencia esté establecido como un intervalo de valores, se tomará como V_r , el valor del intervalo del que se deduzca un U menor.

d) Para el caso de parámetros microbiológicos, el valor de U se obtendrá de la expresión:

$$U = \log V_m - V_r$$

Artículo 15. Parámetros de contaminación.

Los parámetros de contaminación se dividen en tres grupos tal como se recogen en el Anexo III, en función del grado de peligrosidad de los mismos.

a) El Grupo A incluye las sustancias peligrosas que figuran en el Anexo IV del Reglamento del Dominio Público Hidráulico.

b) El Grupo B incluye contaminantes de menor peligrosidad que las anteriores. También se incluye en este grupo B un parámetro relativo a la toxicidad del vertido sobre organismos acuáticos. Para la consideración de este parámetro, se seguirán los criterios que se establecen en el Anexo IV.

c) El Grupo C incluye otros contaminantes menos peligrosos que los que figuran en los Grupos anteriores.

Artículo 16. Determinación de la sensibilidad del medio receptor (K_s).

El valor del coeficiente relacionado con la sensibilidad del medio receptor deberá estar relacionado con los obje-

tivos medioambientales del medio receptor, en virtud de los estudios sobre estos aspectos que realicen los organismos de cuenca y que se incorporen a los correspondientes planes hidrológicos de cuenca, en aplicación de lo previsto en el RD Legislativo 1/2001, de 20 de julio.

Hasta que se incorporen al correspondiente plan hidrológico de cuenca los análisis señalados en el párrafo anterior, el valor del coeficiente relacionado con la sensibilidad del medio receptor K_s derivará de la clasificación prevista en la planificación hidrológica para el medio receptor afectado, de acuerdo con los valores que figuran en la tabla 4 del Anexo I. En caso de que el medio receptor tenga varias clasificaciones asignadas, se utilizará el K_s más alto.

Artículo 17. Determinación del coeficiente de reversibilidad del impacto.

El valor del coeficiente relacionado con la reversibilidad del impacto será el expuesto en la Tabla 3 del Anexo I.

Artículo 18. Fórmula de estimación objetiva de daños en la calidad del agua por vertidos de residuos en estado líquido o en forma de lodos.

Los daños producidos en la calidad del agua por el vertido de residuos en estado líquido o en forma de lodos que no sean susceptibles de autorización de acuerdo con la legislación de aguas, así como los producidos por descargas o derrames de tipo puntual y no continuado y de naturaleza altamente contaminante, se valorarán atendiendo al coste del tratamiento del vertido, a su peligrosidad y a la sensibilidad del medio receptor con arreglo a la siguiente fórmula de estimación objetiva:

Valor (€) = $450 + \beta \times M \times K_{RV} \times K_s = 450[\text{€}] + \beta[\text{€/t}] \times M[\text{t}] \times K_{RV} \times K_s$
en la que:

450 = Valoración mínima en euros (€).

β = Coste de referencia de tratamiento del vertido en euros por tonelada (€/t) que se calcula según lo establecido en el Anexo 5.

M = Masa del residuo vertido en toneladas (t).

K_{RV} = Coeficiente adimensional relativo a la reversibilidad del impacto fijado en la tabla 3 del Anexo 1.

K_s = Coeficiente adimensional relativo a la sensibilidad del medio receptor, fijado en la tabla 4 del Anexo 1.

SECCIÓN 2.ª NORMAS SOBRE TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DE VERTIDOS DE AGUAS RESIDUALES

Artículo 19. Actuaciones previas.

1. Ante la evidencia, denuncia interna o externa o por cualquier otro medio por el que se tenga conocimiento de un vertido al dominio público hidráulico que pudiera ser constitutivo de infracción administrativa, por parte del personal competente de los organismos de cuenca se procederá, de oficio y sin necesidad de acuerdo formal al efecto, a la identificación de su titular, y siempre que sea posible, a la toma de muestras del vertido.

2. No será necesaria la toma de muestras del vertido cuando, por el conocimiento de su origen y la observación de sus características externas, pueda razonadamente determinarse su composición o naturaleza contaminante.

Artículo 20. Toma de muestras de vertidos.

1. Las operaciones de toma de muestras del vertido se documentarán en un Acta de Constancia y Toma de Muestras de vertidos que contendrá, al menos, la infor-

mación que figura en el Anexo VI. Constará de tres ejemplares, en formato idéntico destinándose el primero al organismo de cuenca, el segundo al laboratorio responsable del análisis de la muestra Oficial y el tercero para el representante del titular del vertido. Cada muestra deberá acompañarse de la cadena de custodia correspondiente que contenga, al menos, la información que figura en el Anexo VII.

2. Con carácter general, la toma de muestras tendrá lugar en presencia de un representante del titular del vertido o de la persona en quien delegue a estos efectos, quien podrá acompañar al representante de la Administración en todas las operaciones y a quien se facilitará la oportunidad de manifestar en el Acta cuanto a su derecho convenga. En otro caso, se dejará constancia en el Acta de los motivos por los que ello no fuera posible.

3. Se tomará la muestra del vertido al dominio público hidráulico. Además, podrá realizarse la toma de muestra en cualquier otro punto que se considere conveniente para determinar adecuadamente la naturaleza y el alcance del vertido. En el supuesto de reutilización de aguas la toma se hará, en todo caso, en el punto de entrega de las aguas depuradas o en el punto de entrega de las aguas regeneradas.

4. La muestra se tomará por duplicado (Oficial y Contradicторia) y se precintarán e identificarán convenientemente en presencia del representante del titular del vertido.

5. La muestra Oficial quedará en poder del organismo de cuenca, al objeto de ser analizada en su Laboratorio o en el de una Entidad colaboradora de la Administración hidráulica homologadas a tal efecto en virtud de la Orden MAM/985/2006, de 23 de marzo, por la que se desarrolla el régimen jurídico de las entidades colaboradoras de la administración hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico.

6. La muestra Contradicторia se entregará al interesado o, en su defecto, quedará a su disposición, durante los dos días hábiles siguientes a la fecha de la toma de muestras, en la sede del laboratorio del organismo de cuenca o en el que éste designe, para su posible análisis contradictorio en el laboratorio que el interesado elija. El laboratorio que analice la muestra Contradicторia deberá estar acreditado por una entidad de acreditación que garantice el cumplimiento de los requisitos establecidos en la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025, o la que en el futuro

la sustituya. El alcance de la acreditación del laboratorio elegido para analizar la muestra Contradicторia deberá incluir los contaminantes que se van a analizar.

7. El interesado será responsable de la correcta conservación de la muestra Contradicторia y de la garantía e inviolabilidad de la cadena de custodia, desde su recogida hasta su entrega en el laboratorio por él elegido. A estos efectos, el laboratorio que reciba la muestra deberá suscribir un documento, que será entregado por el interesado al organismo de cuenca en el que se hará constar, al menos, la siguiente información:

a) Identificación del laboratorio y de su representante legal, con indicación expresa del cumplimiento de los requisitos señalados en el apartado 6.

b) Identificación de la empresa que hizo entrega de la muestra.

c) Datos identificativos de la muestra e información acreditativa de la garantía e inviolabilidad de la cadena de custodia, desde la recogida de la muestra por el interesado hasta su recepción por el laboratorio.

Disposición adicional única. *Utilización de Actas.*

A partir de la entrada en vigor de la presente orden, los modelos oficiales de actas regulados en la misma serán utilizados por parte de los Agentes del Servicio de Protección a la Naturaleza de la Guardia Civil en virtud de lo establecido en la Orden Comunicada de los Ministros de Interior y Medio Ambiente de 21 de octubre de 1997 y por las Entidades colaboradoras de la Administración hidráulica reguladas en la Orden MAM/985/2006, de 23 de marzo.

Disposición final primera. *Título competencial.*

Esta orden se dicta de conformidad con lo establecido en el artículo 149.1.22.^a de la Constitución Española.

