



**Determinación por método espectrofotométrico y tratamiento bioquímico de clorofila A en
laboratorio ambiental de CORNARE**

Maria Camila Castrillon Usuga
Ingeniera Bioquímica

Asesor interno
Carolina Montoya Vallejo
Ingeniera Biológica
Asesor externo
Juan David Echeverri Ruiz
Ingeniero Químico

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Pregrado
Seccional Urabá
2022

Cita	Apellidos autor [1]
Referencia Estilo IEEE (2020)	[1] M. Castrillón Usuga, “Determinación por método espectrofotométrico y tratamiento bioquímico de la clorofila A en el laboratorio ambiental de CORNARE”, Modalidad presencial, pregrado en Ingeniería bioquímica, Universidad de Antioquia, Urabá, 2022.



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/director: Jesús Francisco Vargas Bonilla

Jefe departamento: Lina María Gonzáles Rodríguez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Dedico este proyecto de grado principalmente a mi familia, quienes me apoyaron de muchas formas en toda esta trayectoria y reciben este logro con tanto entusiasmo como yo, también a todos mis compañeros, docentes, entrenadores y administrativos que hicieron inolvidable mi paso por la universidad, ya que me formaron como profesional pero también como ser humano.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi asesora la ingeniera Carolina Montoya Vallejo, ya que gracias a su conocimiento, dedicación y apoyo pude culminar este proyecto con satisfacción.

Enteramente agradecida con la Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los ríos Negro y Nare “CORNARE”, especialmente a todo el equipo del laboratorio ambiental, encabezado por Juan David Echeverri Ruiz, quienes me abrieron sus puertas para realizar mi practica académica, propiciando el espacio para el desarrollo de este proyecto y, además, compartieron sus conocimientos.

Agradecer también al grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental “GAIA” por su generosidad al suministrar el material de referencia “*Daphnia pulex*” para el desarrollo del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. OBJETIVOS	11
A. Objetivo general	11
B. Objetivos específicos	11
III. MARCO TEÓRICO	12
IV. METODOLOGÍA	14
V. RESULTADOS	16
A. Protocolo para la determinación de clorofila por espectrofotometría de UV-visible	16
B. Ensayo experimental	20
VI. ANÁLISIS	25
VII. CONCLUSIONES	33327
VIII. RECOMENDACIONES	28
REFERENCIAS	29
ANEXOS	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO BIOQUÍMICO	20
Tabla 2. OXÍGENO DISUELTO (OD) MUESTRAS EXPERIMENTALES	21
Tabla 3. ANÁLISIS RELACIONADOS A LA EUTROFIZACIÓN DE LA MUESTRA DE AGUA DEL EMBALSE GUATAPÉ	22

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Disminución de clorofila A en el tiempo, concentración baja	21
Gráfica 2. Niveles de Oxígeno Disuelto (OD) muestras con concentración baja	22

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Diseño experimental	20
Fig. 2. <i>Daphnia pulex</i> al inicio (A) y final del experimento (B), observación al microscopio, aumento 10X.	22
Fig. 3. Concentración de clorofila de 15 mg/m ³ al inicio y al final del experimento	23
Fig. 4. Concentración de clorofila de 20 mg/m ³ al inicio y al final del experimento	23

RESUMEN

Se adaptó el protocolo de determinación de clorofila por el método **10200 H. Chlorophyll-2** del “Standard Methods for examination of water and Wastewater 23 Ed” para el laboratorio ambiental de CORNARE, posteriormente, se realizó un tratamiento bioquímico con *Daphnia pulex* que ayudaron a remediar aguas en estado eutrófico con concentraciones de clorofila 16 mg/m³ hasta disminuirlas a 4 mg/m³, donde se evidencia que en este ambiente pueden sobrevivir las daphnias, los resultados mostraron una efectividad nula en el tratamiento a concentraciones elevadas de clorofila, resultando ser esta inhibitoria para las Daphnias.

Palabras clave — Clorofila, tratamiento bioquímico, *Daphnia pulex*, aguas, estado eutrófico.

ABSTRACT

Chlorophyll determination protocol was adapted from 10200 H Chlorophyll-2 method of the "Standard Methods for examination of water and Wastewater 23 Ed" in the CORNARE environmental laboratory. Additionally a biochemical treatment of Chlorophyll a using *Daphnia pulex* was studied, this treatment helped to remediate water in eutrophic state with concentrations of 16 mg/m³ chlorophyll until they decrease to 4 mg/m³ chlorophyll, it is evident that daphnia can survive in this environment, the results showed non significant effectiveness of the treatment at high concentrations of chlorophyll, because of inhibitory effect in daphnia's.

Keywords —. Chlorophyll, biochemical treatment, *Daphnia pulex*, water, eutrophic state.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso limitado y primario para la vida, en la cantidad y calidad adecuada ayuda al desarrollo sostenible; debido al crecimiento industrial y poblacional se ve afectada en estos aspectos por la contaminación, generando cambios físicos y químicos en el ecosistema.

Uno de los grandes problemas de contaminación es la eutrofización, la cual resulta del aumento de nutrientes (fósforo y nitrógeno) provocando un incremento de plantas acuáticas y fitoplancton que impiden el paso de la luz, aumentan los olores, mayor biomasa, cambios en el pH, además de una disminución en la biodiversidad de especies [1]

El embalse, siendo este un ecosistema intermedios entre río y lago tiene una tendencia a contaminarse y a la eutrofización lo que ocasiona que se disminuya su vida útil y se aumenten los costos de tratamiento de su potabilización[2], durante muchos años este problema se ha venido evidenciando en la represa del peñol como en 1982 donde se evidenció algas y una eutrofización moderada[3], y en el 2018 mantuvo un estado eutrófico durante todo el año[2], este cuerpo de agua recibe la contaminación directa del río Negro y de las plantas de tratamiento del Peñol y Guatapé, incluso CORNARE le ha hecho seguimiento a estas aguas desde el 2013, obteniéndose en el 2017 una calidad regular del agua lo que no lo hace apto para actividades de contacto primario [4] por lo tanto se busca prevenir la eutrofización de los embalses ya que corregirla es costoso, además es necesario ya que las empresas o entidades públicas que manejan el embalse deben cumplir con el decreto 2811 de 1974 [5] el cual indica en pocas palabras que se debe mejorar las condiciones ecológicas y prevenir la eutrofización, en cuanto a criterios de calidad para uso recreativo o de protección de fauna y flora en el cual la concentración de clorofila a no debe sobrepasar los 2,5 mg/m³, por lo expuesto anteriormente se determina la cantidad de clorofila en el agua por espectrofotometría UV-visible, evidenciando el nivel trófico y a partir de esto darle un tratamiento desde el punto de vista bioquímico con *Daphnia pulex*¹, donde su función es filtrar la clorofila en el agua.

