

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE AGUAS
CONTAMINADAS TRATADAS MEDIANTE PROCESOS
DE OXIDACIÓN AVANZADA**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Iván Devesa Aranguren

**TUTOR/A: Consuelo Sabater Marco
COTUTOR/A: M^a Ángeles Castillo López**

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, Junio 2019



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL

Ficha resumen del Trabajo Fin
de Grado

Datos personales

Nombre y apellidos: **Iván Devesa Aranguren**

Datos del trabajo de fin de carrera

Título del TFG:	Evaluación ecotoxicológica de aguas contaminadas tratadas mediante procesos de oxidación avanzada.	
Lugar de realización:	Departamento Biotecnología (ETSIAMN)	Fecha: Junio 2019
Titulación:	Grado en Biotecnología	
Especialidad:	Toxicología ambiental	
Director/a:	Consuelo Sabater Marco	
Codirector/a:	M ^a Ángeles Castillo López	

Resumen

En los últimos años, ha aumentado la preocupación por el creciente número de compuestos tóxicos detectados en el medio ambiente, por ello, se ha instaurado una legislación con el fin de proteger los ambientes acuáticos, destacando en Europa la Directiva Marco del Agua (DMA), aprobada por el Parlamento Europeo en el año 2000. Desde entonces ha ido recibiendo revisiones con el objetivo de actualizar las sustancias prioritarias y su análisis para establecer unas normas de calidad ambiental.

No obstante, siguen saliendo al mercado nuevos compuestos químicos cada año y hay otros que, pese a estar presentes desde hace mucho tiempo, se ha detectado su presencia recientemente en el medio por el continuo avance de las técnicas analíticas. Estos son los llamados contaminantes emergentes o microcontaminantes, que debido a su falta de regulación en la legislación actual y al desconocimiento de sus efectos a corto y largo plazo sobre el ambiente y los organismos que lo pueblan, se han convertido en una prioridad para los investigadores. Estos compuestos son incorporados al medio ambiente por la actividad industrial, agrícola y por efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, donde, en muchos casos, no se consigue una eliminación completa de los mismos. Es por ello que se están desarrollando nuevas tecnologías para conseguir una completa eliminación de este tipo de sustancias como los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs). Estos procesos se clasifican en dos grandes grupos, en función de cómo se generan los radicales hidroxilo, es decir, por medios fotoquímicos o medios no fotoquímicos, como la ozonización.

Además de evaluar la eficacia de estos tratamientos a nivel de su degradabilidad, se hace necesario determinar la toxicidad real de las muestras tratadas y sus potenciales efectos en el medio ambiente, ya que los contaminantes originales pueden convertirse en subproductos de toxicidad desconocida. En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo considerable para desarrollar procedimientos y protocolos para la realización de bioensayos o test de toxicidad con diferentes especies de organismos de diferentes niveles en la escala de organización biológica. De manera que, gracias a ellos, es posible determinar la eficacia de los tratamientos de las aguas tratadas desde un punto de vista ecotoxicológico y su posible impacto en el medio ambiente.

En este trabajo de investigación, aguas simuladas y naturales artificialmente contaminadas con cuatro microcontaminantes presentes en la Directiva 2013/39/CE, diclofenaco, pentaclorofenol, terbutrina y clorfenvinfos, y sometidas a POAs (Foto-Fenton y ozonización) van a ser evaluadas mediante la realización de una batería de bioensayos que representen varios niveles tróficos del medio, como son la bacteria marina luminiscente *Aliivibrio fischeri*, el alga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata*, el invertebrado *Daphnia magna* y la lombriz de tierra *Eisenia fetida*, organismo modelo para la toxicidad del suelo.

Palabras clave

Microcontaminantes; procesos de oxidación avanzada; batería de ensayos; ecotoxicidad

Abstract

In the recent years, concern has been raised about the increasing number of toxic compounds detected in the environment. Therefore, legislation has been introduced to protect the aquatic environments, highlighting in Europe the Water Framework Directive (WFD), approved by the European Parliament in the year 2000. Since then it has received several reviews with the aim of updating the most important substances and their analysis to establish environmental quality standards.

However, new chemical compounds continue to be released every year and there are others that, despite being present for a long time, have recently been detected in the environment due to the continuous advance of analytical techniques. These are the so-called emerging pollutants or micropollutants, which due to their lack of regulation in the current legislation and the ignorance of their short and long term effects on the environment and the organisms that populate it, have become a priority for researchers. These compounds are incorporated into the environment by industrial, agricultural and effluent activity of sewage treatment plants, where, in many cases, a complete elimination of them is not achieved. That is why new technologies are being developed to achieve a complete elimination of this type of substances, such as Advanced Oxidation Processes (POAs). These processes are classified into two large groups, depending on how the hydroxyl radicals are generated, that is, by photochemical means or non-photochemical means, such as ozonation.

In addition to evaluating the effectiveness of these treatments in terms of their degradability, it is necessary to determine the real toxicity of the treated samples and their potential effects on the environment, since the original contaminants can become by-products of unknown toxicity.

In the recent years, a considerable effort has been made to develop procedures and protocols for carrying out bioassays or toxicity tests with different species of organisms of different levels in the scale of biological organization. Thanks to them, it is possible to determine the effectiveness of the treatment of treated water from an ecotoxicological point of view and its possible impact on the environment.

In this research paper, simulated and natural waters artificially contaminated with four micropollutants present in the 2013/39 / EC Directive, diclofenac, pentachlorophenol, terbutrine and chlorfenvinfos, and subjected to Advanced Oxidation Processes (Photo-Fenton and ozonation) are going to be evaluated by performing a battery of bioassays that represent several trophic levels of the medium, such as the luminescent marine bacterium *Aliivibrio fischeri*, the unicellular freshwater algae *Pseudokirchneriella subcapitata*, the invertebrate *Daphnia magna* and the earthworm *Eisenia fetida*, a model organism for the toxicity of the soil.

Micropollutants; advanced oxidation processes; test batteries; ecotoxicity

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Problemas asociados a la presencia de microcontaminantes en el agua.....	1
1.2.	Tratamientos de oxidación avanzada	2
1.3.	Microcontaminantes de estudio que se encuentran en la lista prioritaria de la Directiva 2013/39/CE	4
1.3.1.	Clorfenvinfos.....	4
1.3.2.	Diclofenaco	4
1.3.3.	Pentaclorofenol.....	5
1.3.4.	Terbutrina	5
1.4.	Necesidad de la utilización de ensayos de toxicidad para evaluar la calidad de las aguas	6
1.5.	Organismos utilizados en los ensayos de toxicidad.....	8
1.5.1.	Bacterias.....	8
1.5.2.	Microalgas.....	8
1.5.3.	Microcrustáceos.....	9
1.5.4.	Lombrices de tierra.....	10
2.	OBJETIVOS	11
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1.	Muestras	11
3.1.1.	Muestras tratadas mediante foto-Fenton	11
3.1.2.	Muestras tratadas mediante ozonización	12
3.2.	Ensayos de toxicidad.....	12
3.2.1.	Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria marina <i>Aliivibrio fischeri</i>	12
3.2.2.	Ensayo de toxicidad aguda con la microalga <i>Pseudokirchneriella subcapita</i> .	13
3.2.3.	Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros <i>Daphnia magna</i>	14
3.2.4.	Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra <i>Eisenia fetida</i>	14
3.3.	Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad	15
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1.	Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria marina <i>Aliivibrio fischeri</i>	15
4.1.1.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton.....	15
4.1.2.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización.....	16
4.2.	Ensayo de toxicidad aguda con la microalga <i>Pseudokirchneriella subcapita</i>	18
4.2.1.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton.....	18
4.2.2.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización.....	20

4.3.	Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros <i>Daphnia magna</i>	24
4.3.1.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton.....	24
4.3.2.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización.....	26
4.4.	Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra <i>Eisenia fetida</i>	29
4.4.1.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton.....	29
4.4.2.	Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización.....	30
5.	CONCLUSIONES	34
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUCCIÓN

Un desarrollo industrial acelerado lleva consigo un rápido crecimiento poblacional, provocando cambios en los estilos de vida e incrementando la generación de residuos y emisión de contaminantes hacia los diferentes compartimentos ambientales, especialmente, el acuático (Staniskiene et al., 2006; Jha, 2008). La contaminación de estos ambientes puede estar provocando efectos negativos sobre la vida acuática directa e indirectamente, sobre la salud humana (Jha, 2008), ya que muchos contaminantes pasan a formar parte del agua que bebemos o de los alimentos que ingerimos (Buttiglieri et al., 2008).

Con el aumento de la población y la disminución de la disponibilidad de recursos de agua dulce, la calidad de estas fuentes ha sido una gran preocupación, tanto para el público, en general, como para los profesionales de la Salud Pública.

La reciente aparición de contaminantes emergentes en el medio ambiente acuático, incluidas aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas y agua potable, está surgiendo como un nuevo desafío para la comunidad científica. Estos compuestos son incorporados al medio ambiente por la actividad industrial, agrícola y por efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, donde, en muchos casos, no se consigue una eliminación completa de los mismos (Luo et al., 2014). Es por ello que se están desarrollando nuevas tecnologías para conseguir una completa eliminación de este tipo de sustancias como los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs).

Ante un escenario tan complejo, donde están presentes mezclas de contaminantes, además, se hace necesario realizar una evaluación de la calidad del medio ambiente, en especial del acuático (Escher et al., 2014). Una herramienta útil para el diagnóstico de la calidad de las aguas son los bioensayos de toxicidad, que permiten determinar el efecto de los contaminantes sobre los organismos de ensayo, y estimar, de esta manera, el impacto que pueden tener sobre el medio ambiente. Los ensayos biológicos se basan en la evaluación de las variaciones que sufren los organismos de prueba, como consecuencia, de la exposición de los mismos con el tóxico a estudiar, en un determinado periodo de tiempo y bajo unas condiciones experimentales específicas y controladas.

1.1. Problemas asociados a la presencia de microcontaminantes en el agua

Durante 20 años, la comunidad científica ha informado sobre la presencia, en diversos ambientes acuáticos de nuevos compuestos llamados "contaminantes emergentes". La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) define los contaminantes emergentes como nuevos productos químicos sin estatus regulatorio y cuyo impacto en el medio ambiente y la salud humana no se conocen bien (Deblonde et al., 2011).

Los microcontaminantes o contaminantes emergentes son compuestos con diferente origen y naturaleza química; entran al medio ambiente a través de diferentes fuentes, como efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, actividades ganaderas y agrícolas, tanques sépticos y aguas residuales de tipo doméstico e industrial. Se agrupan en diferentes compuestos químicos, agentes tensoactivos, productos de higiene personal, plastificantes, aditivos industriales y productos farmacéuticos (Barcelo & Petrovic, 2008). Muchos de estos compuestos presentan actividad disruptora endocrina, produciendo problemas hormonales en un gran número de organismos (Jurado et al., 2012). Tienen efectos perjudiciales sobre el desarrollo, el

crecimiento, la reproducción y el comportamiento de los seres vivos, es decir, alteran la función normal de tejidos y órganos (Jugan et al., 2009). Los disruptores endocrinos se comportan como hormonas alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, es decir, producen un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos u hormonas tiroideas. La mayoría de los xenobióticos identificados se comportan como estrógenos, es decir, interfieren con la hormona femenina estradiol (Olea et al., 2001). Estos compuestos pueden ser excretados por organismos vivos, en particular en la orina de mamíferos, o pueden originarse a partir de la industria, la ganadería o la agricultura, entre otras prácticas (Jugan et al., 2009).

Estos contaminantes se caracterizan porque son previamente desconocidos o no reconocidos, su presencia en el medio ambiente no tiene por qué ser nueva, pero sí la preocupación por sus posibles consecuencias. Se sabe poco respecto a su presencia y su impacto, de ahí que, no existan métodos de detección; además, son compuestos de elevada producción y consumo, por ello su introducción al medio ambiente es continua (Olea et al., 2001).