Disposición final segunda. *Entrada en vigor.*

La presente orden entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el Boletín Oficial del Estado y se aplicará a los procedimientos sancionadores incoados con posterioridad a dicha fecha.

Madrid, 16 de enero de 2008.—La Ministra de Medio Ambiente, Cristina Narbona Ruiz.

ANEXO I**Valores de los parámetros por defecto de la valoración de daños**Tabla 1: Coeficiente de circunstancias especiales (K_x) para extracciones ilegales de agua

Tipo de extracción	Estado cuantitativo	K_x
Aguas superficiales	Caudal extraído ilegalmente menor del 50% del caudal medio estimado circulante por el cauce durante el periodo de la infracción. El caudal aguas abajo de la extracción no es inferior que el caudal ecológico.	1,0
	Caudal extraído ilegalmente superior al 50% del caudal medio estimado circulante por el cauce durante el periodo de la infracción. El caudal aguas abajo de la extracción no es inferior que el caudal ecológico.	1,2
	Caudales circulantes inmediatamente aguas abajo de la extracción menores al caudal ecológico	2,0
Aguas subterráneas	Sin efectos notables en el medio y/o en los niveles de otros pozos del mismo acuífero	1,0
	Acuíferos declarados sobreexpLOTados y masas de agua subterránea en riesgo de no cumplir los objetivos medioambientales.	2,0
Ambos tipos	Situación declarada de sequía.	2,0

Tabla 2: Coeficiente de circunstancias especiales (K_x) para el resto de infracciones

Comunidad vegetal afectada	K_x
Abedulares	2,0
Adelfares	1,6
Alamedas	1,8
Alisedas	2,0
Alocares	1,6
Avellanadas	2,0
Choperas	1,4
Fresnedas	1,8
Hayedos, robledales, melojares y encinares	1,8
Loreras	2,0
Mimbreras	1,6
Olmedas	1,8

Comunidad vegetal afectada	K_x
Saucedas	1,6
Tarayales	1,8
Resto de ecosistemas	1,2
La infracción no ha dañado a la comunidad vegetal	1,0

Tabla 3 : Valores del coeficiente de reversibilidad (K_{RV})

Tiempo de reversibilidad	K_{RV}
0 - 1 año	1,0
1 - 5 años	1,4
> 5 años	1,8
Irreversible	2,0

Tabla 4: Valores del coeficiente de sensibilidad del medio receptor (K_s)

Clasificación del medio receptor ¹	Valor de K_s	
	Infracciones capítulo II	Infracciones capítulo III
Reservas naturales fluviales	2,0	3,0
Zonas declaradas de protección especial		
Zonas sensibles ²		
Aguas destinadas a la producción de agua potable		
Perímetros de protección ³		
Aguas subterráneas		
Aguas aptas para la vida de los salmonidos	1,5	2
Zonas aptas para el baño		1,8
Zonas aptas para la vida de los ciprínidos		1,2
Zonas aptas para la cría de moluscos	1,3	
Sin clasificación		1,0

1. Estas definiciones se refieren a los conceptos regulados en el Real Decreto 927/1988 y en su aplicación se tendrán en cuenta los objetivos que, para cada horizonte temporal, los planes hidrológicos de cuenca hayan establecido para cada medio receptor. La aplicación de los coeficientes se extiende a las zonas de influencia que contengan los planes hidrológicos siempre que estén efectivamente delimitadas (BOE de 28 de julio de 2006).

2. Zonas sensibles declaradas oficialmente en la Resolución de 10 de julio de 2006, de la Secretaría General para el Territorio y la Biodiversidad (BOE de 28 de julio de 2006).

3. Perímetros contemplados en el artículo 56.3 del texto refundido de la Ley de Aguas.

ANEXO II**Dotaciones de vertido en litros por habitante y día, según la población abastecida y el nivel de actividad comercial**

Población abastecida (habitantes)	Actividad Comercial Alta	Actividad Comercial Media	Actividad Comercial Baja
< 10.000	220 L/hab·d	190 L/hab·d	170 L/hab·d
10.000 - 50.000	240 L/hab·d	220 L/hab·d	190 L/hab·d
50.000 - 250.000	280 L/hab·d	250 L/hab·d	220 L/hab·d
> 250.000	3/30 L/hab·d	300 L/hab·d	260 L/hab·d

ANEXO III**Valores de referencia de los parámetros de contaminación**

Si un vertido no dispone de autorización o si un contaminante carece del valor límite de emisión en la autorización de vertido el vertido está prohibido y su valor límite de emisión es cero (a. 245.2 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico). En consecuencia el valor de referencia debería ser cero ($V_r = 0$) y el cálculo del coeficiente U resultaría indeterminado ($U = V_m / V_r$).

Como paliativo en este caso, y sólo a los efectos del cálculo de V_r , el límite de emisión del parámetro se asimilará al valor de la norma de calidad ambiental u objetivo de calidad que el respectivo plan hidrológico de cuenca haya establecido para su respeto en el correspondiente medio receptor.

En ausencia de dicho valor para el parámetro, se aplicará el límite de referencia de las tablas adjuntas, que corresponden a estimaciones generales de normas de calidad ambiental y objetivos de calidad.

Grupo A: sustancias peligrosas

Grupo A	CAS	V _r (mg/l)	I ⁴	II Pre ⁵	II Pri ⁶
1,1,1-Tricloroetano	71-55-6	0,1		x	
1,2 dicloroetano	107-06-2	0,01	x		x
Alacloro	15972-60-8	0,0003			x
Aldrín	309-00-2	0,00001	x		
Antraceno	120-12-7	0,0001			x
Arsénico	7440-38-2	0,05		x	
Atrazina	1912-24-9	0,001		x	x
Benceno	71-43-2	0,03		x	x
Benzo(a)pireno	50-32-8	0,00005			x
Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	0,00003			x
Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	0,000002			x
Benzo(k)fluoroanteno	207-08-9	0,00003			x
C ₁₀₋₁₃ -cloroalcanos	85535-84-8	0,0004			x
Cadmio	7440-43-9	0,005	x		x

4 Lista I: Sustancias contenidas en la Orden de 12 de noviembre de 1988.

5 Lista II preferente: sustancias contenidas en el RD 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijan objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes y se modifica el Reglamento de Dominio Público Hidráulico.

6 Lista II prioritaria: sustancias contenidas en la Decisión N° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de noviembre de 2001 por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.

Grupo A	CAS	Vr (mg/l)	I ⁴	II Pre ⁵	II Pri ⁶
Cianuros totales	74-90-8	0,04		x	
Clorobenceno	108-90-7	0,02		x	
Clorofenvinfos	470-90-6	0,0001			x
Cloropirifos	2921-88-2	0,00003			x
Cobre	7440-50-8	0,005		x	
Cromo	7440-47-3	0,05		x	
Di(2-etilhexil)ftalato	117-81-7	0,0013			x
Diclorobenceno ⁷	25321-22-6	0,02		x	
DDT y metabolitos ⁸	No aplicable	0,000025	x		
Diclorometano	75-09-2	0,02			x
Dieldrín	60-57-1	0,00001	x		
Pentabromodifenil éter	32534-81-9	0,0000005			x
Diurón	330-54-1	0,0002			x
Endosulfán	115-29-7	0,000005			x
Endrín	72-20-8	0,000005	x		
Etilbenceno	100-41-4	0,03		x	
Fluoranteno	206-44-0	0,0001			x
Fluoruros	16984-48-8	1,7		x	
Hexaclorobenceno	118-74-1	0,00003	x		x
Hexaclorobutadieno	87-68-3	0,0001	x		x
Hexaclorociclohexano	608-73-1	0,0001	x		x
Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5	0,000002			x
Isodrín	465-73-6	0,000005	x		
Isoproturón	34123-59-6	0,0003			x
Lindano	58-89-9	0,0001			x
Mercurio	7439-97-6	0,001	x		x
Metolacloro	51218-45-2	0,001		x	
Naftaleno	91-20-3	0,005		x	x
Níquel	7440-02-0	0,05		x	x
Nonilfenoles	25154-52-3	0,0003			x
Octilfenoles	1806-26-4	0,0001			x
Pentaclorobenceno	608-93-5	0,000007			x
Pentaclorofenol	87-86-5	0,002	x		x
Percloroetileno	127-18-4	0,01	x		
Plomo	7439-92-1	0,05		x	x
Selenio	7782-49-2	0,001		x	
Simazina	122-34-9	0,001		x	x
Terbutilazina	5915-41-3	0,001		x	
Tetracloruro de Carbono	56-23-5	0,012	x		
Tolueno	108-88-3	0,05		x	
Tributilestaño	36643-28-4	0,00002			x
Triclorobencenos	12002-48-1	0,0004	x		x