El laboratorio ambiental de CORNARE, desea cumplir con todas las normativas ambientales, y así realizar los análisis de agua en términos de biodegradabilidad, por lo tanto, se tendrá como base para realizar el protocolo de determinación de clorofila la información

¹ *Daphnia pulex* fue suministrada por el grupo de investigación en Gestión y Modelación Ambiental “GAIA”

contenida en el Standard Methods edición 23, además de las normativas donde se definen los criterios de calidad para el uso de las aguas.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Proponer un proceso para el tratamiento del agua con contenido de clorofila “a” en el laboratorio ambiental de CORNARE

B. Objetivos específicos

- Adaptar el método de referencia 10200 H. Chlorophyll del “Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed” para determinar clorofila en muestras de agua.
- Desarrollar un ensayo experimental para el tratamiento bioquímico de clorofila en la matriz agua.
- Adquirir conocimientos de los procedimientos para realizar el análisis fisicoquímico en muestras de aguas.
- Elaborar un estado del arte donde se evidencie el tratamiento para la eutrofización en la matriz agua, haciendo uso de procesos bioquímicos.

III. MARCO TEÓRICO

La clorofila es un pigmento verde que presentan los vegetales, algunas algas protistas y cianobacterias, es la encargada de absorber la luz para realizar la fotosíntesis. Las algas al poseer este pigmento y debido a la fotosíntesis logran generar oxígeno, pero este a su vez degrada la materia orgánica que se encuentre en el agua, generalmente en aguas residuales, provocando malos olores y colores desagradables, por lo que la clorofila se vuelve un parámetro para evaluar la calidad del agua, brindando información de la cantidad de algas y el estado trófico del medio al igual que el nitrógeno y el fósforo. Los ríos, cascadas y lagos están expuestos a contaminación debido a residuos del trabajo humano (ganadería, agricultura, vertimientos de aguas residuales no tratadas) por lo que se genera un desequilibrio ambiental que generalmente conlleva a una carga de nutrientes que provoca la eutrofización de las aguas, principalmente Nitrógeno (N) y Fósforo (P), originando un crecimiento descontrolado de algas fitoplanctónicas. Esta eutrofización puede evaluarse midiendo la clorofila a y sus niveles se pueden clasificar de manera trófica de acuerdo con el sistema mencionado en el informe técnico del INVEMAR (Colombia) [6] donde, encontrar concentraciones de 0,3 y 3 mg Clor a /m³, indica que es un sistema oligotrófico; entre 3 y 15 mg Clor a /m³ mesotrófico; y entre 15 a 500 mg Clor a /m³ eutrófico. Para analizar la calidad del agua, se puede dividir en parámetros físicos, químicos y biológicos, donde los físicos pueden ser los sólidos suspendidos, turbiedad, color, sabor, olor y temperatura, los químicos corresponden a aquellos donde el agua tiene la capacidad de disolverlos como alcalinidad, sólidos disueltos, cloruros, durezas, materia orgánica y nutrientes, mientras que los biológicos son los que dependen de las especies que indique en qué condiciones se encuentra el agua. Se puede también relacionar la clorofila a con el contenido de biomasa [7]. Algunas de estas variables físico químicas se evaluarán ya que sirven como indicadores del posible tratamiento que se le dé al agua, por ejemplo, se relaciona los niveles de nitrógeno total y fósforo total con la clorofila a, lo que indicaría la calidad del agua en el embalse. En este análisis se estudia la clorofila A ya que esta se encuentra en todas las plantas fotosintéticas, algas y cianobacterias mientras que la clorofila b solo en algunas algas, sin embargo el protocolo se adaptará para la clorofila en general, incluso en presencia de feofitina, empleando la técnica de espectrofotometría UV-visible, ya que este sistema permite agilizar el proceso de análisis y tiene una elevada eficacia en su

medición, además de que determina la concentración en solución centrándose en la cantidad de luz absorbida, llevándose a cabo en un espectrofotómetro marca Genesys donde se debe seleccionar la longitud de onda que pasa por la solución extraída. Uno de los métodos para minimizar los problemas de eutrofización es haciendo uso del proceso de biomanipulación, utilizado cladóceros como *Daphnia pulex* que además de ser filtradores sirven como alimento para peces por su alto contenido nutricional, facilidad de cultivo ya que son resistentes a los cambios ambientales, tienen una alta tasa de multiplicación y poca selectividad como filtradores [8].

Desde 1970 se ha empezado a tratar el tema de limnología en embalses de Colombia, reportados en “Fundamentos de la limnología neotropical” [1], donde se explican algunos tratamientos biológicos como el uso de plantas y bacterias. Los lagos eutrofizados se pueden tratar con alguicidas u otros químicos que eliminen las algas del embalse, sin embargo no serían ambientalmente seguros, otro tratamiento es tratar con aireación ya que el oxígeno ayuda a descomponer nutrientes y vegetación del agua, sin embargo esto sería una solución bastante costosa [9].