Su presencia, por lo tanto, ha pasado inadvertida, causando problemas ambientales y para la salud humana. El principal problema asociado a su aparición en el medio ambiente es la falta de información sobre los efectos secundarios en la matriz receptora (Schwarzenbach et al., 2006). Toxicológicamente, la mayoría de las sustancias que han sido evaluadas por sus riesgos, se han dirigido a través de investigaciones de un solo compuesto, cuando la realidad difiere significativamente (Gregorio & Chèvre, 2014), ya que, los diferentes compartimentos ambientales contienen una mezcla de un gran número de compuestos, que pueden reaccionar entre sí, afectando su modo de acción (Backhaus et al., 2003). Existen numerosos estudios afirmando que los contaminantes que no tuvieron un efecto significativo en las especies de forma aislada muestran propiedades nocivas cuando se encuentran en mezclas (Junghans et al., 2006).

Aunque la mayoría de los contaminantes emergentes están presentes en bajas concentraciones, muchos de ellos plantean considerables problemas toxicológicos, particularmente cuando están presentes como componentes de mezclas complejas. Dada la incapacidad de las EDARs para la completa eliminación de estos contaminantes, será necesario abordar los problemas de calidad del agua, en primer lugar, mediante el desarrollo y perfeccionamiento de herramientas para evaluar el impacto de estos contaminantes en la vida acuática y la salud humana y, en segundo lugar, se deben explorar e implementar tecnologías de remediación y tratamiento de aguas que sean apropiadas y rentables (Schwarzenbach et al., 2006).

1.2. Tratamientos de oxidación avanzada

La contaminación ambiental es un tema reconocido de gran preocupación, ya que, se ha encontrado una amplia gama de contaminantes en el medio ambiente acuático, a niveles de ng/L a µg/L. En el año 2000, se definió una estrategia para identificar las sustancias prioritarias relacionadas con los ecosistemas acuáticos, seguida de la definición de estándares de calidad ambiental (EQS) en 2008. En 2013 se lanzó la Directiva 2013/39 / UE que actualiza la política marco del agua, destacando la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías de tratamiento de agua para afrontar este problema (Ribeiro et al., 2015).

Las aguas residuales han sido tradicionalmente tratadas por métodos convencionales. Sin embargo, la efectividad de estos procesos se está viendo seriamente limitada en los últimos años, principalmente, por restricciones cada vez más severas. Estas restricciones son debidas al

mayor conocimiento del impacto de los contaminantes en el ambiente, la disminución de la disponibilidad de agua fresca, y al aumento de la demanda tanto humana como industrial, lo que implica mayores caudales de agua residual a tratar (Forero et al., 2005).

Debido a la naturaleza recalcitrante de muchos microcontaminantes, los métodos de tratamiento biológico y fisicoquímico existentes han demostrado ser incapaces de degradarlos de manera eficiente en las EDARs (Luo et al., 2014). Hoy en día, existe una preocupación mundial, cada vez mayor, por el desarrollo de tecnologías alternativas de reutilización del agua centradas, principalmente, en la agricultura y la industria. En este contexto, los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) se consideran una tecnología de tratamiento de agua altamente competitiva para la eliminación de aquellos contaminantes orgánicos que no se pueden tratar con técnicas convencionales debido a su alta estabilidad química y/o baja biodegradabilidad (Oller et al., 2011).

Los POAs constituyen métodos prometedores, eficientes y respetuosos con el medio ambiente, desarrollados para eliminar principalmente los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) de las aguas residuales. En general, los POAs se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes debido a que involucran la generación y el uso *in situ* de especies transitorias con un elevado poder oxidante ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$) como el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), obtenido en una concentración suficiente para la mineralización total de los compuestos contaminantes orgánicos y organometálicos en CO_2 , agua e iones inorgánicos. Aunque el radical hidroxilo es el principal agente oxidante en estos procesos, su aplicación, a menudo, induce la producción y participación de otras especies reactivas de oxígeno (ROS), como los aniones radicales superóxido, radicales hidroperóxido, oxígeno singlete y triplete, etc. (Ikehata et al., 2007).

Los POAs, generalmente, involucran agentes químicos (metales, ozono o peróxido de hidrógeno) y una fuente de energía auxiliar, como la luz UV o visible, la corriente, el ultrasonido o la irradiación (Oppenländer, 2007). Algunos POAs recurren, además, a reductores químicos que permiten realizar transformaciones en contaminantes tóxicos poco susceptibles a la oxidación, como iones metálicos o compuestos halogenados.

En los POAs es de gran importancia el abordaje de valores óptimos para los diferentes parámetros que afectan el proceso de oxidación: pH, temperatura, diseño del reactor, naturaleza y concentración del contaminante y agentes oxidantes que puedan mejorar la reacción. Algunos ejemplos de POAs son: ozonización, Fenton (foto-Fenton, electro-Fenton, etc.), fotocatalisis heterogénea ($\text{TiO}_2/h\nu$), γ -radiólisis, basados en ultrasonidos (sonólisis, Fenton soportado por ultrasonido, etc.).

Respecto a los métodos tradicionales, los POAs tienen una serie de ventajas como la transformación y destrucción química del contaminante hasta la mineralización; no generan subproductos que requieran posterior procesamiento; debido a su reactividad con la mayoría de compuestos orgánicos, son muy útiles para contaminantes recalcitrantes que resisten otros métodos de tratamiento, principalmente el biológico; operan en niveles donde los sistemas convencionales no son factibles. Una adecuada depuración requiere la combinación de los tratamientos de oxidación avanzada, eficaces en la degradación de compuestos tóxicos de baja concentración, con tratamientos convencionales, capaces de eliminar la materia orgánica biodegradable.

1.3. Microcontaminantes de estudio que se encuentran en la lista prioritaria de la Directiva 2013/39/CE

La directriz actual ([Directiva 2013/39/CE](#)) de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas se basa en la detección de contaminantes específicos incluidos en una lista de contaminantes orgánicos prioritarios, en los que se incluyen, por ejemplo, el uso de agentes anti-incrustantes como el diurón o el TBT, utilizado para controlar el crecimiento de organismos marinos. Muchos plaguicidas diseñados para el control de las malas hierbas, hongos u organismos invertebrados, son otros químicos incluidos en esta lista debido a sus efectos tóxicos conocidos.

Además de los contaminantes orgánicos prioritarios, en los últimos años, los informes sobre residuos de productos farmacéuticos en ecosistemas acuáticos han aumentado, sin embargo, todavía hay una falta considerable de datos sobre sus efectos en la vida acuática (Ginebreda et al, 2009).

1.3.1. Clorfenvinfos

Clorfenvinfos (Figura 1) es un insecticida organofosforado, utilizado para controlar plagas de insectos en el ganado. También se usaba para controlar plagas domésticas como moscas, pulgas y ácaros. Su uso ha sido prohibido en la Unión Europea (como producto fitosanitario) y en los Estados Unidos, mientras que en Suiza se permite el uso de la marca Birlane para cultivos y ciertos vegetales (Azab et al., 2016).

La toxicidad de este compuesto se debe a la inhibición de la acetilcolinesterasa, causando una acumulación de acetilcolina en las conexiones neuroglandulares y en el Sistema Nervioso Central, generando una hiperexcitación de los receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos, causando diferentes síntomas según la parte afectada. Se desconoce si este compuesto es cancerígeno para los humanos (Roselló-Marquez et al., 2019). El Departamento de Salud y la Agencia de Protección Ambiental Humana no ha clasificado este compuesto en términos de su carcinogenicidad (Oliveira et al.,2014).

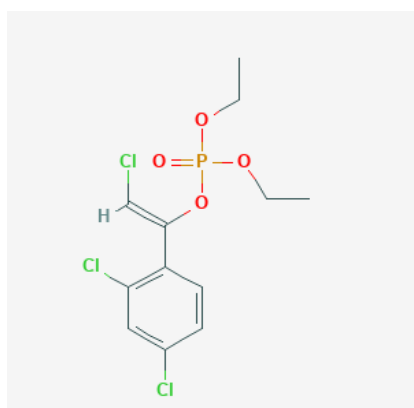


Figura 1. Estructura química del clorfenvinfos (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)

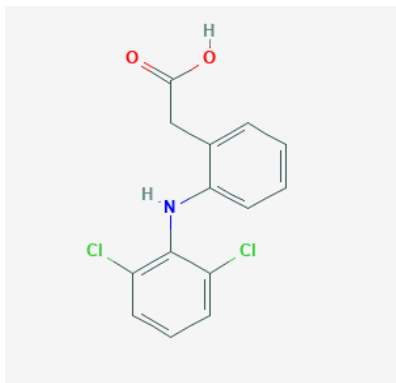
1.3.2. Diclofenaco

Diclofenaco (DCF) (Figura 2) es un fármaco con actividad antiinflamatoria de uso extendido en todo el mundo. El DCF junto con el ibuprofeno y la propifenazona representan los antiinflamatorios no esteroideos más utilizados (Dolezalová et al., 2018).

Investigaciones realizadas en las últimas décadas han confirmado la ubicuidad global de DCF en varios compartimentos ambientales, como el suelo y el agua. Su frecuente aparición en ambientes de agua dulce y su potencial toxicidad para varios organismos, como los peces y los mejillones, hacen del DCF un contaminante ambiental emergente (Lonappan et al., 2016). Se

sabe que el DCF ejerce efectos mortales al dañar el tejido renal y gastrointestinal en varios vertebrados (Lee et al., 2011).

Una gran cantidad de las revisiones publicadas han analizado el destino del diclofenaco en las EDARs. En un estudio realizado, se ha obtenido una eliminación de, aproximadamente, 30 a 70% a través del sistema de tratamiento convencional en una planta de tratamiento de aguas



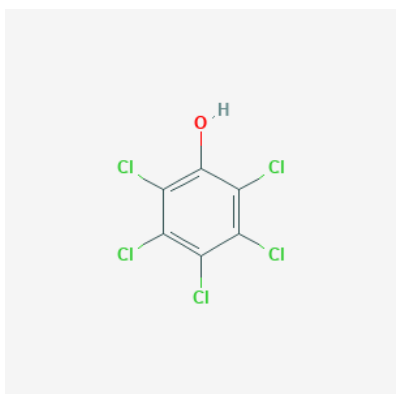
residuales, siendo el principal sumidero primario. Por lo tanto, el DCF no tratado puede pasar al agua superficial e interactuar con otros contaminantes inorgánicos en el ambiente, como metales, contaminantes orgánicos e incluso, con los metabolitos del DCF (Vieno & Sillanpää, 2014).

Figura 2. Estructura química del diclofenaco (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)

1.3.3. Pentaclorofenol

Pentaclorofenol (PCP) (Figura 3) es un biocida destinado a una gran variedad de propósitos en el pasado. Actualmente se utiliza como conservante de madera en los Estados Unidos. El PCP se usó en grandes cantidades para matar caracoles, huéspedes intermediarios del *Schistosoma* en China, lo que resultó en un residuo de PCP ubicuo en el medio ambiente. Tras un estudio, se demostró que la población expuesta a un alto nivel de PCP exhibía un mayor riesgo de sufrir cáncer (Cui et al., 2017).

El pentaclorofenol desacopla la fosforilación oxidativa, que interfiere con la respiración celular produciendo un aumento notable del metabolismo (Verbrugge et al., 2018). Los peces expuestos



a concentraciones de PCP, ambientalmente relevantes durante 28 días, mostraron cambios en los niveles de hormonas esteroideas en plasma, inhibición de la espermatogénesis en peces machos y degeneración de ovarios en peces hembras (Yang et al., 2017).

Figura 3. Estructura química del pentaclorofenol (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)

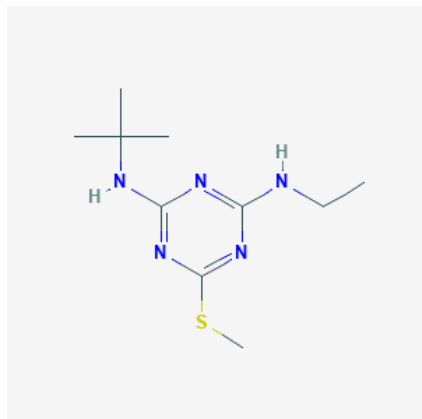
1.3.4. Terbutrina

Terbutrina (Figura 4) es un biocida de uso general en materiales de construcción. Éste se filtra fuera del material cuando se pone en contacto con el agua de lluvia; por lo tanto, llega a las aguas superficiales donde puede tener efectos adversos sobre los organismos acuáticos. También se han utilizado grandes volúmenes de terbutrina como herbicida acuático ya que controla las algas, sumergidas y de flotación libre, en cursos de agua y reservorios (Frías et al., 2004); y como herbicida selectivo útil para la mayoría de las gramíneas y malezas de hoja ancha

de diversos cultivos, como cereales, frijoles y árboles frutales en entornos agrícolas (Velisek et al., 2011).