7. Suma de los isómeros orto, meta y para diclorobenceno.

8. Suma de los isómeros p,p'-DDT + o,p'-DDT + p,p'-DDE + p,p'-DDD.

Grupo A	CAS	Vr (mg/l)	I4	II Pre 5	II Pri 6
Tricloroetileno	79-01-6	0,01	x		
Cloroformo	67-66-3	0,012			x
Trifluralina	1582-09-8	0,00003			x
Xileno ⁹	1330-20-7	0,03		x	
Zinc total	7440-66-6	0,03		x	

9 Suma de los isómeros orto-, meta- y para-xileno.

Grupo B: contaminantes

Grupo B	CAS	Vr (mg/l)
Amonio total	14798-03-9	1
Bario	7440-39-3	1
Berilio	7440-41-7	1
Boro	7440-42-8	1
Cloro total	7782-50-5	0,005
Cobalto	7440-48-4	1
Índice de fenoles	no aplicable	0,1
Fósforo total	14265-44-2	0,4
Fosfatos	14265-44-2	0,7
Hidrocarburos método IR	no aplicable	1
Hierro	7439-89-6	2
Manganoso	7439-96-5	1
Magnesio	7439-95-4	1
Nitratos	14797-55-8	50
Nitritos	14797-65-0	0,03
Nitrógeno Kjeldahl	no aplicable	3
Nitrógeno total	no aplicable	3
Tensoactivos aniónicos	no aplicable	0,5
Toxicidad en UT	no aplicable	1
Vanadio	7440-62-2	1
Biocidas y productos fitosanitarios	no aplicable	0,001
Contaminantes del Anexo II del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, no definidos ni en el grupo A ni C	no aplicable	

Grupo C: otros contaminantes

Grupo C	unidades	Vr
Incremento de temperatura del agua	°C	T del medio 3°C
Ph	Unidades de pH	5,5-9
Conductividad eléctrica a 20°C	µS/cm	1000
Cloruros	mg/L	200
Sulfatos	mg/L	250
Color	mg Pt /L	200
Sólidos en suspensión	mg/L	25

Grupo C	unidades	Vr
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅ a 20°C) sin nitrificación.	mg/L	7
Demanda química de oxígeno	mg/L	30
Coliformes fecales	UFC/100 ml	20000
Coliformes totales 37 °C	UFC/100 ml	50000
Enterovirus	PFU/10 ml	0
Estreptococos fecales	UFC/100 ml	10000
Salmonelas	En 1L	Ausencia
Otros parámetros microbiológicos		

ANEXO IV

Determinación de la toxicidad

A) La Toxicidad de una muestra se mide mediante los ensayos de toxicidad aguda sobre peces, daphnia y algas realizados conforme a las siguientes normas:

Test de toxicidad aguda en peces. Ensayo CEE C.1., OCDE 203
 Test de inmovilidad de Daphnia magna. Ensayo CEE C.2., OCDE 202
 Test de inhibición del crecimiento de algas. Ensayo CEE C.3., OCDE 201

B) La Toxicidad se expresa en unidades de toxicidad (UT) y se calcula de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Toxicidad (UT)} = 100 / \text{CL(E)50}$$

Siendo CL(E)50 la concentración letal/efectiva media que corresponde a la proporción de vertido que origina la mortalidad o inhibición de la movilidad del 50% de los individuos expuestos (en el caso de peces y daphnias respectivamente) o la inhibición de un 50% en el crecimiento de las algas.

C) En cada muestra deben realizarse los tres ensayos de toxicidad indicados en el párrafo A).

D) El valor Vm de la muestra es el mayor valor de Toxicidad obtenida, expresada en UT, de los 3 ensayos realizados.

El valor de Vr para vertidos autorizados, corresponderá a la Toxicidad calculada para una muestra preconstituida, en la que se incluyan el conjunto de contaminantes recogidos en la autorización de vertido, a las máximas concentraciones autorizadas.

El valor de Vr para los vertidos no autorizados se recoge en la tabla del Anexo 3.

ANEXO V

Coste de referencia (β) expresado en euros por tonelada (€/t) según el tipo de residuo en estado líquido o lodo vertido

Si un residuo puede catalogarse en varios tipos, se tomará el coste de referencia (β) más elevado.

Tipo de residuo	(€/t)
Residuos clasificados como peligrosos en estado líquido	
Lixiviados de vertederos de residuos peligrosos	1000
Lodos clasificados como peligrosos	

Tipo de residuo	(€/t)
Residuos no peligrosos en estado líquido que contienen sustancias del Grupo A o B enumeradas en el Anexo 3 de esta Orden	400
Lixiviados de vertederos de residuos urbanos	
Lodos no peligrosos con sustancias del Grupo A o B enumeradas en el Anexo 3 de esta Orden	
Purines o estiércol líquido procedente del ganado	
Residuos líquidos de la industria alimentaria como alpechines de almazaras, etc.	
Otros residuos líquidos con alto contenido en materia orgánica	150
Lixiviados de vertederos de materiales inertes	
Lodos residuales de estaciones de depuración que traten aguas residuales domésticas, urbanas o de composición similar	
Otros residuos líquidos no catalogados en ninguno de los tipos anteriores	Valor más aproximado según la composición del residuo

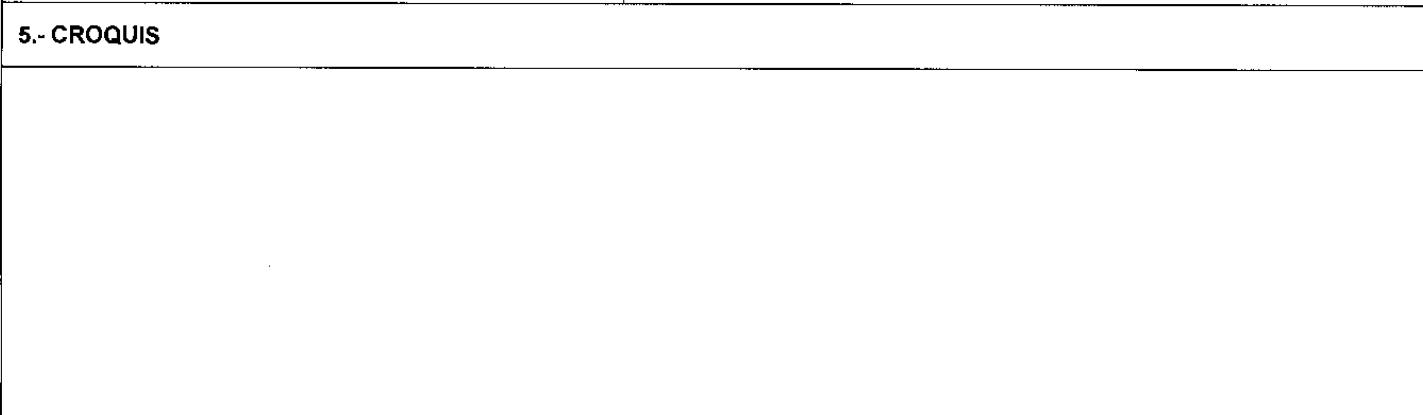
ANEXO VI

Acta de constancia y toma de muestras de vertidos de aguas residuales

ACTA N°	FECHA:	HOJA DE.....HOJAS
---------	--------	------------------------

La aplicación efectiva del Real Decreto 849/1986 de 11 de Abril, establece que los organismos de Cuenca podrán realizar cuantas inspecciones y análisis estimen convenientes para la comprobación de las características del vertido y el rendimiento de las instalaciones de depuración y evacuación.