En la historia se han tratado aguas eutrofizadas de manera biotecnológica con el uso de perifitones, que son organismos bióticos acuáticos entre los que se encuentran bacterias, hongos y protozoos [10], los cuales consumen nutrientes en el agua como fósforo lo que puede incidir en el mejoramiento del cuerpo del agua, este tratamiento no se considera viable para el propósito ya que su manera de accionar es formando una especie de biofilm en las plantas o rocas, haciéndolo poco atractivo para actividades turísticas [11].

Por otro lado existen cladóceros conocidos como *Daphnia* o vulgarmente como “pulga de agua dulce” que se alimentan principalmente de fitoplancton y de materia orgánica disuelta y tienen facilidad para ser cultivadas en laboratorio, poco tiempo de vida pero se compensa con su alta producción de crías, son generalmente usados como referencia para medir niveles de toxicidad [12] y son capaces de limpiar el agua de algas, esto implicaría un impacto positivo en el embalse aumentó la claridad del agua, existen diversas bibliografías de cómo deben ser cultivadas y los requisitos que conllevan como en [13] y [11], además sirven como alimento para peces en el embalse lo que hace que cumplan su función y no afecten el ecosistema de una manera negativa.

IV. METODOLOGÍA

Para la adaptación del protocolo se tuvo en cuenta lo descrito en el “Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed” donde se establecen el objeto, el alcance, algunas definiciones, principio del método, equipos, los reactivos necesarios para su desarrollo y el procedimiento, mismo que se tiene en cuenta para culminar el desarrollo experimental.

En el diseño experimental para la remoción de clorofila, se utilizaron recipientes de 400 mL con contenido de clorofila alto y bajo, adicionando levadura liofilizada activa seca como *Saccharomyces cerevisiae*² que ayuda a potenciar el crecimiento y una mayor eficiencia productiva de la pulga de agua [2], se alimentaron cada día con 3 gotas de Levadura, se transfirieron 10 individuos de *Daphnia* en el recipiente, variando la aireación y haciendo una réplica, luego se taparon con una malla evitando contaminación con mosquitos, para evidenciar los cambios en el agua se tomaron muestras al inicio, a la mitad y al final del experimento para estimar la clorofila A mediante espectrofotometría. Las poblaciones de *Daphnia* se deben mantener en un lugar amplio para evitar estrés por falta de espacio, de alimento y oxígeno, sin embargo, este cladóceros es resistente a temperaturas extremas, considerando una temperatura óptima entre 18-20 °C lo cual coincide con las temperaturas de los embalses que es aproximadamente 19°C. También para su óptimo desarrollo el pH debe oscilar entre 7-8 y no se ven afectadas por la presencia de sales de fosfatos y nitratos.

Para complementar se tomaron muestras de agua del embalse de Guatapé para medir sus condiciones fisicoquímicas, con dos puntos de muestreo cada una, la orilla y el centro, (las muestras serán tomadas por el personal a cargo del muestreo en el laboratorio), una vez recibida la muestra se procede a analizar sus condiciones, pH, Fósforo y Nitrógeno disuelto y clorofila según el protocolo propuesto a partir del Standard Methods.

Preparación del agua:

Para el desarrollo práctico de este experimento se simularon dos estados eutróficos. con agua natural, la cual se debe dejar reposar dos días para eliminar cualquier rastro de cloro residual, posterior a esto se mezcla con clorofila comercial dejando el agua con una concentración de 16 y 20 mg/m³.

² Levadura activa seca, comercial marca LEVAPAN S.A.

Preparación de levadura:

Adicionar 2 mg de levadura en 10mL de agua, mezclar y una vez esté completamente disuelta combinar con la muestra.

El principio básico de la medición electrométrica del pH es la determinación de la actividad de los iones de hidrógeno por medición potenciométrica utilizando un electrodo combinado, generando respuesta con unidades de pH en un rango de 0 a 14.

En la determinación de Nitrógeno total, en las muestras de agua por el método de análisis de flujo segmentado de acuerdo con el método ISO 29441:2010 Water quality –Determination of total nitrogen after UV digestion – Method using flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection, en un rango de medición de 20 mg – N/L hasta 150 mg N/L.

El método para la determinación de fósforo total está basado en reacciones específicas para el ión ortofosfato; cuando se trata de determinar el Fósforo total debe procederse a la digestión que oxida la materia orgánica para liberar el ortofosfato. La digestión se hace con ácido nítrico y ácido sulfúrico, de acuerdo con el Método 4500-P B y 4500-P E.

La turbidez se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en el Standard Methods “2130 B Método Nefelométrico”. Este método se basa en la comparación de la intensidad de luz dispersada por una muestra en condiciones definidas con la intensidad de luz dispersada por una muestra de referencia estándar en las mismas condiciones, cuanto mayor es la intensidad de la luz dispersa, mayor es la turbidez.

Materiales y equipo

- Bombas de aire
- 8 recipientes de vidrio
- mallas de tela
- Clorofila comercial
- Levadura liofilizada
- Clorofila marca comercial

V. RESULTADOS

A. Protocolo para la determinación de clorofila por espectrofotometría de UV-visible

1. OBJETO

Describir los pasos a seguir, sugerencias y recomendaciones para la determinación de clorofila de acuerdo con el Método 10200 H. Chlorophyll del “Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed” en muestras de agua.

2. ALCANCE

El protocolo es aplicable a las muestras de aguas lenticas.

3. DEFINICIONES

3.1. Clorofila: pigmento verde que presentan los vegetales, algunas algas protistas y cianobacterias, es la encargada de absorber la luz para realizar la fotosíntesis y sirve como parámetro para medir la eutrofización de sistemas acuáticos.

3.2. Eutrofización: es un efecto de la contaminación del hombre sobre los cuerpos de agua dulce, ocasionando aumento de nutrientes, malos olores y cambio de color.

3.3. Espectrofotometría UV-visible: las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración.

3.4. Feofitina: es un producto de degradación de la clorofila a, cualquier pigmento que es derivado de la clorofila donde se ha eliminado el metal central.