La terbutrina se adsorbe fácilmente en suelos con alto contenido orgánico o arcilloso y no es volátil, por lo tanto, se adsorbe a partículas suspendidas y sedimentos (Lehotay 2006).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha clasificado la terbutrina como un posible carcinógeno humano.



Según el documento de directrices para el agua potable en Australia (estrategia nacional de gestión de calidad del agua), la ingesta de terbutrina en animales puede causar hiperplasia folicular, adenomas hepáticos y pérdida de peso corporal. Además, se ha informado de que exhibe genotoxicidad en leucocitos humanos recién aislados (Villarini et al., 2000).

Figura 4. Estructura química de la terbutrina (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)

1.4. Necesidad de la utilización de ensayos de toxicidad para evaluar la calidad de las aguas

La calidad química estándar de los efluentes se ha basado tradicionalmente en el control de parámetros globales como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) o el sólido suspendido total (SST) de acuerdo con la Directiva de Tratamiento de Residuos 91/271/EEC.

Para el seguimiento de los contaminantes orgánicos prioritarios en los distintos compartimentos ambientales y, para evaluar y mantener la calidad de las aguas superficiales se han desarrollado distintos métodos analíticos como la cromatografía de gases o líquidos acoplados a la espectrometría de masas. Sin embargo, el control de calidad de las aguas residuales basado en medidas químicas globales de la carga de contaminación orgánica total, como el carbono orgánico total (TOC) o la detección de contaminantes específicos, no es suficiente para evaluar el riesgo ambiental. Estas medidas no reflejan los efectos de la toxicidad en el ecosistema acuático porque la toxicidad es una respuesta biológica. Por lo tanto, se necesitan herramientas efectivas para la evaluación de los efectos negativos sobre los organismos vivos. El uso de ensayos biológicos puede proporcionar una medida directa y apropiada de toxicidad para complementar las medidas físico-químicas de la calidad de las aguas residuales (Hernando et al., 2006).

Así, para la determinación de contaminantes en mezclas complejas de composición desconocida, el enfoque basado en la toxicidad, generalmente, se reconoce como el mejor método para evaluar una toxicidad potencial. Por lo tanto, la contaminación se puede estimar utilizando dos enfoques: un enfoque de especificidad química y un enfoque basado en la toxicidad. En el primer caso, se realizan análisis químicos y los resultados se comparan con los valores umbral. En el segundo caso, la toxicidad se mide directamente mediante pruebas biológicas. En contraste con los métodos físicos o químicos comunes, un bioensayo da como resultado información detallada sobre la actividad biológica de una sustancia. Durante la última

década, los ensayos biológicos y el análisis bioestadístico se han vuelto más importantes para controlar de manera efectiva el estado de toxicidad de los efluentes (Hernando et al., 2004; Pandard et al., 2006).

La principal ventaja de realizar bioensayos es su carácter integrador, ya que, integran los efectos de todos los contaminantes, incluidos los efectos aditivos, sinérgicos y antagonísticos, o aquellos no considerados o detectados por análisis químicos, proporcionando información valiosa sobre la fracción biodisponible de los contaminantes (Hernando et al., 2005).

Los bioensayos ecotoxicológicos evalúan la toxicidad de los productos químicos o muestras ambientales con modelos biológicos estándar, integrando los efectos de los factores de estrés físicos, químicos y biológicos en los ecosistemas acuáticos y terrestres. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades (Rotini et al., 2017a).

Por lo tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o biocenosis y, dependerá, tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración. Según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo, los ensayos pueden ser de tipo agudo o crónico. En los primeros se utilizan dosis altas de la sustancia a analizar y tiempos de exposición cortos (24-96 horas), permitiendo valorar la toxicidad del compuesto, así como hacer estudios comparativos. Por el contrario, los ensayos de toxicidad crónica evalúan parámetros relacionados con el ciclo de vida, crecimiento y reproducción. Para ello se emplean dosis bajas del compuesto y tiempos largos de exposición (Castillo, 2004).

El potencial nocivo de una sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, etc. Por tanto, la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico. Además, se debe considerar que el efecto tóxico sobre los sistemas biológicos es ejercido por la acción combinada de todas las sustancias nocivas presentes en el medio, incluso aquellas que no son tóxicas en sí, pero que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema, y consecuentemente las condiciones de vida de los organismos. En los sistemas acuáticos es característico el caso de sustancias que agotan el oxígeno, o que son coloreadas, o que simplemente impiden la propagación de la luz (caso de material particulado) (Castillo, 2004).

Debido a la complejidad de los ecosistemas, las evaluaciones de riesgo ecotoxicológico deben considerar una batería de bioensayos que involucran organismos de diferentes niveles tróficos. Los ensayos de toxicidad en animales de laboratorio pueden ser costosos, consumir mucho tiempo y ser éticamente cuestionables. El impulso para limitar las pruebas con animales y desarrollar enfoques alternativos (por ejemplo, sobre bacterias y animales no vertebrados) es ahora un tema fundamental, como se informa en el marco de la legislación europea actual, incluida la Directiva de protección animal de la UE, la 7ª enmienda de Directiva de cosméticos de la UE y REACH (Reglamento de registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas).

1.5. Organismos utilizados en los ensayos de toxicidad

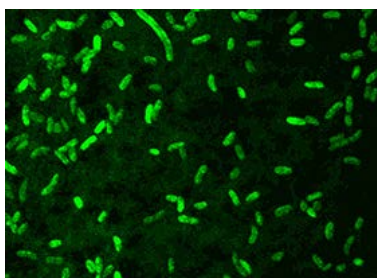
Es importante llevar a cabo bioensayos de toxicidad con diversos organismos, ya que responden de manera distinta a las sustancias tóxicas (Dalzell et al., 2002). Los organismos seleccionados para una batería de ensayos en estudios ecotoxicológicos deben pertenecer a especies de diferentes niveles tróficos, incluidos consumidores (protozoos, crustáceos, peces), productores primarios (algas) y descomponedores (bacterias).

1.5.1. Bacterias

Las bacterias son un componente importante del ecosistema, y las alteraciones de la comunidad microbiana pueden tener un efecto significativo sobre el ciclo biogeoquímico y las redes alimenticias. Las pruebas de toxicidad basadas en microorganismos son ampliamente utilizadas porque son relativamente rápidas, reproducibles, baratas y no están asociadas con problemas éticos (Parvez et al., 2006).

Aliivibrio fischeri (Figura 5) es una bacteria marina luminiscente, gram-negativa, anaerobia facultativa. En condiciones ambientales favorables estas bacterias emiten luz naturalmente, requiriendo para ello, concentraciones de oxígeno superiores a 0,5 mg/L. El ensayo se basa en la medición de la luminiscencia emitida por las bacterias después de su exposición a una muestra por un período de 5 a 30 minutos. La intensidad de la luz emitida por las bacterias expuestas se compara con la emitida por bacterias que permanecen en condiciones óptimas (controles). Ante la presencia de sustancias tóxicas, la luminiscencia de *A. fischeri* disminuye de forma proporcional a la carga tóxica en la muestra problema. Esta disminución de la luminiscencia se produce como resultado del daño ocasionado a los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana. Este ensayo es aplicable en estudios de toxicidad acuática; control legal de descargas agrícolas, industriales y municipales; evaluación de procesos de tratamiento y estudios integrales de contaminación, donde para el análisis de toxicidad se requiere manejar una concentración inicial de la muestra del 100%. Este método puede emplearse también para el análisis de extractos orgánicos y lixiviados de suelos y sedimentos o sustancias puras líquidas y sólidos solubles (Pica y Trujillo, 2005).

En 2017, en el Instituto de Protección e Investigación Ambiental de Roma, se llevó a cabo un nuevo bioensayo agudo con la bacteria marina *Vibrio anguillarum* para evaluar los efectos



tóxicos de CuSO_4 , un tóxico de referencia, demostrando una clara relación dosis-respuesta. La bacteria marina *V. anguillarum* fue elegida como un organismo modelo porque es halotolerante, ubicua y representativa de los ecosistemas marinos (Rotini et al., 2017b).

Figura 5. Células de la bacteria *Aliivibrio fischeri*

1.5.2. Microalgas

Dentro de las ventajas del uso de microalgas en bioensayos de toxicidad se encuentra la sensibilidad relativa de estos organismos a contaminantes, se consideran coste-efectivos y son, en general, más fáciles de mantener en condiciones experimentales de laboratorio comparado con otras especies de organismos. Debido a su rápido ciclo de división celular, las respuestas de

toxicidad aguda pueden ocurrir a las pocas horas de exposición, y las respuestas subletales de toxicidad crónica se puede medir también dentro de un periodo bastante corto (días). Las respuestas de las microalgas representan a una población, no sólo a células individuales, lo que permite observar las respuestas de diferentes generaciones (Huovinen y Gómez, 2001).

Para la estimación del crecimiento o la biomasa, se pueden medir diferentes variables, como son la densidad de células (con microscopio o contador de partículas), la cantidad de clorofila (con métodos de extracción), la densidad óptica (usando espectrofotómetros), la fotosíntesis (basada en la asimilación de ^{14}C) o la fluorescencia *in vivo*. Es necesario considerar que las diferentes respuestas de las microalgas dependen de su sensibilidad a los contaminantes y, además, de la condición fisiológica del cultivo que puede afectar al tamaño celular o a la cantidad de clorofila por célula (Huovinen y Gómez, 2001)

Katsutama et al. (2017) realizaron la validación de un bioensayo de algas utilizando la fluorescencia retardada para determinar la toxicidad química del 3,5-diclorofeno. Los resultados sugirieron la utilización de la fluorescencia retardada como una medida de la biomasa fotosintéticamente activa en las pruebas de inhibición del crecimiento de algas, estimando, de una manera más rápida y eficaz, los efectos tóxicos.

Una especie muy utilizada en ensayos de toxicidad es *Pseudokirchneriella subcapitata* (Figura 6). Se trata de un alga unicelular, presente en diferentes medios acuáticos y representativa de sistemas acuáticos de agua dulce, oligotróficos y eutróficos. Su uso extendido en ensayos de



toxicidad se debe a que presenta una gran facilidad de cultivo, rápido crecimiento y una gran sensibilidad a las condiciones ambientales, variando su tamaño y desarrollo. Además, se utilizan pocas cantidades de reactivos y se requiere poco espacio, pudiendo llevar a cabo experimentos de bajo coste.

Figura 6. Células de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

1.5.3. Microcrustáceos

Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género *Daphnia* (Figura 7) son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en ensayos de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen en el interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías,



han hecho, que este grupo sea adecuado para la evaluación de la toxicidad, de carácter universal. Como se puede observar en la Figura 7, la distancia entre la cabeza y la base de la espina dorsal de la cola marcada por la línea roja se utiliza para medir el tamaño del animal (Cambroner et al., 2018).

Figura 7. Hembra adulta de *Daphnia magna* con huevos partenogenéticos en la cámara de cría.

Los ensayos de toxicidad con *D. magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de sedimentos, entre otros (Castillo, 2004).

La especie *Ceriodaphnia dubia* es considerada como uno de las más sensibles, especialmente en relación con el deterioro de la reproducción. El trabajo realizado por Gosset et al. (2018) estudia la reproducción de *C. dubia* para evaluar la ecotoxicidad a largo plazo de mezclas complejas. En este trabajo no se observaron efectos adversos para la primera generación expuesta, pero se obtuvo un aumento de la mortalidad y un trastorno de la reproducción en la segunda y tercera generación.

1.5.4. Lombrices de tierra

Las lombrices de tierra son un grupo fundamental de la fauna del suelo, ya que constituyen gran parte de la biomasa animal edáfica en varios ecosistemas, tanto en zonas templadas como tropicales. Asimismo, desempeñan un papel ecológico primordial por su influencia en la descomposición de la materia orgánica, el desarrollo de la estructura del suelo y el ciclo de los nutrientes (Ríos, 2005).