Visitadas las instalaciones y realizadas las actuaciones pertinentes, resulta:

1.- TOMADOR DE MUESTRAS		
Nombre:		DNI:
Cargo:		
ORGANISMO AL QUE PERTENECE	<input type="checkbox"/> organismo de cuenca:	<input type="checkbox"/> Entidad colaboradora: N° de Registro:.....
2.- EMPLAZAMIENTO		
Nombre:		CIF:
Dirección:		Tfno.:
Municipio:		C.P.: Provincia:
3.- PERSONA ASISTENTE A LA INSPECCIÓN		
Nombre:		DNI:
<input type="checkbox"/> Titular	<input type="checkbox"/> Representante	Cargo que desempeña:
4.- VERTIDO AL DOMINIO PÚBLICO HIDRÁULICO		
Procedencia:		<input type="checkbox"/> Aglomeración urbana <input type="checkbox"/> Vertido industrial
¿Tiene sistema de tratamiento?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> Funciona <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No funciona	Tipo:
¿Existe caudalímetro?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> Funciona <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No funciona	Tipo:
Caudal diario (m ³ /d):	Caudal horario máximo (m ³ /h):	Caudal instantáneo máximo (L/s):
Medio receptor	<input type="checkbox"/> Cauce <input type="checkbox"/> Terreno	Nombre:
5.- CROQUIS		
		

ACTA N°	FECHA:	HOJA DE.....HOJAS
---------	--------	------------------------

MUESTRA N°... de.....	Código de identificación:		Hora del Muestreo:	
Identificación del punto de muestreo:		<input type="checkbox"/> Vertido a DPH <input type="checkbox"/> Punto Control <input type="checkbox"/> Otro		UTMx: UTMy: Huso:
Tipo de muestra <input type="checkbox"/> Puntual <input type="checkbox"/> Compuesta manual: horas		<input type="checkbox"/> Compuesta automática:... horas		
Parámetros in situ				
pH:	Conductividad a 20°C (μ S/cm):	Caudal instantáneo (L/s):	T agua (°C):	T ambiente(°C):
Conservación de la muestra 10		Nº DE ALÍCUOTAS:		
Nº	Tipo de recipiente11	Técnica de conservación		
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			

MUESTRA N°... de.....	Código de identificación:		Hora del Muestreo:	
Identificación del punto de muestreo:		<input type="checkbox"/> Vertido a DPH <input type="checkbox"/> Punto Control <input type="checkbox"/> Otro		UTMx: UTMy: Huso:
Tipo de muestra <input type="checkbox"/> Puntual <input type="checkbox"/> Compuesta manual: horas		<input type="checkbox"/> Compuesta automática:... horas		
Parámetros in situ				
pH:	Conductividad a 20°C (μ S/cm):	Caudal instantáneo (L/s):	T agua (°C):	T ambiente(°C):
Conservación de la muestra		Nº DE ALÍCUOTAS:		
Nº	Tipo de recipiente	Técnica de conservación		
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			

MUESTRA N°... de.....	Código de identificación:		Hora del Muestreo:	
Identificación del punto de muestreo:		<input type="checkbox"/> Vertido a DPH <input type="checkbox"/> Punto Control <input type="checkbox"/> Otro		UTMx: UTMy: Huso:
Tipo de muestra <input type="checkbox"/> Puntual <input type="checkbox"/> Compuesta manual: horas		<input type="checkbox"/> Compuesta automática:... horas		
Parámetros in situ				
pH:	Conductividad a 20°C (μ S/cm):	Caudal instantáneo (L/s):	T agua (°C):	T ambiente(°C):
Conservación de la muestra		Nº DE ALÍCUOTAS:		
Nº	Tipo de recipiente	Técnica de conservación		
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			
	P / V / VB			

10 Debe cumplirse la Norma UNE-EN ISO 5667-3:1994. Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de muestras.

11 P: Plástico, V: Vidrio, VB: Vidrio borosilicatado.

DATOS SOBRE EL LEVANTAMIENTO DEL ACTA DE CONSTANCIA Y TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra se ha realizado:

- En presencia y con conformidad representante del titular del vertido. En prueba de conformidad, el representante firma la presente Acta.
- Con conocimiento del representante del titular del vertido pero con falta de conformidad por parte del mismo.
- Sin conocimiento del representante del titular del vertido, por razones de:
 - Urgencia
 - Identificación imposible del representante
 - Otros:

Se han tomado un total de muestras, cada una por duplicado (Oficial y Contradicторia), identificadas y precintadas con el código:

- Muestra 1:.....
- Muestra 2:.....
- Muestra 3:.....

La Contradicторia se ofrece al representante del titular del vertido que:

- Acepta
- Rechaza

Se notifica en el mismo acto al interesado que, en caso de rechazo, la Contradicторia se encontrará precintada y depositada a su disposición durante los dos días hábiles siguientes de fecha de la toma de muestras en para su análisis.

OBSERVACIONES

Por parte del titular/representante:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Por parte del tomador de la muestra:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

POR EL TITULAR/REPRESENTANTE	POR EL TOMADOR DE LA MUESTRA
Fdo.:	Fdo.:

ANEXO VII

Contenido mínimo de la cadena de custodia

Código de Identificación de la muestra:				Nº de alicuotas:	
ACTIVIDAD	FECHA/HORA		ORGANIZACIÓN RESPONSABLE	NOMBRE y DNI	FIRMA
	INICIO	FINAL			
1 TOMA DE MUESTRA					
2 TRANSPORTE					
3 RECEPCIÓN LABORATORIO					
4 REALIZACIÓN ENSAYOS					
5 ALMACENAJE FINAL					

ANEXO II

PROPIEDADES Y ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS PLAGUICIDAS ESTUDIADOS

A continuación se detalla nombre, estructura, propiedades físicas y químicas, estabilidad e información tóxica (LD50, toxicidad relativa) de los plaguicidas estudiados.

■ ALACLORO

Nombre: 2-cloro-2',6'-diethyl-N-metoximetilacetanilida

Fórmula: C₁₄H₂₀ClNO₂

Masa molecular: 269,8

Forma: sólido cristalino

Color: ámbar

Olor: no disponible

Punto de fusión: 39,5 – 41,5 °C

Punto de ebullición: 355 °C

Densidad (20 °C): 1,133 g/cm³

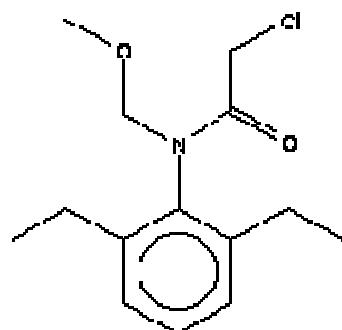
Presión de vapor (25 °C): 3·10⁻⁵ mbar

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,148

Solubilidad (g/l en °C): en disolventes comunes

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 2095 – 3160 mg/kg



■ ALDRÍN

Nombre: hexacloro-hexahidro-endo-hexo-dimetanonaftaleno

Fórmula: C₁₂H₈Cl₆

Masa molecular: 364,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 104 °C

Punto de ebullición: 145 °C

Densidad (°C): N/A

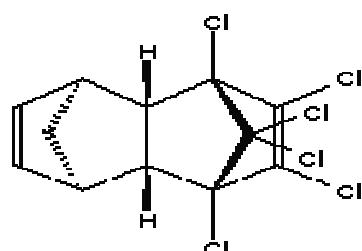
Presión de vapor (25 °C): 3,1·10⁻⁵ mbar

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): < 5·10⁻⁵

Solubilidad (g/l en 25 °C): en benzol 350

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 67 mg/kg



■ AMETRINA

Nombre: N2-etil-N4-isopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₉H₁₇N₅S