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método empleado para la determinación de clorofila en la matriz agua es el Método 10200 H. Chlorophyll, determinación de clorofila por espectrofotometría [14], sirviendo para calcular clorofila a, b y c y la clorofila a en presencia de feofitina. Este fenómeno físico describe la adsorción de una parte del espectro de luz visible mientras que la otra se refleja, se relacionan conceptos de luz, absorbancia y pigmentos en términos de la ley de Beer la cual hace referencia a la absorbancia que originan los pigmentos, como la clorofila. El carbonato de magnesio hace que la clorofila no se degrade actuando como un tampón de pH. La medición se realiza a cinco longitudes de onda de acuerdo al método ya que este requiere una corrección por turbidez, la cual se hace a 750 nm.

La concentración de clorofila a se puede sobreestimar si no se tiene en cuenta los productos de degradación como la feofitina, por lo tanto, se puede encontrar la concentración en muestra de clorofila A y feofitina acidificando el extracto, lo que causa que la clorofila-a presente pierda su átomo de magnesio convirtiéndose en feofitina-a, la acidificación tiene como objetivo eliminar las interferencias de los feopigmentos.

5. EQUIPOS

- Espectrofotómetro génesis UV-visible.
- Pipetas volumétricas de 0.1 y 5 mL.
- Pipetas graduadas de 5 mL.
- Cubetas, con longitudes de paso óptico de 1 cm.
- Tubos falcon de 15 mL.
- Erlenmeyer de 100 y 250 mL.
- Filtros de fibra de vidrio.
- Centrifuga Q-sep 3000/ Restek

6. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico (HCL) al 0,1N: Tomar 4,2 ml con pipeta graduada de ácido clorhídrico concentrado (37%), posteriormente aforar con agua destilada en un balón volumétrico de 500 mL.
- Solución acuosa de acetona: mezcle 90 mL de acetona (grado reactivo) con 10 mL de solución saturada de carbonato de magnesio.
- Solución saturada de carbonato de magnesio: agregue 1g de $MgCO_3$ en polvo a 100 ml de agua destilada.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se recolectan muestras de 2 litros en frascos de vidrio ámbar para evitar contacto con la luz, estas son recibidas en el laboratorio y se le asigna un código

8. PROCEDIMIENTO

El procedimiento se debe hacer en tres etapas, la etapa 1, se extraen los pigmentos, la etapa 2 se determina la biomasa y la etapa 3 es de cálculos.

Etapas 1, extracción de pigmentos

Se filtra la muestra para eliminar las algas del agua (anotar el volumen filtrado), estos filtros al ser de fibra de vidrio ayudan a romper las células durante la molienda, agregue 2 ml de la solución de MgCO₃ saturada la cual reducirá el riesgo de degradación de pigmentos. Para extraer la clorofila de la muestra, se tritura el filtro adicionando 3 mL de la solución saturada de acetona, posteriormente se pasa la muestra en suspensión a un tubo falcón aforando a 10 mL con la misma solución y se centrifugan a 3000 rpm durante 20 min, por último, medir el volumen del extracto.

Etapa 2, determinación de clorofila

Para determinar clorofila en presencia de Feofitina, transferir 3 mL del extracto a una cubeta, medir la absorbancia a 664 nm y 750 nm, anotarlas en la hoja de cálculo³, adicionar al extracto 0,1 mL de HCl al 0.1 N, agitar suavemente y medir la absorbancia a 665 y 750 nm pasados 90 segundos. Reste los valores de la absorbancia de 750 nm a las lecturas de 664 nm y 665 nm y usando esos valores corregidos, calcule la clorofila y la feofitina por metro cúbico.

Para determinar la Clorofila a, b y c por el método tricromático, se transfieren 3 mL de extracto a la cubeta de 1 cm, se programa el espectrofotómetro para medir la absorbancia de 664 nm para la clorofila a, 647 nm para la clorofila b, 630 nm para la clorofila c y en 750 nm para realizar una corrección por turbidez, restarle a cada valor de absorbancia el valor de la absorbancia de 750 nm para hacer los cálculos.

Mida un blanco del método tomando 100 mL de agua tipo II y haciendo el mismo procedimiento antes descrito.

Etapa 3, cálculos y expresión de resultados

Para la determinación de clorofila a en presencia de Feofitina

$$\text{Clorofila } a, \text{ mg/m}^3 = \frac{26.7 \cdot (664_b - 665_a) \cdot V_1}{V_2 \cdot L} \quad (1)$$

$$\text{Feofitina } a, \text{ mg/m}^3 = \frac{26.7 \cdot [1.7 \cdot (665_a) - 664_b] \cdot V_1}{V_2 \cdot L} \quad (2)$$

Para la determinación de clorofila a, b y c por el método tricromático

$$Ca, \text{ mg/m}^3 = \frac{((11.85 \cdot \text{absorbancia } 664) - (1.54 \cdot \text{absorbancia } 647) - (0.08 \cdot \text{absorbancia } 630)) \cdot V_1}{V_2} \quad (3)$$

³ Hoja de cálculo Clorofila cálculos.xlsx para agilizar los resultados, se encuentra en los anexos.

$$Cb, \text{ mg/m}^3 = \frac{((11.85 * \text{absorbancia } 664) - (1.54 * \text{absorbancia } 647) - (0.08 * \text{absorbancia } 630)) * V_1}{V_2} \quad (4)$$

$$Cc, \text{ mg/m}^3 = \frac{((11.85 * \text{absorbancia } 664) - (1.54 * \text{absorbancia } 647) - (0.08 * \text{absorbancia } 630)) * V_1}{V_2} \quad (5)$$

Donde:

Ca, Cb y Cc = concentración de clorofila a, b y c respectivamente.

V1 = Volumen de extracto, L

V2 = Volumen de la muestra, m³

L = ancho de la cubeta, cm.

664b, 665a = absorbancia antes y después de la acidificación respectivamente.

9. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS

Medir un duplicado de muestra por cada grupo de 10 datos o menos. Con los resultados obtenidos de las mediciones por duplicado, construir y hacer seguimiento a la carta de control duplicado.