Las especies más empleadas en ensayos de toxicidad son *Eisenia fetida* (Figura 8) y *Eisenia andrei*, aunque ecológicamente no son muy relevantes en el medio ambiente, su uso tan extendido se debe a su carácter cosmopolita y a un amplio margen de adaptación a las condiciones de cultivo, manejo sencillo, ciclos de vida cortos y facilidad de obtención (Domínguez, 2005).

Los bioensayos con lombrices se utilizan, frecuentemente, para evaluar la toxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos (mezclas complejas de compuestos como el petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos) y metales (Salanitro, 1997; Meier et al., 1997, Calisi et al., 2013).

Kim et al. (2017) describen un interesante ensayo con lombrices de tierra denominado ensayo de dispersión, simple y rápido para las evaluaciones de la calidad del suelo *in situ*. En este bioensayo, los recipientes que contenían un suelo de referencia se insertaron en el sitio objeto de estudio, dejando a las lombrices, de acuerdo con su preferencia, dispersarse en el suelo circundante. Hubo individuos que no salieron de los tubos, otros se dispersaron y otros murieron.



Figura 8. Individuo adulto de *Eisenia fetida*.

2. OBJETIVOS

Como consecuencia de los efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana, provocados por los contaminantes emergentes presentes en el agua, se están desarrollando Procesos de Oxidación Avanzada que permitan detoxificar las aguas contaminadas por este tipo de sustancias.

Este trabajo de investigación forma parte del Proyecto "Tecnologías eficientes para la eliminación de contaminantes de preocupación emergente, contenidas en la Directiva 2013/39/CE o de riesgo significativo según la Directiva 2008/105/CE" (CTQ2015-69832-C4-4-R).

A partir de diferentes soluciones acuosas fortificadas con cuatro contaminantes emergentes (clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol y terbutrina) y tratadas mediante los Procesos de Oxidación Avanzada foto-Fenton y ozonización, se establecen los siguientes objetivos:

1. Determinar la toxicidad real de las muestras tratadas y sus potenciales efectos en el medio ambiente, mediante la realización de una serie de bioensayos con los organismos *Aliivibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapita* *Daphnia magna* y *Eisenia fetida*.
2. Evaluar la eficacia de los tratamientos de oxidación avanzada, bajo diferentes condiciones experimentales, para la eliminación de los contaminantes emergentes de las muestras a estudiar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Las muestras tratadas han sido proporcionadas por la unidad de tratamientos solares de agua de la Plataforma Solar de Almería (PSA), perteneciente al Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT). La PSA desarrolla sus actividades integrada como una División de I+D dentro de la estructura del Departamento de Energía del CIEMAT.

3.1.1. Muestras tratadas mediante foto-Fenton

El primer experimento (Experimento 1), que se realizó en el Concentrador Parabólico Compuesto (CPC), se llevó a cabo con agua natural (agua del grifo) diluida con agua destilada al 50% debido a su dureza (pH 7,9) y se añadieron 10 mg/L de H₂O₂, 10 mg/L de sustancias bio-orgánicas (BOS), 5,5 mg/L de Fe (III) y 200 µg/L de cada contaminante (diclofenaco, pentaclorofenol, terbutrina, clorfenvinfos). El tiempo de tratamiento fue de 180 minutos; se tomaron muestras antes de iniciar el tratamiento, a los 45 minutos y al final del tratamiento.

El segundo experimento (Experimento 2), que se realizó en el CPC, se llevó a cabo con agua simulada de salida de EDAR (Zhang et al., 2007) con un pH entre 7 y 8 y se añadieron 10 mg/L de H₂O₂, 10 mg/L de BOS o HLS, 5,5 mg/L de Fe (III) y 200 µg/L de cada contaminante (diclofenaco, pentaclorofenol, terbutrina, clorfenvinfos). El tiempo de tratamiento fue de 180 min; se tomaron muestras antes de iniciar el tratamiento, a los 45 minutos y al final del tratamiento.

3.1.2. Muestras tratadas mediante ozonización

A continuación, se detallan los tres experimentos que se han realizado con ozono (Experimentos 3, 4 y 5). El tratamiento en el Experimento 3 duró 90 min y en los otros dos 120 min. Se recogió una muestra inicial única antes de los tratamientos y para cada experimento una muestra intermedia (30 o 45 min) y una final (90 o 120 min). En todos los experimentos se utilizó agua simulada de salida de EDAR (Zhang et al., 2007). Los contaminantes (clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol y terbutrina) se añadieron al agua simulada a la concentración de 200 µg/L.

Los Experimentos 3 y 4 se realizaron en condiciones de oscuridad y el Experimento 5 con luz solar. Al agua simulada de los Experimentos 4 y 5 se añadieron 5.5 mg/L Fe³⁺ y 20 mg/L H₂O₂.

En la Tabla 1 se resumen las condiciones de los cinco experimentos.

Tabla 1. Condiciones experimentales de los tratamientos de oxidación avanzada.

Experimento	1	2	3	4	5
Tratamiento	foto-Fenton 180 min	foto-Fenton 180 min	Ozono 90 min	Ozono 120 min	Ozono 120 min
Matriz	Agua grifo:Agua destilada (50:50)	Agua simulada salida EDAR	Agua simulada salida EDAR	Agua simulada salida EDAR	Agua simulada salida EDAR
Condiciones	Luz solar	Luz solar	Oscuridad	Oscuridad	Luz solar
Contaminantes	200 µg/L	200 µg/L	200 µg/L	200 µg/L	200 µg/L
BOS	10 mg/L	10 mg/L	--	--	--
Fe (III)	5,5 mg/L	5,5 mg/L	--	5,5 mg/L	5,5 mg/L
H ₂ O ₂	10 mg/L	10 mg/L	--	20 mg/L	20 g/L

3.2. Ensayos de toxicidad

Este proyecto se ha realizado en el laboratorio de Bioquímica del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIAMN) de la Universidad Politécnica de Valencia.

3.2.1. Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria marina *Aliivibrio fischeri*

El objetivo de este ensayo es determinar la inhibición de la luminiscencia de *Aliivibrio fischeri* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de ensayo, durante 30 min. Se ha seguido el protocolo UNE-EN ISO 11348-3:2009.

Inmediatamente antes de iniciar el ensayo se reconstituye la bacteria liofilizada con 1 mL de agua destilada. A partir de la bacteria rehidratada (1 mL) se prepara una suspensión bacteriana con 49 mL de medio (20 g/L NaCl; 2,035 g/L MgCl₂·6H₂O; 0,30 g/L KCl). Como diluyente se utiliza NaCl a una concentración de 20 g/L en agua destilada.

Para el ensayo se utilizan microplacas de 96 pocillos blancas de fondo plano. Cada placa está compuesta por 8 réplicas de control positivo (suspensión bacteriana), 4 réplicas de control

negativo (diluyente) y 4 réplicas de cada dilución de la muestra (dilución + suspensión bacteriana). Las diluciones ensayadas han sido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512.

Las placas se llenan con el módulo inyector del lector de microplacas Tecan Infinite M200. Se llena una microplaca con 100 μ L de las diluciones de las muestras y diluyente (controles), se realiza una medida de la luminiscencia en el lector de microplacas para obtener los blancos y se incuban a 15 $^{\circ}$ C. A continuación, se llena otra microplaca con 100 μ L de la suspensión bacteriana que se incubó a 15 $^{\circ}$ C durante 15 min y se lee la luminiscencia. Seguidamente, se transfiere el contenido de la primera placa a la segunda placa con una pipeta multicanal, se incubó a 15 $^{\circ}$ C durante 30 min y se mide de nuevo la luminiscencia.

Los valores de luminiscencia obtenidos se procesan de acuerdo a la normativa UNE-EN ISO 11348-3 para obtener los porcentajes de inhibición de la luminiscencia.

3.2.2. Ensayo de toxicidad aguda con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

El objetivo de este ensayo es determinar la inhibición del crecimiento de *P. subcapitata* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de ensayo, durante 72 h. Se ha seguido el protocolo UNE-EN ISO 8692:2004.

El alga se suministra inmovilizada en una matriz (Ecotest, S.L.). En primer lugar, se desinmoviliza y resuspende en el medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium) específico para clorofíceas que cumple con los requisitos indicados en el protocolo ISO 8692:2004.

El cultivo madre resultante se mantiene en matraces de 250mL, en agitación continua, y en una cámara climatizada a 22 ± 2 $^{\circ}$ C, con un fotoperiodo de 12 horas, bajo una intensidad lumínica de 1100 lux. El cultivo se renueva cuando alcanza la fase exponencial de crecimiento.

Para la realización del ensayo se utilizan microplacas de 96 pocillos transparentes y de fondo plano. Cada ensayo consta de 16 réplicas control (medio de cultivo, algas y diluyente), 8 réplicas de cada dilución de la muestra (muestra, diluyente, medio de cultivo y algas) y 8 blancos (medio de cultivo y diluyente). Como diluyente se utiliza agua destilada. Las diluciones ensayadas han sido 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12, 1:16, 1:24.

Las microplacas se llenan de forma automatizada utilizando el módulo inyector del lector de placas Tecan Infinite M200. La concentración inicial de células en cada pocillo ha sido de 10^4 células/mL y el volumen final 300 μ L.

Cada placa se introduce en una bolsa de plástico transparente que se llena de CO₂ al x%. Las placas se incuban en la cámara climatizada a $23 \pm 1^{\circ}$ C, bajo iluminación continua (6000-10000 lux).

El parámetro seleccionado para la medida del crecimiento del alga ha sido la fluorescencia del contenido *in vivo* de clorofila, a 430 nm y 663 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. La fluorescencia se mide cada 24 h, durante 72 h. Todos los datos de fluorescencia se transforman en valores de concentración celular y, a partir de estos valores se determinan los porcentajes de inhibición del crecimiento del alga, según normativa.

3.2.3. Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero *Daphnia magna*

El objetivo de este ensayo es determinar la inhibición de la movilidad de *D. magna* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de ensayo. Se ha seguido el protocolo UNE-EN ISO 6341:2013.

Para la realización del ensayo se utilizan neonatos menores de 24 h de edad procedentes de las efipias o huevos latentes de *D. magna* (Ecotest S.L.). Para su cultivo se mantienen las condiciones óptimas necesarias que permiten el crecimiento adecuado de los individuos siguiendo el protocolo del ensayo DaphToxKit F TM, según Directiva 84/449 de la CE.

Cuatro días antes de comenzar el ensayo, se vierten las efipias sobre un tamiz y se lavan con abundante agua, eliminando cualquier resto procedente del vial de origen, para su posterior transferencia a una placa Petri que contiene el medio de cultivo para Daphnias (NaHCO_3 2,59 g/L; KCl 0,23 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,93 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11,76g/L; pH 7,5-8,0).

Los cultivos se mantienen en una cámara climatizada a una temperatura de 21 ± 2 °C, un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 lux. En estas condiciones, las efipias eclosionan alrededor de las 96 h. Unas horas antes del ensayo se alimentan los neonatos con microalgas procedentes de un cultivo.

Antes de iniciar el ensayo se preparan las diluciones de las muestras. Para ello, se toman 100 mL de cada muestra y se realizan las diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) utilizando como diluyente el medio de cultivo para Daphnias. A continuación, se reparten las diluciones en placas Petri de 55 mm de diámetro (10 mL/placa). Se realizan 4 réplicas por dilución. A cada replica se transfieren 5 neonatos con la ayuda de una pipeta Pasteur. Terminada la transferencia, las placas, correctamente identificadas, se incuban en la cámara climatizada, a una temperatura de 21 ± 2 °C, sin alimentación y en oscuridad.

El recuento se realiza a las 24 h, contabilizando el número de individuos inmóviles y muertos, considerándose éstos como aquellos que moviendo ligeramente la placa no hay desplazamiento tras 15 segundos. A partir de los datos obtenidos se calculan los porcentajes de inmovilización con respecto a los controles.

3.2.4. Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra *Eisenia fetida*

El objetivo de este ensayo es determinar el efecto sobre la mortalidad y el peso de las lombrices expuestas a las muestras de ensayo durante 14 días. Se ha seguido el protocolo ISO 11268-2:2012.