Masa molecular: 227,3

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 84 – 86 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,19 g/cm³

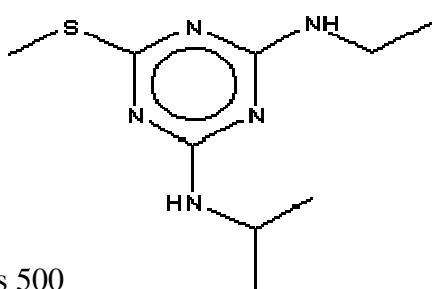
Presión de vapor (20 °C): 0,112 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 185

Solubilidad (g/l en 20 °C): en disolventes comunes 500

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 1100 mg/kg



■ ATRAZINA

Nombre: 6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₈H₁₄ClN₅

Masa molecular: 215,7

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 175 – 177 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,187 g/cm³

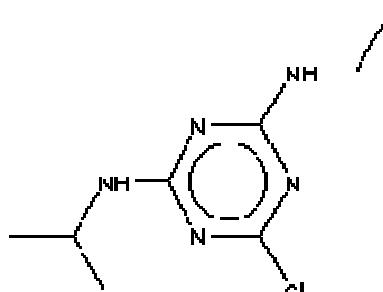
Presión de vapor (20 °C): 0,04 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,03

Solubilidad (g/l en 20 °C): en cloroformo 52

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 1869 – 3080 mg/kg.



▪ CLORPIRIFOS

Nombre: O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridilfosforotioato

Fórmula: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS

Masa molecular: 350,6

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: hedor

Punto de fusión: 42 – 43,5 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): N/A

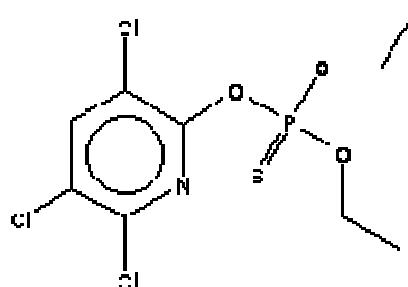
Presión de vapor (25 °C): 2,5 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 25 °C): 0,002

Solubilidad (g/l en 25 °C): en benceno 7900

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 135 – 163 mg/kg



▪ CLORFENVINFOS

Nombre: 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)vinil dietil fosfato

Fórmula: C₁₂H₁₄Cl₃O₄P

Masa molecular: 359,57

Forma: líquida

Color: color de ambar

Olor: flaco

Punto de fusión: (-19) – (-23) °C

Punto de ebullición: 110 °C

Densidad (20 °C): 1,36 g/cm³

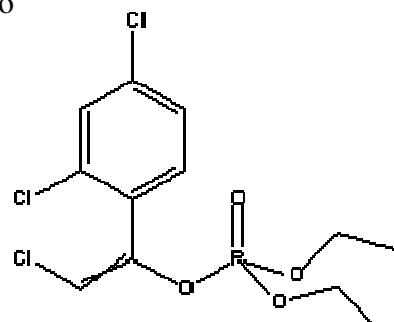
Presión de vapor (25 °C): N/A

Solubilidad en agua (g/L en 23 °C): 1,145

Solubilidad (g/L en 25 °C): N/A

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 9,7 - 39 mg/kg



■ **pp'-DDD**

Nombre: 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano

Fórmula: C₁₄H₁₀Cl₄

Masa molecular: 320,0

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 109 – 110 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

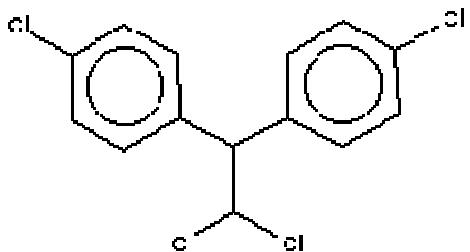
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en °C): en disolventes comunes

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: > 4000 mg/kg



■ **pp'-DDE**

Nombre: 1,1'-dicloroetenolindano)bis(4-clorobenceno)

Fórmula: C₁₄H₈Cl₄

Masa molecular: 318,0

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 88 – 90 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

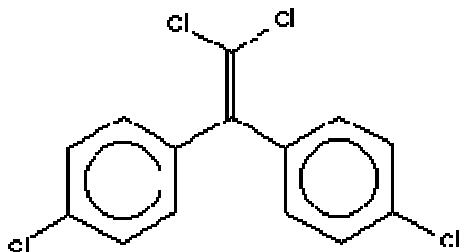
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 880 mg/kg



- op'-DDT

Nombre: 1-cloro-2-(2,2,2-tricloro-1-[(4-clorofenil)etil]benceno

Fórmula: C₁₄H₉Cl₅

Masa molecular: 354,5

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 73 – 74 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (25 °C): 0,98 g/cm³

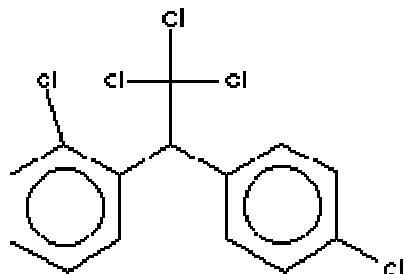
Presión de vapor (20 °C): 1,1·10⁻⁷ torr

Solubilidad en agua (g/l en 25 °C): 0,085

Solubilidad (g/l en °C): N/A

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 113 – 180 mg/kg



- pp'-DDT

Nombre: 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

Fórmula: C₁₄H₉Cl₅

Masa molecular: 354,5

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 108,5 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

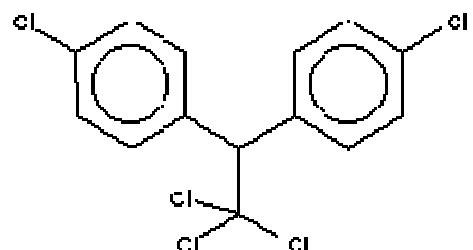
Presión de vapor (20 °C): 0,025 mPa

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 113 – 118 mg/kg



▪ DESETILATRAZINA

Nombre: 6-cloro-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₉H₁₆ClN₅

Masa molecular: 229,7

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 118 – 119 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

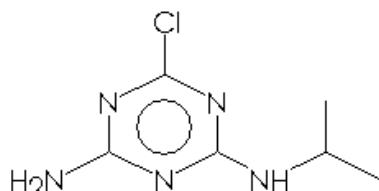
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: N/A



▪ 3,4-DICLOROANILINA

Nombre: 3,4-dicloroanilina

Fórmula: (C₆H₃)Cl₂(NH₂)

Masa molecular: 162,0

Forma: sólido cristalino

Color: gris oscuro hasta negro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 72 – 74 °C

Punto de ebullición: 272 °C

Densidad (°C): N/A

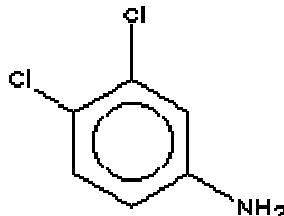
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: N/A



- **4,4'-DICLOROBENZOFENONA**

Nombre: 4,4'-diclorobenzofenona

Fórmula: C₁₃H₈Cl₂O

Masa molecular: 251,1

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: inoloro

Punto de fusión: 146 – 148 °C

Punto de ebullición: 353 °C

Densidad (°C): N/A

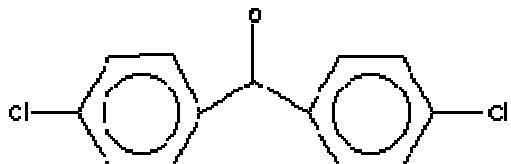
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C): N/A