10. SEGURIDAD Y COMENTARIOS

- Al manipular muestras contaminadas tener todas las precauciones para evitar el contacto con la piel (guantes, tapabocas y gafas).
- Seguir siempre las instrucciones del fabricante para el manejo del espectrofotómetro UV-visible.
- Nunca eliminar los desechos del análisis por los desagües del laboratorio.
- Tener presentes las disposiciones del M-MA-03 “Higiene y Seguridad del LABORATORIO” y del Sistema de Seguridad y Salud Ocupacional del SGI.

11. ANEXOS

Hoja de cálculo donde se ingresan los datos y se genera el resultado, Clorofila cálculos.xlsx

B. Ensayo experimental

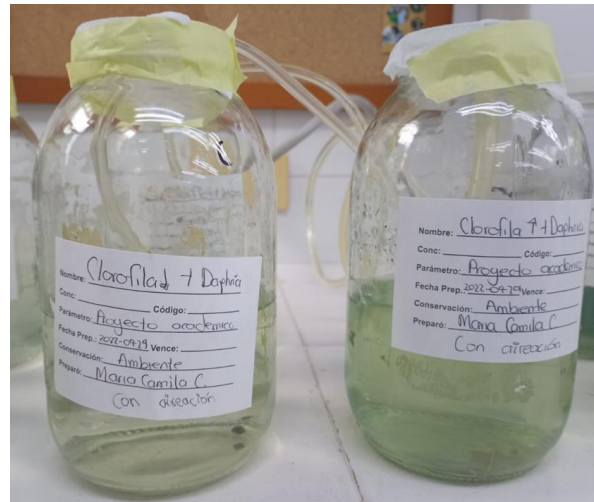


Fig. 1. Diseño experimental

Se realizaron 8 montajes, los cuales constan de concentración de clorofila alta, concentración baja, con aireación, sin aireación y una réplica, tapando la boca del recipiente con una malla para evitar contacto con mosquitos.

Tabla 1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO BIOQUÍMICO

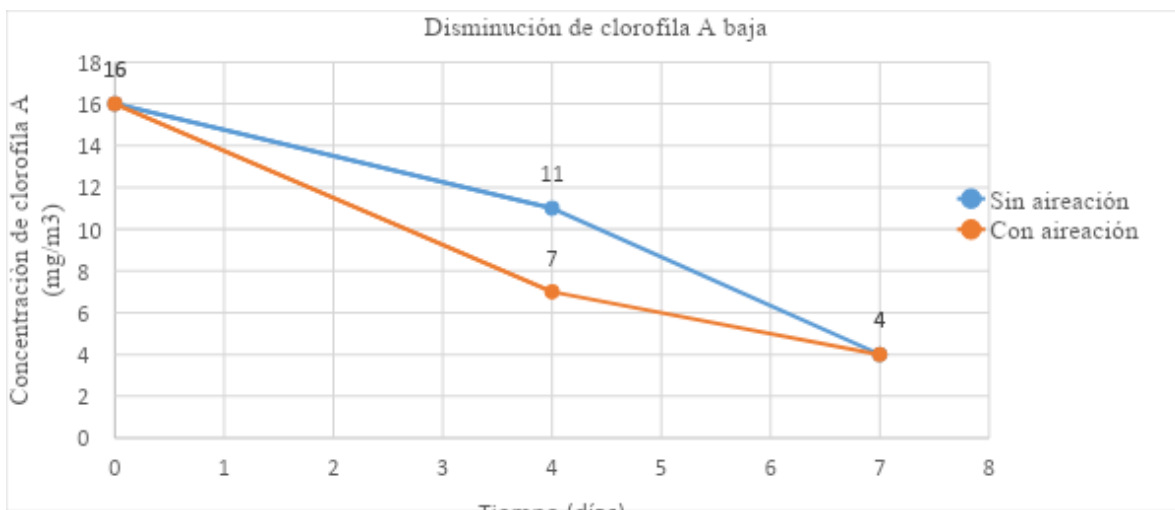
Fecha de análisis	Código de muestra	Concentración de clorofila mg/m ³
29/09/2022	[] alta sin aireación	19
29/09/2022	[] alta con aireación	20
29/09/2022	[] baja sin aireación	15
29/09/2022	[] baja con aireación	16
03/10/2022	[] baja sin aireación	11
03/10/2022	[] baja con aireación	7
06/10/2022	[] baja sin aireación	4
06/10/2022	[] baja con aireación	4
10/10/2022	1445-Guatapé	0
10/10/2022	1445-Guatapé (Duplicado)	1

Nota: []= concentración

En la tabla 1, se observa la descripción de las muestras y el contenido de clorofila en el tiempo, con aireación y sin aireación, las mediciones se hicieron referente a la concentración más baja de clorofila 16 mg/m³, donde se puede observar que estas condiciones son aptas para la alimentación de las pulgas de agua, sin embargo, se ven favorecidas con la aireación, disminuyendo la concentración de clorofila más que en ausencia de aireación. No se evidenciaron cambios de pH significativos, manteniéndose en pH 6,6-7.

Se descartaron los análisis con la concentración de clorofila alta ya que en estas condiciones las *Daphnias* no se adaptaron, se evidencio la muerte de estos cladóceros, por lo que no hubo remoción de clorofila a esta concentración, así mismo, se obtuvieron concentraciones de DQO y DBO de 767,2 y 662,2 mg/l respectivamente.

En la gráfica 1, se puede evidenciar la disminución de la clorofila A en el tiempo, mostrando en condiciones de aireación una disminución de clorofila más pronunciada, sin embargo, ambas llegan al mismo punto final de clorofila.