Para la realización del ensayo se utilizan recipientes redondos de vidrio (15 cm de diámetro x 7 cm de alto). Cada recipiente se llena con 500 g de sustrato artificial (1% carbonato cálcico; 10% turba rubia; 20% arcilla de caolinita y 69% arena de cuarzo industrial) y se añaden 150 mL de muestra (aprox. 40% de humedad) que se mezcla cuidadosamente hasta obtener una masa homogénea. Se preparan 3 réplicas de cada muestra y 3 réplicas control (150 mL de agua destilada). Las lombrices utilizadas en el ensayo de toxicidad son sexualmente maduras, con clitelo (estructura tegumentaria glandular característica de los anélidos adultos clitelados) y con un peso húmedo, entre 200 y 300 mg, purgadas durante 24 horas. Estas lombrices se obtienen de la planta de compostaje que tiene el Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente en la Universidad Politécnica de Valencia. Se seleccionan 10 lombrices por recipiente,

previamente lavadas y purgadas durante 24 horas y se depositan sobre la superficie del sustrato. Cada recipiente se cubre con film transparente sujeto con una goma elástica y finamente agujereado para permitir el intercambio gaseoso. Los recipientes de ensayo se introducen en la cámara climatizada a una temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ y con luz continua (400-800 Lux) para favorecer el enterramiento de los gusanos, durante los 14 días de ensayo.

A los 7 días de ensayo, las lombrices de cada recipiente se extraen, se hace el recuento de lombrices vivas y muertas y se pesan. Las lombrices muertas se desechan y las vivas se introducen de nuevo en el recipiente correspondiente. Se añaden 20 ml de agua destilada en cada recipiente para humedecer el sustrato y se llevan de nuevo a incubar. A los 14 días se realiza la misma operación desechando todas las lombrices. Se calculan los porcentajes de mortalidad para cada recipiente de ensayo y las variaciones de peso expresándolas también en porcentaje.

3.3. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad

Los resultados obtenidos expresados como porcentajes de inhibición de la bioluminiscencia de *A. fischeri*, porcentajes de inhibición del crecimiento de *P. subcapitata*, porcentajes de inhibición de la movilidad de *D. magna* y porcentajes de la variación de peso en las lombrices se analizan mediante ANOVA con el programa Statgraphics Plus (v. 5.1), con el objetivo de determinar diferencias significativas entre las distintas diluciones de las muestras y los controles. A partir del análisis ANOVA se calcula el valor LID (mínima dilución sin efecto) de cada ensayo. Para obtener el valor MID (dilución que produce el 50% de respuesta) y sus Intervalos de Confianza al 95%, se realiza un análisis Probit utilizando el programa SPSS (v. 16.0).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria marina *Aliivibrio fischeri*

A continuación, se muestran los valores medios de los porcentajes de inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria *A. fischeri* expuesta a diferentes diluciones de las muestras tratadas mediante foto-Fenton (Experimentos 1 y 2; Tablas 2 y 3) o mediante ozonización (Experimentos 3, 4 y 5; Tablas 4, 5 y 6), durante 30 minutos. Se ha realizado un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Dilución ensayada*, para cada una de las muestras de estudio y, la variable dependiente *Porcentaje de inhibición de la luminiscencia* de la bacteria. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple (Test de Rangos Múltiples) para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, con un nivel de confianza del 95,0%.

4.1.1. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton

La Tabla 2 corresponde a los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 1 realizado con agua natural y la Tabla 3 a los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 2 realizado con agua simulada de salida de EDAR. En ambos experimentos se observa una disminución del porcentaje de inhibición de la bioluminiscencia de *A. fischeri* a medida que aumenta la dilución. Sin embargo, no se observa un efecto importante de las muestras sobre la bacteria ya que, para todos los tiempos de tratamiento, los porcentajes de inhibición de la luminiscencia están comprendidos entre 0,22 y 10,3%.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 1, durante 30 min

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	45 min	180 min
1:1,25	8,8 ± 0,9 ^a	9,4 ± 1,2 ^a	8,9 ± 3,4 ^a
1:2	6,7 ± 0,6 ^b	7,6 ± 0,3 ^b	6,7 ± 2,5 ^b
1:3	4,9 ± 1,5 ^b	7,6 ± 0,5 ^b	6,1 ± 0,4 ^b
1:4	3,3 ± 0,2 ^c	7,5 ± 1,1 ^b	5,8 ± 0,4 ^b
1:6	1,8 ± 0,8 ^d	6,1 ± 0,6 ^c	5,2 ± 0,5 ^b
1:8	1,7 ± 0,2 ^d	4,8 ± 1,8 ^c	4,2 ± 0,2 ^b
1:12	1,3 ± 0,5 ^d	3,5 ± 1,0 ^d	2,4 ± 1,5 ^c
1:16	0,9 ± 0,8 ^d	3,4 ± 1,4 ^d	1,8 ± 0,9 ^c
1:24	0,3 ± 0,3 ^d	2,0 ± 0,8 ^d	0,8 ± 0,7 ^c
1:32	0,2 ± 0,2 ^d	1,9 ± 1,1 ^d	0,3 ± 0,3 ^c

*Media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 2, durante 30 min.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	45 min	180 min
1:1,25	10,2 ± 0,9 ^a	6,6 ± 1,5 ^a	10,3 ± 3,4 ^a
1:2	9,6 ± 1,2 ^a	5,4 ± 1,0 ^a	8,3 ± 2,2 ^b
1:3	6,8 ± 2,1 ^b	4,4 ± 1,5 ^a	7,9 ± 3,2 ^b
1:4	6,0 ± 2,4 ^b	4,2 ± 1,3 ^a	6,4 ± 1,4 ^c
1:6	5,8 ± 1,7 ^b	3,8 ± 2,9 ^a	5,6 ± 2,0 ^c
1:8	4,5 ± 2,2 ^c	4,8 ± 1,1 ^a	4,6 ± 1,7 ^c
1:12	2,7 ± 1,2 ^d	3,2 ± 1,9 ^b	3,8 ± 1,9 ^c
1:16	1,7 ± 0,6 ^d	2,6 ± 1,2 ^b	3,5 ± 1,8 ^c
1:24	1,1 ± 0,4 ^d	2,3 ± 0,2 ^b	2,5 ± 0,2 ^c
1:32	0,9 ± 0,5 ^d	1,2 ± 0,8 ^b	1,9 ± 0,8 ^c

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

4.1.2. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización

Las Tabla 4, 5 y 6 muestran los resultados, tras 30 minutos de exposición de las bacterias a las soluciones de ensayo, obtenidos en los Experimentos 3, 4 y 5, respectivamente, realizados con agua simulada de salida de EDAR, bajo diferentes condiciones. En todos los casos, excepto la muestra de 120 min del Experimento 4, tanto la muestra sin tratar como las muestras tratadas a diferentes tiempos no han tenido un efecto significativo sobre la bioluminiscencia de la bacteria, estando los porcentajes de inhibición comprendidos entre 1,2 y 8,1%. Destaca la elevada toxicidad de la muestra tratada durante 120 min del Experimento 4, con un porcentaje de inhibición de la luminiscencia elevado, de 76,7 y 72,9% para las diluciones 1:1,25 y 1:2, respectivamente.

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 3, durante 30 min.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	30 min	90 min
1:1,25	1,3 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,2 ^a	8,1 ± 2,5 ^a
1:2	3,9 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,4 ^a	4,0 ± 2,3 ^{bcd}
1:4	4,5 ± 2,9 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	3,8 ± 1,0 ^{bcd}
1:8	4,8 ± 1,6 ^a	1,9 ± 0,8 ^a	6,3 ± 1,4 ^{ab}
1:16	3,7 ± 3,0 ^a	4,4 ± 1,6 ^a	2,7 ± 1,5 ^{bcd}
1:32	2,9 ± 0,5 ^a	3,2 ± 2,5 ^a	1,5 ± 0,3 ^d
1:64	2,9 ± 0,2 ^a	4,1 ± 0,9 ^a	5,6 ± 1,3 ^{abc}
1:128	1,9 ± 0,1 ^a	2,3 ± 1,3 ^a	4,3 ± 1,6 ^{bcd}
1:256	2,3 ± 0,8 ^a	1,8 ± 0,7 ^a	4,4 ± 0,4 ^{bcd}
1:512	1,9 ± 0,3 ^a	3,8 ± 2,4 ^a	2,5 ± 1,4 ^{cd}

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 4, durante 30 min.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	30 min	120 min
1:1,25	1,3 ± 0,2 ^a	6,5 ± 2,0 ^{ab}	76,7 ± 2,9 ^a
1:2	4,0 ± 0,7 ^a	6,9 ± 0,4 ^{ab}	72,9 ± 0,9 ^a
1:4	4,5 ± 2,9 ^a	3,3 ± 1,7 ^{bc}	53,9 ± 1,2 ^b
1:8	4,8 ± 1,6 ^a	2,2 ± 0,1 ^c	33,8 ± 2,6 ^c
1:16	3,7 ± 3,0 ^a	3,5 ± 0,5 ^{bc}	22,3 ± 1,8 ^d
1:32	2,9 ± 0,5 ^a	2,6 ± 0,2 ^c	16,7 ± 2,9 ^e
1:64	2,9 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,7 ^c	12,6 ± 2,6 ^{ef}
1:128	1,9 ± 0,0 ^a	5,4 ± 3,5 ^{abc}	10,0 ± 3,2 ^f
1:256	2,3 ± 0,8 ^a	7,7 ± 1,4 ^a	9,2 ± 2,1 ^{fg}
1:512	1,9 ± 0,3 ^a	5,1 ± 1,6 ^{abc}	7,8 ± 2,1 ^{fg}

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 5, durante 30 min.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	40 min	120 min
1:1,25	1,3 ± 0,2 ^a	4,3 ± 1,5 ^a	4,8 ± 1,3 ^{ab}
1:2	3,9 ± 0,8 ^a	3,3 ± 2,3 ^a	4,9 ± 6,9 ^{ab}
1:4	4,5 ± 2,9 ^a	3,1 ± 2,8 ^a	5,9 ± 5,6 ^a
1:8	4,8 ± 1,6 ^a	4,5 ± 2,0 ^a	4,0 ± 1,5 ^{abc}
1:16	3,7 ± 3,0 ^a	5,6 ± 0,7 ^a	4,3 ± 1,3 ^{abc}
1:32	2,9 ± 0,5 ^a	5,7 ± 0,3 ^a	1,2 ± 4,7 ^c
1:64	2,9 ± 0,2 ^a	4,6 ± 0,4 ^a	3,5 ± 7,9 ^{abc}
1:128	1,9 ± 0,0 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	1,6 ± 6,1 ^{bc}
1:256	2,3 ± 0,8 ^a	4,9 ± 0,7 ^a	4,8 ± 2,1 ^{ab}
1:512	1,9 ± 0,3 ^a	4,6 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,4 ^c

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

El valor MID de la muestra 120 min del Experimento 4 ha sido 1:5 (1:7 – 1:3).

4.2. Ensayo de toxicidad aguda con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*

A continuación, se muestran los valores medios de los porcentajes de inhibición del crecimiento del alga *P. subcapitata* expuesta a diferentes diluciones de las muestras tratadas mediante foto-Fenton (Experimentos 1 y 2; Tablas 7 y 8) o mediante ozonización (Experimentos 3, 4 y 5; Tablas 11, 12 y 13), durante 72 h. Se ha realizado un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Dilución ensayada*, para cada una de las muestras de estudio y, la variable dependiente *Porcentaje de inhibición del crecimiento* de la bacteria. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple (Test de Rangos Múltiples) para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, con un nivel de confianza del 95,0%.

También se muestran los valores LID y MID de las disoluciones acuosas de los cinco experimentos para *P. subcapitata* (Tablas 9, 10, 14, 15 y 16).

4.2.1. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton

La Tabla 7 recoge los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 1 realizado con agua natural y la Tabla 8 los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 2 realizado con agua simulada de salida de EDAR.

En las tablas se observa una disminución del porcentaje del crecimiento del alga a medida que aumenta la dilución. Todas las muestras han tenido un efecto significativo sobre el crecimiento del alga, siendo la muestra sin tratar la de mayor efecto. En el Experimento 1, el porcentaje de inhibición del crecimiento en la dilución 1:8 ha sido del 100% para la muestra sin tratar, en cambio, los porcentajes de inhibición de las muestras 45 min y 180 min han sido de 50% y 30%, respectivamente. En el Experimento 2, la misma dilución 1:8 ha producido el 100% de inhibición del crecimiento para todas las muestras ensayadas; en este experimento es necesario una dilución mayor (1:16) para observar diferencias significativas entre los tratamientos, siendo los porcentajes de inhibición, en esta dilución, de 91,5%, 69,6% y 70,1% para las muestras 0 min, 45 min y 180 min, respectivamente.