Solubilidad (g/l en °C): N/A

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: N/A



- **DICOFOL**

Nombre: 2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol

Fórmula: (ClC₆H₄)₂C(OH)CCl₃

Masa molecular: 370,5

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 78,5 – 79,5 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,45 g/cm³

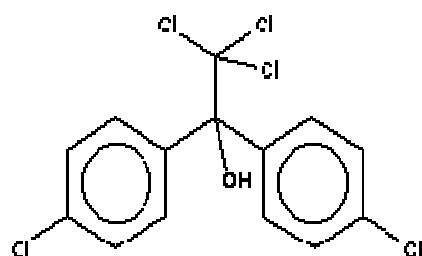
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en 25 °C): 0,0008

Solubilidad (g/l en 25 °C): en acetona 400

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 595 – 578 mg/kg



▪ DIELDRIN

Nombre: 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-endo-1,4-hexo-5,8-dimetanonaftaleno

Fórmula: C₁₂H₈Cl₆O

Masa molecular: 381,0

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: penetrante-picante

Punto de fusión: 176 °C

Punto de ebullición:

Densidad (20 °C): 1,75 g/cm³

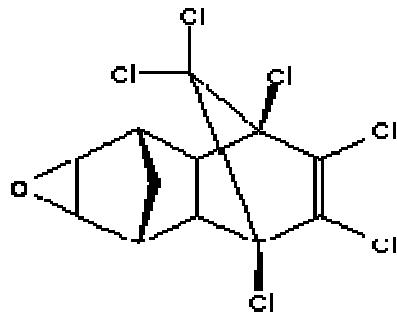
Presión de vapor (20 °C): 1·10-6 mbar

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): < 0,000

Solubilidad (g/l en 20 °C): en acetona 220

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 40 – 87 mg/kg



▪ DIMETOATO

Nombre: O,O-dimetil(S-metilcarbamil)metilfosforoditioato

Fórmula: CH₃NHCOCH₂SPS(OCH₃)₂

Masa molecular: 229,0

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: hedor

Punto de fusión: 49°C

Punto de ebullición: 117 °C

Densidad (20 °C): 1,281 g/cm³

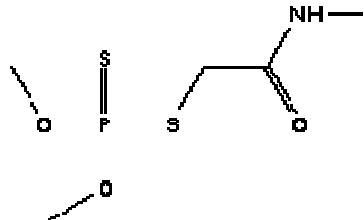
Presión de vapor (25 °C): 1,1 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 21 °C): 25

Solubilidad (g/l en 25 °C): en metanol 800

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 291 – 325 mg/kg



▪ DIURON

Nombre: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea

Fórmula: C₉H₁₀Cl₂N₂O

Masa molecular: 233,2

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 158- 159 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,148 g/cm³

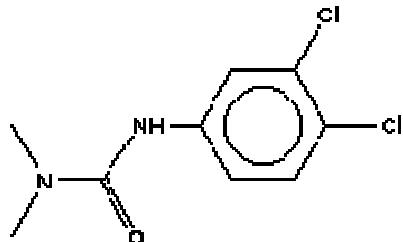
Presión de vapor (50 °C): 0,41 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 25 °C): 0,042

Solubilidad (g/l en 27 °C): en acetona 53

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 3400 mg/kg



▪ α -ENDOSULFAN

Nombre: (1,4,5,6,7,7-hexacloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-xilenobismetileno)sulfito, isómero alfa.

Fórmula: C₉H₆Cl₆O₃S

Masa molecular: 406,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: penetrante-picante

Punto de fusión: 109 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

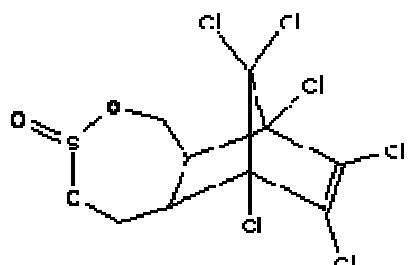
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en 22 °C): 0,0003

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 76 mg/kg



▪ ENDOSULFAN-SULFATO

Nombre: 1,4,5,6,7,7-hexacloro-hexahidro-metano-benzodioxatiepin-dioxido

Fórmula: C₉H₆Cl₆O₄S

Masa molecular: 422,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 182 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

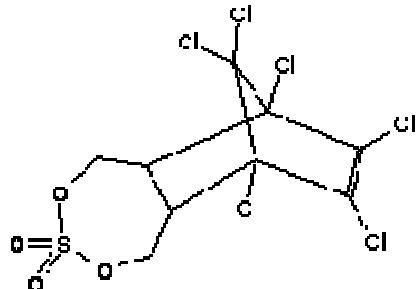
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C): N/A

Solubilidad (g/l en °C): N/A

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: N/A



▪ ENDRIN

Nombre: (1R,4S,4aS,5S,7R,8R,8aR)-1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-6,7-epoxi-1,4:5,8-dimetil

Fórmula: C₁₂H₈Cl₆O

Masa molecular: 380,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 226 – 230 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,64 g/cm³

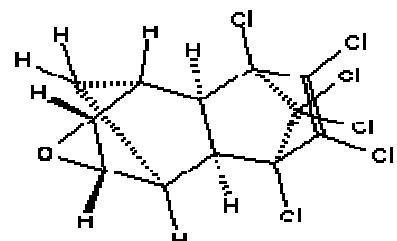
Presión de vapor (20 °C): 20 mPa

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en 20 °C): en benzol 140

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 5 – 45 mg/kg



■ **α-HCH**

Nombre: 1a,2a,3a,4β,5a,6β-hexaclorociclohexano, isómero alfa

Fórmula: C₆H₆Cl₆

Masa molecular: 290,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 159 – 160 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

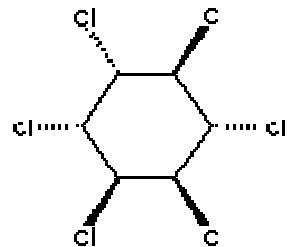
Presión de vapor (20 °C): 2,5·10⁻⁵

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,01

Solubilidad (g/l en 20 °C): en metanol 23

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 500 mg/kg



■ **β-HCH**

Nombre: 1a,2β,3a,4β,5a,6β-hexaclorociclohexano, isómero beta

Fórmula: C₆H₆Cl₆

Masa molecular: 290,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: penetrante-picante

Punto de fusión: 312 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

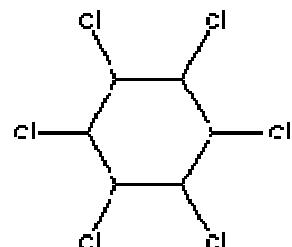
Presión de vapor (20 °C): 2,8·10⁻⁷ mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,0002

Solubilidad (g/l en 20 °C): en metanol 16

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 600 mg/kg



■ γ -HCH

Nombre: 1a,2a,3a,4 β ,5a,6 β -hexaclorociclohexano, isómero gamma

Fórmula: C₆H₆Cl₆

Masa molecular: 290,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: penetrante-picante

Punto de fusión: 112 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

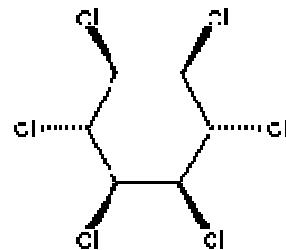
Presión de vapor (20 °C): 5,6 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,007

Solubilidad (g/l en 20 °C): en acetona 50

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 88 – 270 mg/kg



■ δ -HCH

Nombre: 1a,2a,3a,4 β ,5a,6 β -hexaclorociclohexano, isómero delta

Fórmula: C₆H₆Cl₆

Masa molecular: 290,9

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 138 - 139 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