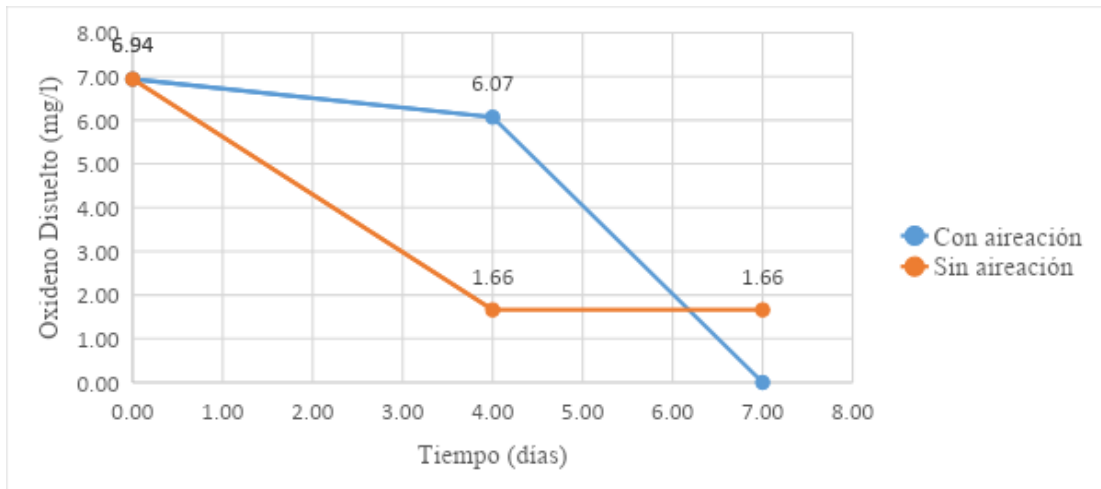


Gráfica 1. Disminución de clorofila A en el tiempo, concentración baja

Tabla 2. OXÍGENO DISUELTO (OD) MUESTRAS EXPERIMENTALES

Fecha medición	Con aireación		Sin aireación	
	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	OD (mg/L)	Temperatura (°C)
29/09/2022 (inicio)	6,94	21,3	6,94	21,3
3/10/2022 [A]	5,98	22,3	0,52	22,6
3/10/2022 [B]	6,07	22,7	1,66	20,3
6/10/2022 [A]	5,64	22,8	0,50	23,2
6/10/2022 [B]	5,97	22,8	1,66	23,2

Nota: [A] Y [B] son las concentraciones de clorofila alta y baja respectivamente.



Gráfica 2. Niveles de Oxígeno Disuelto (OD) muestras con concentración baja

Las aguas provenientes del embalse de Guatapé tienen una concentración de clorofila no mayor a 1 mg/m^3 , ver tabla 1, por lo que no se estudió su tratamiento bioquímico ya que tienen un nivel oligotrófico según los límites presentados por INVEMAR.

Tabla 3. ANÁLISIS RELACIONADOS A LA EUTROFIZACIÓN DE LA MUESTRA DE AGUA DEL EMBALSE GUATAPÉ

Parámetro	Resultado
Turbidez (UNT)	1,8
DQO (mg/L)	4,9
DBO (mg/L)	1
Nitrógeno total (mg/L)	-0,929
Fosforo total (mg/L)	-0,212

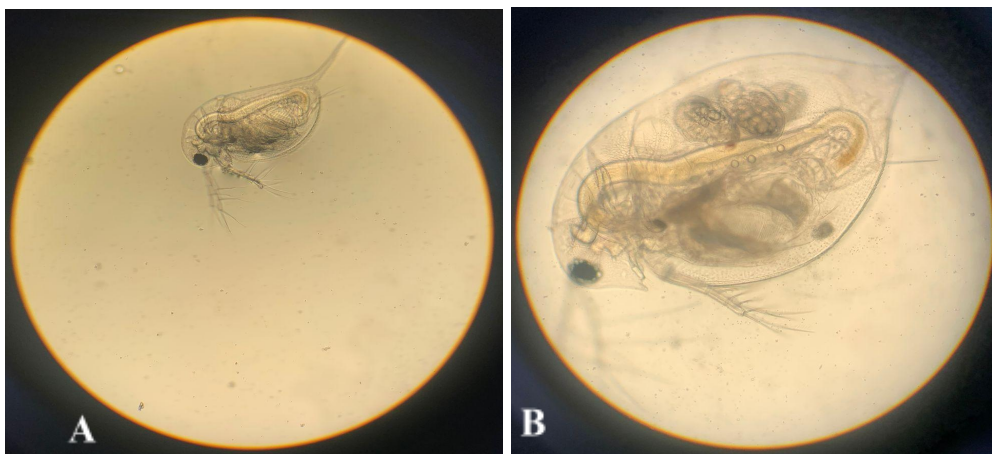


Fig. 2. *Daphnia pulex* al inicio (A) y final del experimento (B), observación al microscopio, aumento 10X.

Se evidencia un crecimiento en la morfología de la Daphnia, además se puede observar que está última lleva consigo algunos huevos, se identifican sus extremidades como dos pares de antenas y las patas, las cuales están adaptadas para nadar.



Fig. 3. Concentración de clorofila de 15 mg/m³ al inicio y al final del experimento

En la figura 3 se evidencia un cambio en el color del agua desde el inicio del experimento hasta el final, con aireación (C) y sin aireación (S).

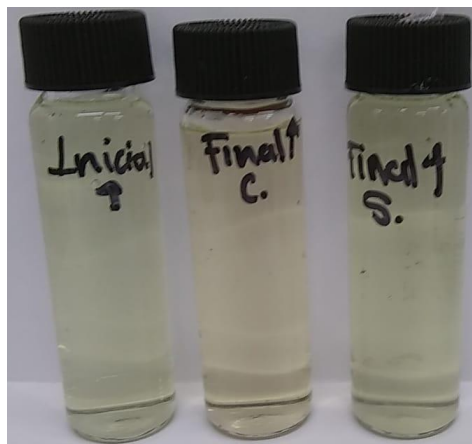


Fig. 4. Concentración de clorofila de 20 mg/m³ al inicio y al final del experimento

En la figura 4 no se evidencia un cambio en el color del agua desde el inicio del experimento hasta el final, con aireación (C) y sin aireación (S), el agua con aireación tiende a cambiar su color debido a la eutrofización.