Los valores LID y MID de las disoluciones acuosas de los Experimentos 1 y 2 para *P. subcapitata* se muestran en las Tablas 9 y 10. A partir de estos valores se puede observar una disminución de la toxicidad a lo largo del tiempo de tratamiento. En el Experimento 1, el tratamiento foto-Fenton ha sido más efectivo que en el Experimento 2, con un valor MID de 1:7 para las muestras de 45 y 180 min, frente a los valores MID del Experimento 2 de 1:22 y 1:19, para los mismos tiempos de tratamiento.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 1, durante 72 h.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	45 min	180 min
1:1,25	100,0 ± 0,0 ^a	99,9 ± 0,3 ^a	98,9 ± 0,3 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	99,4 ± 0,2 ^a	98,3 ± 0,2 ^{ab}
1:3	100,0 ± 0,0 ^a	98,4 ± 0,1 ^a	96,1 ± 0,3 ^b
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	94,0 ± 0,3 ^b	86,9 ± 0,6 ^c
1:6	100,0 ± 0,0 ^a	88,0 ± 0,5 ^c	72,8 ± 1,3 ^d
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	50,5 ± 1,5 ^d	29,8 ± 1,7 ^e
1:12	93,9 ± 0,5 ^a	24,6 ± 1,2 ^e	18,2 ± 0,8 ^f
1:16	82,8 ± 1,0 ^b	8,8 ± 0,6 ^f	4,1 ± 1,1 ^g
1:24	59,9 ± 1,9 ^c	2,8 ± 1,1 ^g	2,0 ± 0,8 ^g
1:32	29,5 ± 1,6 ^d	---	---
1:48	14,3 ± 0,9 ^e	---	---
1:64	5,4 ± 0,9 ^f	---	---
1:96	2,0 ± 0,4 ^g	---	---
1:128	1,8 ± 0,4 ^g	---	---
1:192	1,9 ± 0,4 ^g	---	---

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 2, durante 72 h.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	45 min	180 min
1:1,25	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,2 ^a
1:3	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,3 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,2 ^a
1:6	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	99,5 ± 0,3 ^a
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	98,8 ± 0,3 ^a
1:12	98,8 ± 0,3 ^a	98,1 ± 0,3 ^a	83,4 ± 0,9 ^b
1:16	91,5 ± 0,5 ^b	69,6 ± 1,5 ^b	70,1 ± 0,7 ^c
1:24	74,4 ± 1,2 ^c	35,3 ± 1,5 ^c	27,7 ± 1,3 ^d
1:32	43,1 ± 1,2 ^d	11,2 ± 0,9 ^d	8,6 ± 1,4 ^e
1:48	15,5 ± 0,7 ^e	2,5 ± 1,0 ^e	---
1:64	1,7 ± 0,9 ^{fg}	3,0 ± 1,0 ^e	---
1:96	5,2 ± 2,7 ^{fg}	2,2 ± 0,9 ^e	---
1:128	7,6 ± 5,2 ^f	1,7 ± 0,9 ^e	---
1:192	0,7 ± 0,2 ^g	1,7 ± 0,6 ^e	---

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 9. Valores LID y MID para *P. subcapitata*, expuesta a las muestras del Experimento 1, durante 72 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:96	1:27 (1:29 - 1:25)
45 min	1:24	1:9 (1:9 - 1:8)
180 min	1:16	1:7 (1:7- 1:7)

Tabla 10. Valores LID y MID para *P. subcapitata*, expuesta a las muestras del Experimento 2, durante 72 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:64	1:32 (1:37 - 1:28)
45 min	1:48	1:22 (1:28 - 1:15)
180 min	1:32	1:19 (1:19 - 1:19)

4.2.2. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización

Las Tabla 11, 12 y 13 muestran los resultados, tras 72 h de exposición de las algas a las soluciones de ensayo, obtenidos en los Experimentos 3, 4 y 5, respectivamente, realizados con agua simulada de salida de EDAR, bajo diferentes condiciones.

En las tablas se observa una disminución del porcentaje del crecimiento del alga a medida que aumenta la dilución. Todas las muestras han tenido un efecto significativo sobre el crecimiento del alga, siendo la muestra sin tratar la de mayor efecto. En los Experimentos 3, 4 y 5, el porcentaje de inhibición del crecimiento del alga para la dilución 1:24 de la muestra sin tratar ha sido significativamente alto (96,5%), en cambio, la misma dilución de todas las muestras tratadas no ha producido un efecto significativo sobre el crecimiento del alga estando los porcentajes de inhibición del crecimiento entre 1,4% y 5,7%. En la muestra sin tratar no se comienza a ver una disminución significativa de la inhibición hasta la dilución 1:32 con un 91,51%.

A partir de la dilución 1:3 se observa una disminución de la inhibición sobre el crecimiento, para los tratamientos finales de los Experimentos 3 y 5 (37% y 63,6%). En el Experimento 4, la dilución 1:3 ha producido un 100,0% de efecto.

En los tratamientos intermedios, las diluciones sin efecto han sido 1:16-1:24 para todos los experimentos y en los tratamientos finales de los Experimentos 3 y 5 han sido 1:8-1:12. En el Experimento 4 el porcentaje de inhibición del crecimiento para la dilución 1:8 ha sido 61,5% y para la dilución 1:12 ha sido 32,2.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 3, durante 72 h.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	30 min	90 min
1:1,25	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 1,0 ^a	81,7 ± 2,4 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	99,2 ± 0,9 ^{ab}	63,7 ± 3,4 ^b
1:3	100,0 ± 0,0 ^a	97,6 ± 1,1 ^b	37,0 ± 3,1 ^c
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	93,9 ± 3,3 ^c	22,3 ± 1,7 ^d
1:6	100,0 ± 0,0 ^a	77,9 ± 3,4 ^d	9,8 ± 1,8 ^e
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	51,9 ± 3,3 ^e	2,2 ± 1,4 ^f
1:12	100,0 ± 0,0 ^a	23,3 ± 3,0 ^f	2,8 ± 1,9 ^f
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	9,2 ± 2,9 ^g	2,3 ± 1,5 ^f
1:24	96,5 ± 1,2 ^a	1,9 ± 1,7 ^h	2,6 ± 1,8 ^f
1:32	91,5 ± 1,8 ^b	---	---
1:48	85,4 ± 2,5 ^c	---	---
1:64	74,6 ± 3,0 ^d	---	---
1:96	62,8 ± 2,7 ^e	---	---
1:128	45,4 ± 2,3 ^f	---	---
1:192	28,5 ± 2,6 ^g	---	---
1:256	13,8 ± 3,4 ^h	---	---
1:384	1,9 ± 1,7 ⁱ	---	---

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 4, durante 72 h.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	30 min	120 min
1:1,25	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,7 ^a	101,7 ± 0,8 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	99,4 ± 0,8 ^a	100,9 ± 0,4 ^a
1:3	100,0 ± 0,0 ^a	94,3 ± 2,2 ^b	99,9 ± 0,9 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	86,5 ± 3,5 ^c	97,2 ± 1,3 ^b
1:6	100,0 ± 0,0 ^a	67,1 ± 3,4 ^d	87,6 ± 3,8 ^c
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	34,7 ± 3,7 ^e	61,5 ± 4,6 ^d
1:12	100,0 ± 0,0 ^a	13,1 ± 2,9 ^f	32,2 ± 2,5 ^e
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	3,2 ± 1,8 ^g	19,8 ± 1,9 ^f
1:24	96,5 ± 1,4 ^a	3,1 ± 2,2 ^g	5,7 ± 2,4 ^g
1:32	91,5 ± 1,2 ^b	---	---
1:48	85,4 ± 2,5 ^c	---	---
1:64	74,6 ± 3,0 ^d	---	---
1:96	62,8 ± 2,7 ^e	---	---
1:128	45,4 ± 2,3 ^f	---	---
1:192	28,5 ± 2,6 ^g	---	---
1:256	13,8 ± 3,4 ^h	---	---
1:384	1,9 ± 1,7 ⁱ	---	---

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 5, durante 72 h.

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	40 min	120 min
1:1,25	100,0 ± 0,0 ^a	98,9 ± 0,8 ^a	97,9 ± 1,3 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	98,3 ± 0,6 ^a	89,2 ± 3,1 ^b
1:3	100,0 ± 0,0 ^a	94,1 ± 2,1 ^a	63,6 ± 3,5 ^c
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	83,2 ± 1,8 ^b	31,3 ± 2,3 ^d
1:6	100,0 ± 0,0 ^a	58,3 ± 3,5 ^c	18,2 ± 2,3 ^e
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	29,0 ± 4,1 ^d	9,9 ± 3,2 ^f
1:12	100,0 ± 0,0 ^a	10,7 ± 3,2 ^e	4,6 ± 3,7 ^g
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	4,1 ± 2,4 ^f	2,5 ± 1,6 ^g
1:24	96,5 ± 1,2 ^a	1,4 ± 0,9 ^f	2,0 ± 1,7 ^g
1:32	91,5 ± 1,8 ^b	---	---
1:48	85,4 ± 2,5 ^c	---	---
1:64	74,6 ± 3,0 ^d	---	---
1:96	62,8 ± 2,7 ^e	---	---
1:128	45,4 ± 2,3 ^f	---	---
1:192	28,5 ± 2,6 ^g	---	---
1:256	13,7 ± 3,4 ^h	---	---
1:384	1,9 ± 1,7 ⁱ	---	---

*media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Los valores LID y MID de las disoluciones acuosas de las muestras tratadas mediante ozonización bajo diferentes condiciones experimentales para *P. subcapitata* se muestran en las Tablas 14, 15 y 16.

Los valores LID Y MID de los Experimentos 3, 4 y 5 muestran una disminución de la toxicidad de las muestras a medida que avanza el tiempo de tratamiento, a excepción del experimento 4, donde se observa un ligero aumento de la toxicidad en el tratamiento final (120 min) con un valor MID de 1:10, con respecto al valor MID de 1:7 de la muestra intermedia (30 min). El valor MID para la muestra no tratada ha sido 1:11, mientras que para el resto de tiempos de tratamiento los valores MID están comprendidos entre 1:2 y 1:10.

El tratamiento de ozonización ha sido efectivo en todas las condiciones de ensayo, principalmente en las condiciones del Experimento 3 donde se consigue un valor MID de 1:2 para la muestra tratada durante 90 min.

El valor LID de la muestra 0 min ha sido bastante elevado 1:384 observándose una reducción importante en las muestras tratadas.

Tabla 14. Valores LID y MID para *P. subcapitata*, expuesta a las muestras del Experimento 3, durante 72 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:384	1:111 (1:114 – 1:109)
30 min	1:24	1:8 (1:9 – 1:8)
90 min	1:8	1:2 (1:3 – 1:2)

Tabla 15. Valores LID y MID para *P. subcapitata*, expuesta a las muestras del Experimento 4, durante 72 horas.

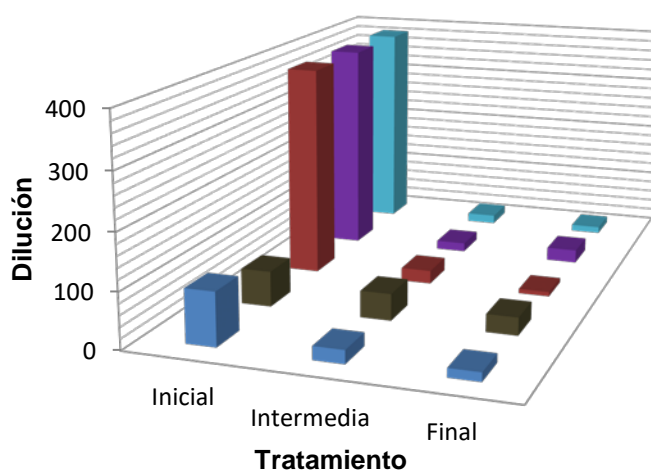
Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:384	1:111 (1:114 – 1:109)
30 min	1:16	1:7 (1:7 – 1:7)
120 min	1:24	1:10 (1:10 – 1:10)

Tabla 16. Valores LID y MID para *P. subcapitata*, expuesta a las muestras del Experimento 5, durante 72 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:384	1:111 (1:114 – 1:109)
40 min	1:16	1:6 (1:7 – 1:6)
120 min	1:12	1:4 (1:4 – 1:3)

En las Figuras 9 y 10 se comparan los valores LID y MID de las muestras de todos los experimentos para *P. subcapitata*. Se puede observar la elevada toxicidad de las muestras sin tratar (Inicial) de los cinco experimentos. La toxicidad se reduce a medida que aumenta el tiempo de tratamiento siendo la muestra final, la de menor toxicidad sobre el alga. En el Experimento 2 se observa una lenta disminución de la toxicidad a lo largo del tiempo de tratamiento, con respecto al resto de experimentos. De todas las muestras finales e intermedias, las del Experimento 2 son las que han presentado mayor toxicidad sobre *P. subcapitata*.