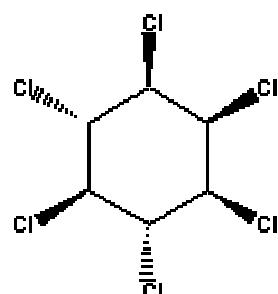
Presión de vapor (20 °C): 1,75 E -5

Solubilidad en agua (g/L en 20 °C): 0,01

Solubilidad (g/L en 20 °C): en metanol 273

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 1000 mg/kg



▪ HEPTACLORO

Nombre: 1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno

Fórmula: $C_{10}H_5Cl_7$

Masa molecular: 373,3

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: semejante al alcanfor

Punto de fusión: 95 – 96 °C

Punto de ebullición: 117 – 126 °C

Densidad (25 °C): 1,65 – 1,67 g/cm³

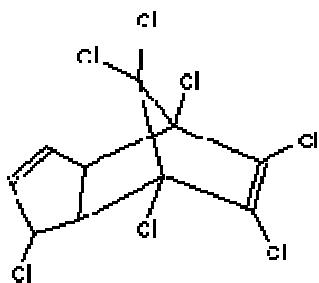
Presión de vapor (25 °C): 53 mPa

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en 25 °C): en etanol 62,5

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 147 – 220 mg/kg



▪ HEPTACLORO EPOXI A

Nombre: 1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno (endo)

Fórmula: $C_{10}H_5Cl_7O$

Masa molecular: 389,31

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 84 - 87 °C

Punto de ebullición: N/A °C

Densidad (25 °C): N/A g/cm³

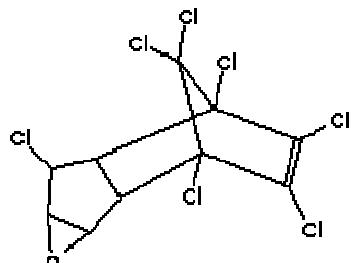
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/L en °C):

Solubilidad (g/L en 25 °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: N/A



▪ HEPTACLORO EPOXI B

Nombre: 1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno (exo)

Fórmula: $C_{10}H_5Cl_7O$

Masa molecular: 389,31

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 164 °C

Punto de ebullición: N/A °C

Densidad (25 °C): N/A g/cm^3

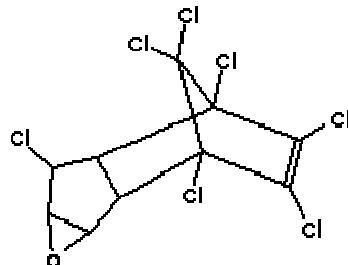
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/L en °C):

Solubilidad (g/L en 25 °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 62 mg/kg



▪ HEXAACLOROBENCENO

Nombre: Hexaclorobenceno

Fórmula: C_6Cl_6

Masa molecular: 284.8

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro-blanco

Olor:

Punto de fusión: 231 °C

Punto de ebullición: 323-326 °C

Densidad (25 °C): 2.04 g/cm^3

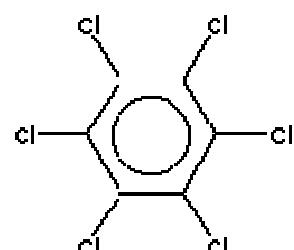
Presión de vapor (114 °C): 0.113 kPa

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en 25 °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: mg/kg



▪ ISODRÍN

Nombre: 1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-endo,endo-1,4,5,8-dimetano-naftalina

Fórmula: $C_{12}H_8Cl_6$

Masa molecular: 364,9

Forma: sólido cristalino

Color: gris amarillado hasta pardusco

Olor: no disponible

Punto de fusión: 240 – 242 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C): N/A

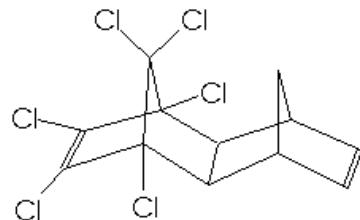
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en °C):

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 7 – 15 mg/kg



▪ 4-ISOPROPILANILINA

Nombre: 4-(1-metiletil)-bencenamina

Fórmula: $C_9H_{13}N$

Masa molecular: 135,21

Forma: líquida

Color: gris oscuro hasta negro

Olor: no disponible

Punto de fusión: °C

Punto de ebullición: 226-227 °C

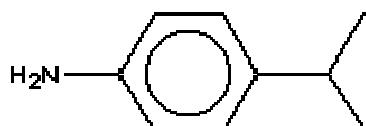
Densidad (20 °C): 0,977 g/cm³

Presión de vapor (20 °C): N/A

Solubilidad en agua (g/L en 20 °C): N/A

Solubilidad (g/L en 20 °C): N/A

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado



LD50: N/A

▪ ISOPROTURON

Nombre: 3-p-cumenil-1,1-dimetilurea

Fórmula: C₁₂H₁₈N₂O

Masa molecular: 206,2

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 155 – 156 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,16 g/cm³

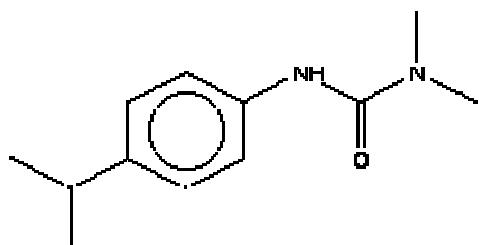
Presión de vapor (20 °C): 0,0033 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,055

Solubilidad (g/l en 20 °C): en metanol 56

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 1826 – 3600 mg/kg



▪ METOLACLORO

Nombre: 2-Cloro-6'-etil-N-(2-metoxi-1-metiletil)acet-o-tiluidina

Fórmula: C₁₅H₂₂ClNO₂

Masa molecular: 283,79

Forma: líquida

Color: amarillo

Olor: inoloro

Punto de fusión: N/A °C

Punto de ebullición: 100°C

Densidad (20 °C): 1,12 g/cm₃

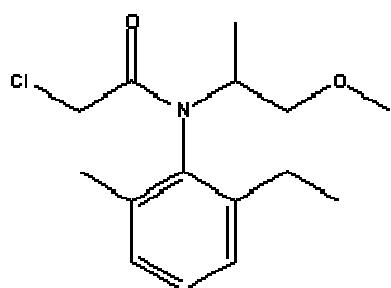
Presión de vapor (°C): 1,7 mPa

Solubilidad en agua (g/L en 25 °C): 0,488

Solubilidad (g/L en °C): en disolvente común

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 2780 mg/kg



▪ METOXICLORO

Nombre: 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-metoxifenil)etano

Fórmula: C₁₆H₁₅Cl₃O₂

Masa molecular: 345,7

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: olor frutero - agradable

Punto de fusión: 89 °C

Punto de ebullición:

Densidad (20 °C): 1,41 g/cm₃

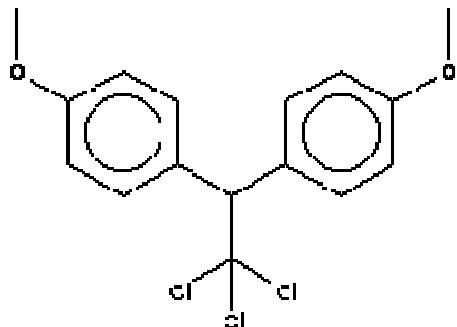
Presión de vapor (°C): N/A

Solubilidad en agua (g/l en 25 °C): 0,0001

Solubilidad (g/l en 22 °C): en cloroformo 440

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 6000 mg/kg



▪ MOLINATO

Nombre: S-Ethyl azepane-1-carbothioate

Fórmula: C₉H₁₇NOS

Masa molecular: 187,30

Forma: líquida

Color: incoloro

Olor: aromático

Punto de fusión: N/A

Punto de ebullición: 355 °C

Densidad (20 °C): 1,063 g/cm₃

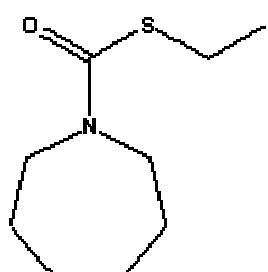
Presión de vapor (°C): 746 mPa

Solubilidad en agua (g/L en 25 °C): 0,88

Solubilidad (g/L en 22 °C): in miscible

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 369-450 mg/kg



▪ PARATION ETIL

Nombre: O,O-dietil-O-4-nitrofenil-fosforotiolato

Fórmula: $C_{10}H_{14}NO_5PS$

Masa molecular: 291,27 g

Forma: líquida

Color: amarillo

Olor: Penetrante - picante

Punto de fusión: 6,1 °C

Punto de ebullición: 150 °C

Densidad (20°C): 1,2694 g/cm³

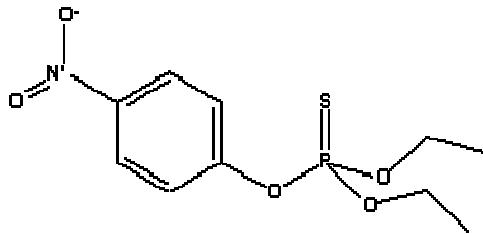
Presión de vapor (20 °C): 0,89 mPa

Solubilidad en agua (g/L en 20 °C): 0,0011

Solubilidad (g/L en 20 °C): en diclorometano >200

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 2 – 10 mg/kg



▪ PARATION METIL

Nombre: O,O-dimetil-O-4-nitrofenil-fosforotioato

Fórmula: $C_8H_{10}NO_5PS$

Masa molecular: 263,8

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 35 – 36 °C

Punto de ebullición: 119 °C

Densidad (20 °C): 1,358 g/cm³

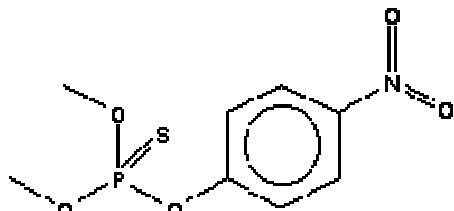
Presión de vapor (20 °C): 0,2 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,055

Solubilidad (g/l en 20 °C): en diclorometano > 200

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 6 mg/kg



- **PROMETON**

Nombre: N2,N4-di-isopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₁₀H₁₉N₅O

Masa molecular: 225,3

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 91 – 92 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,088 g/cm³

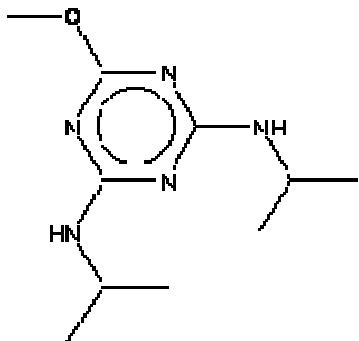
Presión de vapor (20 °C): 0,306 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,62

Solubilidad (g/l en 20 °C): en acetona 300

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 3000 mg/kg



- **PROMETRINA**

Nombre: N2,N4-di-isopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₁₀H₁₉N₅S

Masa molecular: 241,3

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 118 – 120 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,157 g/cm³

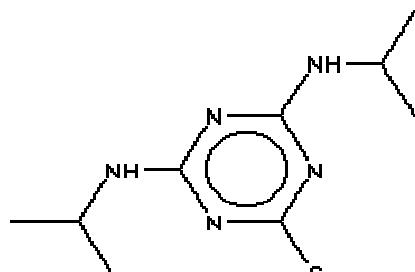
Presión de vapor (20 °C): 0,133 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,033

Solubilidad (g/l en 20 °C): en diclorometano 300

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 5233 mg/kg



▪ PROPAZINA

Nombre: 6-cloro-N2-N4-di-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₉H₁₆N₅Cl

Masa molecular: 229,7

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 212 – 214 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,162 g/cm³

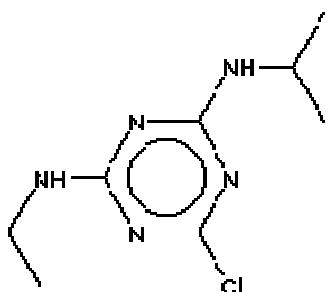
Presión de vapor (20 °C): 0,0039 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,005

Solubilidad (g/l en 22 °C): en benceno 6,2

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: > 7700 mg/kg



▪ SIMAZINA

Nombre: 2-cloro-4,6-bis(etilamina)-S-triazina

Fórmula: C₇H₁₂N₅Cl

Masa molecular: 201,7

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: característico

Punto de fusión: 225 – 227 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (°C):

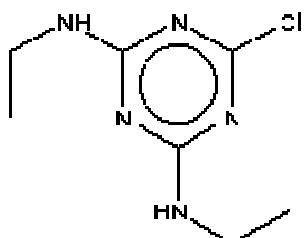
Presión de vapor (20 °C): 8,1·10⁻⁴ mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,0005

Solubilidad (g/l en °C):

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: N/A



▪ TERBUTILAZINA

Nombre: N2-tert-butil-6-cloro-N4-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₉H₁₆N₅Cl

Masa molecular: 229,7

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 117 – 179 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,188 g/cm³

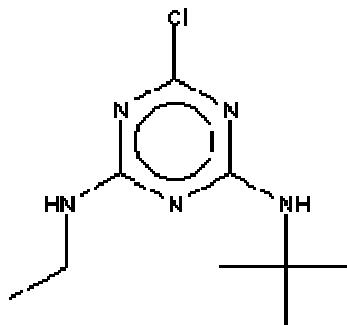
Presión de vapor (20 °C): 0,15 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,0085

Solubilidad (g/l en 20 °C): en dimetilformo 100

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 2160 mg/kg



▪ TERBUTRINA

Nombre: N2-tert-butil-N4-etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Fórmula: C₁₀H₁₉N₅S

Masa molecular: 241,3

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 104 – 105 °C

Punto de ebullición: 154 – 160 °C

Densidad (20 °C): 1,115 g/cm³

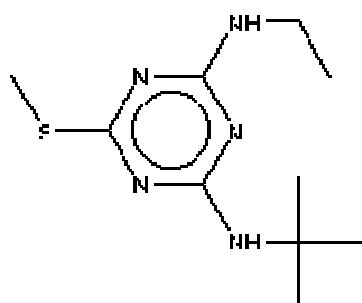
Presión de vapor (20 °C): 0,128 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 20 °C): 0,025

Solubilidad (g/l en 20 °C): en diclorometano 300

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: 2000 mg/kg



▪ TETRADIFON

Nombre: 4-clorofenil-2,4,5-triclorofenilsulfon

Fórmula: $(C_6H_2Cl_3)OSO(C_6H_4Cl)$

Masa molecular: 356,0

Forma: sólido cristalino

Color: incoloro

Olor: no disponible

Punto de fusión: 148 – 149 °C

Punto de ebullición: N/A

Densidad (20 °C): 1,515 g/cm³

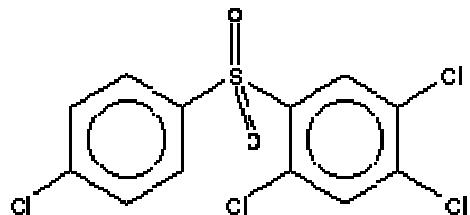
Presión de vapor (20 °C): 0,001 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 10 °C): 0,0000

Solubilidad (g/l en 25 °C): en cloroformo 225

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: > 14700 mg/kg



▪ TRIFLURALINA

Nombre: a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidino

Fórmula: $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$

Masa molecular: 335,3

Forma: sólido cristalino

Color: anaranjado

Olor: no disponible

Punto de fusión: 48,5 – 49 °C

Punto de ebullición: 96 – 97 °C

Densidad (°C): N/A

Presión de vapor (25 °C): 13,7 mPa

Solubilidad en agua (g/l en 27 °C): < 0,001

Solubilidad (g/l en 27 °C): en xileno 580

Estabilidad: no descomposición térmica con uso adecuado

LD50: > 10000 mg/kg