VI. ANÁLISIS

El protocolo que fue implementado plantea claramente todo el paso a paso que se debe realizar para la determinación de clorofila y específica que su uso dependerá de lo que requiera el cliente ya que se pueden medir varios tipos de clorofila y productos degradantes como feofitina.

Se observa crecimiento y multiplicación del cultivo de Daphnias, ya que inicialmente en cada frasco había 10 pulgas de agua y al final se evidenciaron más de 10 individuos, lo cual se toma como indicador de buen funcionamiento del tratamiento en concentraciones no tan altas de clorofila, pero sí, simulando un estado eutrófico, se afirma que las Daphnias son resistentes a diferentes condiciones y que tienen altas tasas de multiplicación [15].

Por otro lado, se observa que concentraciones altas de clorofila se vuelven inhibitorias para los cladóceros, sin embargo, podrían hacerse más estudios para descartar que no sean los demás ingredientes que traen la clorofila comercial o el cambio brusco de ambiente.

Se observa en la gráfica 1, una disminución de clorofila A, teniendo más pendiente la clorofila con aireación, indicando que esta condición ayuda a limpiar el agua de manera más rápida, permitiendo que el agua entre en contacto con el aire, reduciendo el contenido de dióxido de carbono, oxidando minerales y potabilizando esta matriz [16].

La DQO y la DBO para las concentraciones altas de clorofila indican que son aguas muy contaminadas, dando valores muy elevados que sobrepasan de los rangos permitidos por las normas, y estos valores indican la importancia de una aireación para el tratamiento de aguas, se plantea hacer más análisis para saber si la clorofila aumento estos valores o si al estar el agua estancada tanto tiempo, con aireación y pequeñas cantidades de levadura aumentó estos niveles, lo que mataría a los microorganismos por asfixia, ya que una mayor carga orgánica en una muestra de agua, hace que los microorganismos requieran más oxígeno lo que permite oxidarla y degradarla[17].

Las aguas provenientes del embalse de Guatapé tienen una concentración de clorofila a por debajo del límite de 2,5 mg/m³, lo que indica que están en un estado oligotrófico y son aptas para actividades recreativas [5].

Los niveles de oxígeno disuelto (OD) están en condiciones aceptables, ya que las Daphnias soportan pocas proporciones de OD, por debajo de 6 mg/L, los niveles bajos vistos en la tabla 2 y específicamente en la gráfica 2, donde se centran en los niveles de clorofila bajo, no

afectaron de manera significativa a estos cladóceros, ya que estos pueden sobrevivir con pocas cantidades de OD debido a su capacidad de síntesis de hemoglobina [18].

Los resultados de Turbiedad, DQO, DBO, Nitrógeno y Fósforo total (tabla 3), están relacionados[19] y pueden usarse como indicadores del estado trófico del agua, por lo tanto confirman que el embalse está en un estado oligotrófico, ratificando los resultados que arroja la medición de clorofila por el método espectrofotométrico.

VII. CONCLUSIONES

Lo expuesto anteriormente permite concluir que las concentraciones de Clorofila altas 20 mg/m³ resultan ser inhibitorias para las *Daphnias*, mientras que concentraciones de 15 mg/m³ o menores, generan ambientes aptos para su reproducción, por otro lado, se confirma que no es obligatorio la aireación ya que en ambos experimentos se logra disminuir la concentración de clorofila, pero este si influye si la miramos respecto al tiempo que tarda.

Se adapta satisfactoriamente el protocolo para determinación de clorofila a partir del “Standard Methods for the examination of water and wastewater” y se establecen algunas recomendaciones para su ejecución.

Para culminar se invita a seguir experimentando con estos cladóceros ya que pueden considerarse como una especie promisoría para remediar aguas con niveles eutróficos, debido a su facilidad de multiplicación, resistencia a cambios de temperatura y economía, además de tener como base los resultados donde se evidencia el tratamiento dado al agua.

Se logró conocer y manejar los diferentes ensayos físicoquímicos del laboratorio ambiental, promoviendo las buenas prácticas de laboratorio, las condiciones y disposición de muestras y residuos.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir indagando sobre las pulgas de agua en cuanto a tratamientos en aguas eutrofizadas, sirviendo este proyecto como guía para futuras investigaciones.

En cuanto al protocolo para la determinación de clorofila en aguas, se recomienda utilizar como mínimo 100 mL de muestra, ya que en volúmenes menores no se cuantifica bien este parámetro, además realizar una verificación del método para que se pueda establecer como parámetro en el laboratorio siguiendo todos los criterios de aseguramiento y validez de los resultados.

Se podría aumentar el número de pulgas por experimento y así obtener un mayor logro en cuanto a los objetivos propuestos.