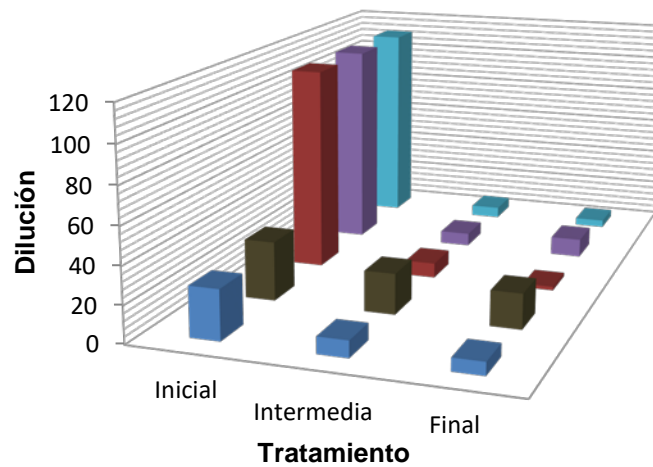
Valores LID



- Exp 1 (foto-Fenton) ■ Exp 2 (foto-Fenton) ■ Exp 3 (Ozonización)
- Exp 4 (Ozonización) ■ Exp 5 (Ozonización)

Figura 9. Comparación de los valores LID para *P. subcapitata*.

Valores MID



■ Exp 1 (foto-Fenton) ■ Exp 2 (foto-Fenton) ■ Exp 3 (Ozonización)
■ Exp 4 (Ozonización) ■ Exp 5 (Ozonización)

Figura 10. Comparación de los valores MID para *P. subcapitata*.

4.3. Ensayo de toxicidad aguda con el cladócono *Daphnia magna*

A continuación, se muestran los valores medios de los porcentajes de inhibición de la movilidad de *D. magna* expuesta a diferentes diluciones de las muestras tratadas mediante foto-Fenton (Experimentos 1 y 2; Tablas 17 y 18) o mediante ozonización (Experimentos 3, 4 y 5; Tablas 21, 22 y 23), durante 24 h. Se ha realizado un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Dilución ensayada*, para cada una de las muestras de estudio y, la variable dependiente *Porcentaje de inmovilización* del microcrustáceo, a las 24 horas de ensayo. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple (Test de Rangos Múltiples) para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, con un nivel de confianza del 95,0%.

También se muestran los valores LID y MID de las disoluciones acuosas de los cinco experimentos para *D. magna* (Tablas 19, 20, 24, 25 y 26).

4.3.1. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton

La Tabla 17 corresponde a los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 1 realizado con agua natural y la Tabla 18 a los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 2 realizado con agua simulada de salida de EDAR. En las tablas se observa que a medida que aumenta la dilución disminuye el porcentaje de inmovilización, siendo más significativo en las muestras tratadas durante 180 min. En el Experimento 1, a partir de la dilución 1:16 se empieza a observar una disminución del efecto significativo para el tiempo de tratamiento de 180 min mientras que, para los tiempos de 0 y 45 min han sido las diluciones 1:64 y 1:32, respectivamente. En el Experimento 2, a partir de la dilución 1:64 se observa una disminución del efecto significativo para los tres tiempos de tratamiento.

Tabla 17. Porcentaje de inmovilización de *D. magna* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 1, durante 24 horas

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	45 min	180 min
1:1	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:8	95,0 ± 10,0 ^a	95,0 ± 10,0 ^{ab}	85,0 ± 19,1 ^a
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	65,0 ± 0,0 ^b
1:32	100,0 ± 0,0 ^a	80,0 ± 28,3 ^b	55,0 ± 10,0 ^b
1:64	70,0 ± 11,5 ^b	55,0 ± 10,0 ^c	55,0 ± 19,1 ^b
1:128	10,0 ± 11,5 ^c	5,0 ± 10,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
1:256	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	5,0 ± 10,0 ^d
1:512	10,0 ± 11,5 ^d	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^d

*Media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 18. Porcentaje de inmovilización de *D. magna* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 2, durante 24 horas

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	45 min	180 min
1:1	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:16	95,0 ± 10,0 ^{ab}	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:32	95,0 ± 10,0 ^{ab}	100,0 ± 0,0 ^a	95,0 ± 10,0 ^a
1:64	80,0 ± 28,3 ^b	70,0 ± 20,0 ^b	65,0 ± 19,1 ^b
1:128	35,0 ± 10,0 ^c	20,0 ± 16,3 ^c	5,0 ± 10,0 ^c
1:256	5,0 ± 10,0 ^d	10,0 ± 0,0 ^{cd}	5,0 ± 10,0 ^c
1:512	5,0 ± 10,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^d

*Media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Los valores LID y MID de las disoluciones acuosas de los Experimentos 1 y 2 para *D. magna* se muestran en las Tablas 19 y 20, respectivamente. Los valores LID han sido similares para todos los tiempos de tratamiento presentando los valores más altos las muestras 0 min y 45 min del Experimento 2 lo que indica su mayor efecto sobre la movilidad del microcrustáceo. Según los valores MID se puede observar una disminución de la toxicidad a lo largo del tiempo de tratamiento, siendo más evidente en el Experimento 1 con un valor MID para la muestra 180 min de 1:36 frente al valor de 1:77 en el Experimento 2. Estos resultados demuestran la efectividad del tratamiento.

Tabla 19. Valores LID y MID para *D. magna* expuesta a las muestras del Experimento 1, durante 24 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:128	1:83 (1:125 – 1:53)
45 min	1:128	1:56 (1:83 – 1:38)
180 min	1:128	1:36 (1:45 – 1:27)

Tabla 20. Valores LID y MID para *D. magna* expuesta a las muestras de ensayo del experimento 2, durante 24 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:256	1:100 (1:125 – 1:77)
45 min	1:256	1:91 (1:111 – 1:77)
180 min	1:128	1:77 (1:91 – 1:63)

4.3.2. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización

Las Tablas 21, 22 y 23 muestran los resultados, tras 24 h de exposición del microcrustáceo a las soluciones de ensayo, obtenidos en los Experimentos 3, 4 y 5, respectivamente, realizados con agua simulada de salida de EDAR, bajo diferentes condiciones.

En las tablas se observa una disminución del porcentaje de inmovilización a medida que aumenta la dilución, siendo más significativo en las muestras finales. Destaca el elevado efecto de la muestra no tratada sobre la movilidad de las *Daphnias* con un porcentaje de inmovilización para la dilución 1:64 del 100% mientras que para la misma dilución los porcentajes de inmovilización estuvieron comprendidos entre 0,0 y 70,0%, para todos los tiempos de tratamiento. Las muestras tratadas del Experimento 5 tuvieron un mayor efecto sobre el microcrustáceo que las muestras tratadas de los Experimentos 3 y 4.

Los valores LID y MID de las disoluciones acuosas de las muestras tratadas mediante ozonización bajo diferentes condiciones experimentales para *D. magna* se muestran en las Tablas 24 a 26.

Los valores LID y MID obtenidos indican una disminución de la toxicidad de las muestras a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, en todas las condiciones experimentales. Por lo tanto, el tratamiento mediante ozonización ha sido efectivo en la detoxificación de las muestras, especialmente en las condiciones del Experimento 4, con un valor MID para la muestra 120 min de 1:9. El valor MID para la muestra no tratada ha sido alto, de 1:125. Los valores MID para el resto de tiempos de tratamiento están comprendidos entre 1:9 y 1:91. En las Figuras 11 y 12 se comparan los valores LID y MID de las muestras de todos los experimentos para *D. magna*.

Tabla 21. Porcentaje de inmovilización de *D. magna* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 3, durante 24 horas

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	30 min	90 min
1:1	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	95,0 ± 5,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	90,0 ± 10,0 ^a	95,0 ± 5,0 ^a
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	75,0 ± 19,2 ^b	35,0 ± 9,6 ^b
1:32	100,0 ± 0,0 ^a	55,0 ± 10,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
1:64	100,0 ± 0,0 ^a	25,0 ± 10,0 ^d	5,0 ± 5,0 ^c
1:128	30,0 ± 5,8 ^b	5,0 ± 10,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c
1:256	15,0 ± 5,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^d	5,0 ± 5,0 ^c
1:512	5,0 ± 5,0 ^c	5,0 ± 10,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c

*Media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 22. Porcentaje de inmovilización de *D. magna* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 4, durante 24 horas

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	30 min	120 min
1:1	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	90,0 ± 5,8 ^a
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	95,0 ± 11,5 ^a	45,0 ± 5,0 ^b
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	90,0 ± 11,5 ^a	15,0 ± 5,0 ^c
1:32	100,0 ± 0,0 ^a	65,0 ± 10,0 ^b	10,0 ± 5,8 ^c
1:64	100,0 ± 0,0 ^a	25,0 ± 10,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
1:128	30,0 ± 5,8 ^b	5,0 ± 10,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c
1:256	15,0 ± 5,0 ^c	5,0 ± 5,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c
1:512	5,0 ± 5,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c

*Media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla 23. Porcentaje de inmovilización de *D. magna* expuesta a las diluciones de las muestras del Experimento 5, durante 24 horas

Dilución	Tiempo de tratamiento		
	0 min	40 min	120 min
1:1	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:4	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:8	100,0 ± 0,0 ^a	95,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:16	100,0 ± 0,0 ^a	90,0 ± 10,0 ^a	75,0 ± 5,0 ^b
1:32	100,0 ± 0,0 ^a	85,0 ± 11,5 ^{ab}	30,0 ± 5,8 ^c
1:64	100,0 ± 0,0 ^a	70,0 ± 10,0 ^b	15,0 ± 5,0 ^d
1:128	30,0 ± 5,8 ^b	40,0 ± 10,0 ^c	5,0 ± 5,0 ^{de}
1:256	15,0 ± 5,0 ^c	15,0 ± 10,0 ^d	5,0 ± 5,0 ^{de}
1:512	5,0 ± 5,0 ^c	5,0 ± 10,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^e

*Media de 4 réplicas ± Desviación estándar relativa; Superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla 24. Valores LID y MID para *D. magna* expuesta a las muestras de ensayo del Experimento 3, durante 24 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:256	1:125 (1:167 – 1:91)
30 min	1:128	1:32 (1:98 – 1:23)
90 min	1: 32	1:42 (1:62 – 1:27)

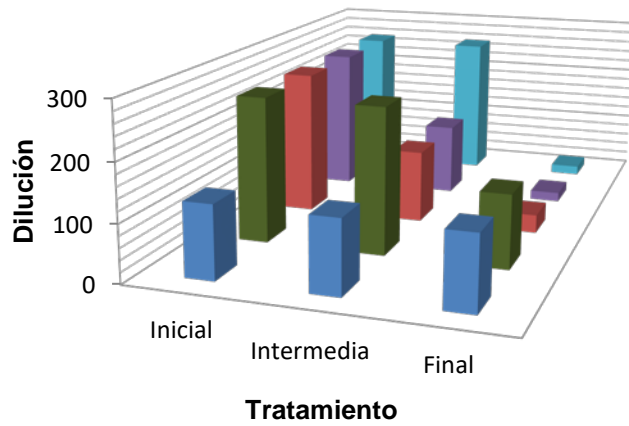
Tabla 25. Valores LID y MID para *D. magna* expuesta a las muestras de ensayo del Experimento 4, durante 24 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:256	1:125 (1:167 – 1:91)
30 min	1:128	1:42 (1:50 – 1:33)
120 min	1: 16	1:9 (1:11 – 1:7)

Tabla 26. Valores LID y MID para *D. magna* expuesta a las muestras de ensayo del Experimento 5, durante 24 horas.