REFERENCIAS

- [1] G. Roldán. P and J. J. Ramírez. R, *Fundamentos de limnología neotropical*, vol. 2. 2008.
- [2] L. Gallego, “Aplicación de metodología para la eutrofización,” pp. 1–19, 2019.
- [3] G. Roldan and M. Correa, “ESTUDIO LIMNOLOGICO DE LA REPRESA EL PEÑOL.” 1984.
- [4] C. DE Grupo Bosques Y Biodiversidad Elsa Maria Acevedo Cifuentes *et al.*, “ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE MANEJO DEL DISTRITO REGIONAL DE MANEJO INTEGRADO EMBALSE PEÑOL-GUATAPÉ Y CUENCA ALTA DEL RÍO GUATAPÉ REALIZACIÓN CORNARE Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los ríos Negro y Nare Grupo Bosques y Biodiversidad,” vol. 4, 2018.
- [5] Minambiente, “Decreto 2811 de 1974,” *D. Of. N°34243*, pp. 1–50, 2010, [Online]. Available: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Normal1.jsp?i=1551>.
- [6] M. Francisco *et al.*, “estructurales y funcionales de las comunidades vegetales y de los recursos pesqueros durante la rehabilitación de la Ciénaga Grande de Santa Marta : INFORME TÉCNICO,” 2014.
- [7] F. E. Benito, ““ Análisis de la clorofila a en el agua a partir de una imagen multispectral Quickbird en la zona costera de Gandia .,”” p. 53, 2010, [Online]. Available: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/9176/Proyecto Final de Carrera - Clorofila a Quickbird.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/9176/Proyecto%20Final%20de%20Carrera%20-%20Clorofila%20a%20Quickbird.pdf).
- [8] M. L. Rojas, N. A. Navarrete, G. Elías, and G. Contreras, “Efecto de jugos vegetales sobre la producción de *Daphnia pulex* (Cladocera: Daphnidae) en condiciones de laboratorio ,” *Revista de Biología Tropical* , vol. 47. scielo , pp. 429–435, 1999.
- [9] L. G. Sonic, “¿Cómo prevenir la proliferación de algas en lagos y embalses? - LG Sonic,” pp. 1–17, 2019, [Online]. Available: <https://www.lgsonic.com/es/como-prevenir-la-proliferacion-de-algas/>.
- [10] Y. Montoya-Moreno and N. Aguirre, “Estado del arte del conocimiento sobre perifiton en Colombia,” *Gestión y Ambient.*, vol. 16, no. 3, pp. 91–117, 2013.
- [11] E. Phenomena, B. Science, M. N. Khan, and S. Arabia, “Eutrophication : Challenges and Solutions,” vol. 17, pp. 1–9, 2014, doi: 10.13140/2.1.3673.8884.
- [12] M. C. Díaz-Báez, Y. P. Granados, and A. Ronco, “Ensayos para agua dulce,” *Ensayos Toxicológicos para la evaluación Sust. químicas en agua y suelo. La Exp. en México*, pp. 17–32, 2008.
- [13] L. Ocampo, M. Botero, and L. Restrepo, “Revista Colombiana de Evaluación del crecimiento de un cultivo de *Daphnia magna*,” *Rev. Colomb. Ciencias Pec.*, vol. 23, no. 4, pp. 78–85, 2010, [Online]. Available: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/8330>.

-
- [14] A. D. Eaton, M. A. H. Franson, A. P. H. Association, and American Water Works Association.; Water Environment Federation, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 2005.
- [15] M. GÁNDARA, R. LEITE, and P. CARABALLO, “Historia de vida de *Daphnia Magna* y *Ceriodaphnia Reticulata* en condiciones de laboratorio: uso potencial como alimento para peces,” *Rev. Colomb. Cienc. Anim. - RECIA*, vol. 5, no. 2, p. 340, 2013, doi: 10.24188/recia.v5.n2.2013.447.
- [16] Organización Mundial de la Salud and Organización Panamericana de la Salud, “Tratamiento de emergencia de agua potable en el lugar de consumo,” *Guía técnica sobre el saneamiento, agua y salud*, no. 5, pp. 1–4, 2009.
- [17] S. Oikawa, M. Tsuda, Y. Okamura, and T. Urabe, “Prefulvene as a Stable Intermediate at the Potential Energy Surface Minimum of the Benzene \rightleftharpoons Benzvalene Isomerization Process,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, no. 22, pp. 6751–6755, 1984, doi: 10.1021/ja00334a047.
- [18] M. Martinez, *ALTERACIONES FISIOLÓGICAS COMO CONSECUENCIA DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN SUCESIVAS GENERACIONES DE *Daphnia Magna**. 2006.
- [19] F. Fontúrbel Rada, “Indicadores Físicoquímicos Y Biológicos Del Proceso De Eutrofización Del Lago Titikaka (Bolivia),” *Ecol. Apl.*, vol. 4, no. 1–2, p. 135, 2016, doi: 10.21704/rea.v4i1-2.308.

ANEXOS

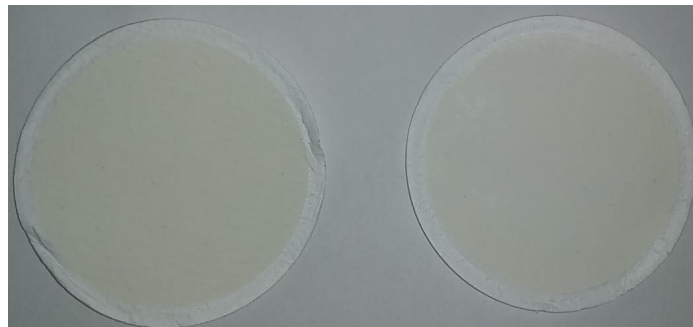
Anexo A. Resultados del seguimiento del protocolo para la determinación de clorofila.

Fecha analisis	Determinación de clorofila en presencia de feofitin			Clorofila metodo tricromatico		
	Codigo Muestra	Clorofila a en presencia de Feofitin (mg/m ³)	Feofitin a (mg/m ³)	Ca (mg/m3)	Cb (mg/m3)	Cc (mg/m3)
29/09/2022	[] alta sin aireación	13	13	19	22	70
29/09/2022	[] alta con airiación	16	10	20	27	76
29/09/2022	[] baja sin aireación	16	1	15	29	31
29/09/2022	[] baja con aireación	17	2	16	28	40
3/10/2022	[] baja sin aireación	9	4	11	13	20
3/10/2022	[] baja con aireación	7	1	7	6	10
6/10/2022	[] baja sin aireación	5	0	4	7	8
6/10/2022	[] baja con aireación	0	6	4	3	4
10/10/2022	1445-Guatapé	1	-1	0	0	0
10/10/2022	1445-Guatapé (Duplicado)	1	1	1	0	1

Anexo B. Imágenes que complementan el desarrollo de la práctica, filtros de fibra de vidrio, proceso de centrifugación y sedimentación.



Anexo C. Filtros de fibra de vidrio luego de pasar el agua proveniente del embalse de Guatapé



Anexo D. *Daphnia pulex* vista desde otro ángulo, microscopio aumento 4X.