Tiempo de tratamiento	LID	MID (Intervalo de Confianza al 95%)
0 min	1:256	1:125 (1:167 – 1:91)
40 min	1:256	1:91 (1:125 – 1:71)
120 min	1: 16	1:29 (1:40 – 1:20)

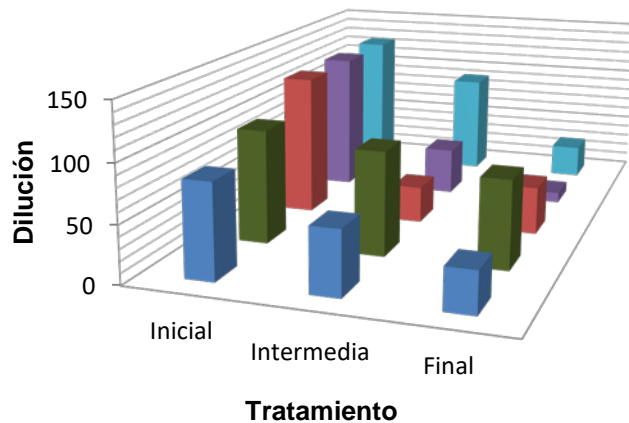
Valores LID



■ Exp 1 (foto-Fenton) ■ Exp 2 (foto-Fenton) ■ Exp 3 (Ozonización)
 ■ Exp 4 (Ozonización) ■ Exp 5 (Ozonización)

Figura 11. Comparación de los valores LID para *D. magna*.

Valores MID



■ Exp 1 (foto-Fenton) ■ Exp 2 (foto-Fenton) ■ Exp 3 (Ozonización)
 ■ Exp 4 (Ozonización) ■ Exp 5 (Ozonización)

Figura 12. Comparación de los valores MID para *D. magna*.

En las Figuras 11 y 12 se puede observar la toxicidad más elevada de las muestras sin tratar (Inicial) de los cinco experimentos. La toxicidad se reduce a medida que aumenta el tiempo de tratamiento siendo la muestra final la de menor toxicidad sobre el microcrustáceo. En el Experimento 2 se observa una lenta disminución de la toxicidad a lo largo del tiempo de tratamiento, con respecto al resto de experimentos. De todas las muestras finales, la del Experimento 2 es la que ha presentado mayor toxicidad sobre *Daphnia* y de las muestras intermedias las de mayor toxicidad han sido las del Experimento 2 y 5 (1:91).

4.4. Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra *Eisenia fetida*

4.4.1. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante foto-Fenton

En la Figura 13 se muestran los valores en porcentaje de la reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras del Experimento 1 realizado con agua natural y en la Figura 14 los resultados obtenidos a partir de las muestras del Experimento 2 realizado con agua simulada de salida de EDAR.

En general, se observa una menor reducción de peso en las lombrices control, con un valor del 15%, a los 14 días del ensayo. En el Experimento 1 los gusanos expuestos a las muestras sin tratar presentan una reducción del 36,7% de su peso al finalizar el ensayo, con respecto al 24,3 y 25,4% de las muestras de 45 y 180 min, respectivamente. En la muestra de 180 min del Experimento 2 se recoge un valor del 23,3% de reducción frente al 36,6 y 34,9% en las muestras 45 min y 0 min, respectivamente. Por lo tanto, en el Experimento 1 la muestra con mayor efecto ha sido la muestra no tratada y en el Experimento 2 la muestra no tratada y la tratada durante 45 min.

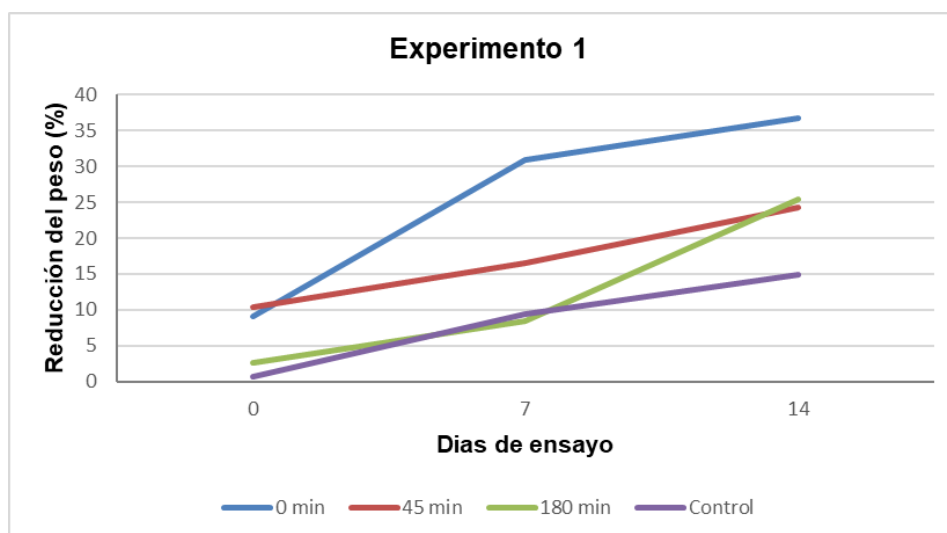


Figura 13. Reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras del Experimento 1, durante 14 días

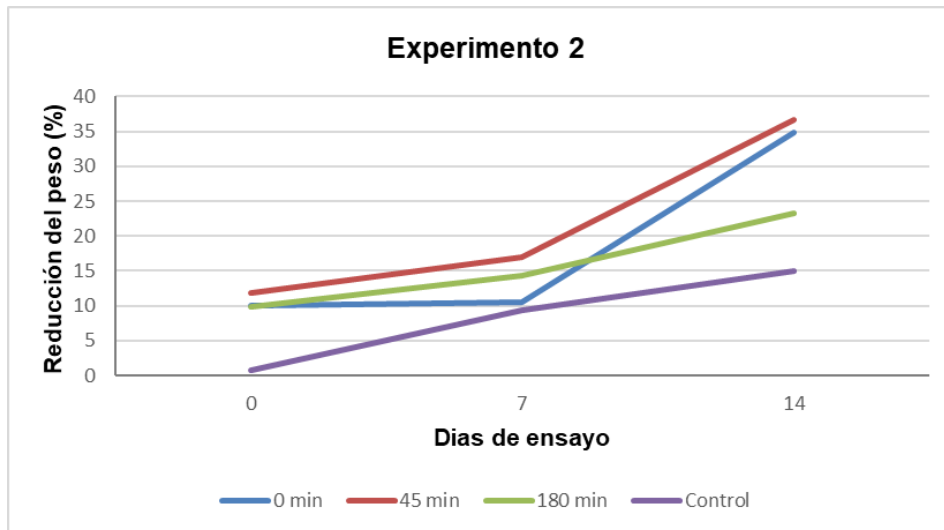


Figura 14. Reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras del Experimento 2, durante 14 días

4.4.2. Efecto de soluciones acuosas tratadas mediante ozonización

En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran los valores en porcentaje de la reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras de los Experimentos 3, 4 y 5, realizados con agua simulada de salida de EDAR, bajo diferentes condiciones.



Figura 15. Reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras del Experimento 3, durante 14 días

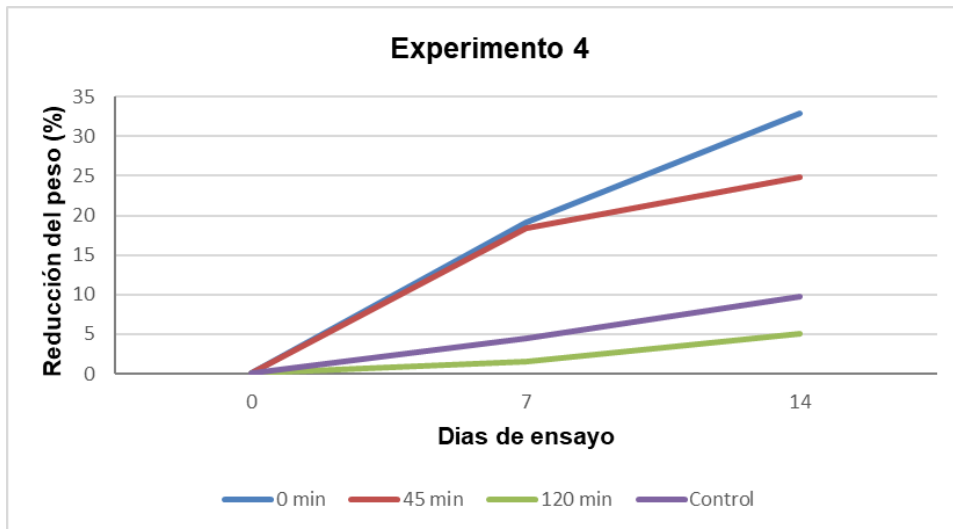


Figura 16. Reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras del Experimento 4, durante 14 días

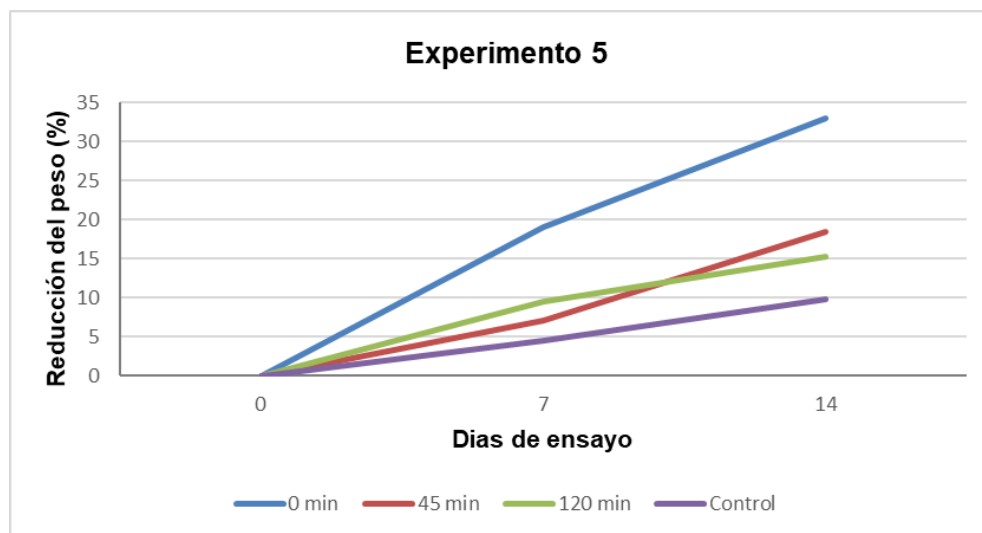


Figura 17. Reducción del peso de las lombrices expuestas a las muestras del Experimento 5, durante 14 días

En las Figuras se puede observar que la mayor reducción de peso corresponde a las lombrices expuestas a la muestra no tratada (32,9%) y en los Experimentos 3 y 4, además, a las lombrices expuestas a las muestras intermedias (25,3% y 24,9%). En el Experimento 5, la reducción de peso en las lombrices expuestas a las muestras tratadas fue similar (18,4% y 15,2%). En general, se observa una menor reducción de peso en las lombrices control, con un valor del 10%, a los 14 días del ensayo y en las muestras finales de los Experimentos 3 y 4.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran la elevada toxicidad de las muestras sin tratar de los cinco experimentos tanto para el alga como para el microcrustáceo. En general, en los ensayos realizados, la toxicidad se reduce a medida que aumenta el tiempo de tratamiento siendo la muestra final la de menor toxicidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gras (2015) en un estudio sobre la eficacia de tratamientos de oxidación avanzada en la descontaminación y detoxificación de aguas residuales industriales y urbanas mediante batería de ensayos de toxicidad. En un ensayo crónico, la muestra no tratada fue la más tóxica para *D. magna*; la toxicidad también disminuyó al aumentar el tiempo de tratamiento, aunque hubo tiempos intermedios en que aumentó debido a la aparición de metabolitos tóxicos.

Zhang et al. (2017) llevaron a cabo una evaluación de la toxicidad de aguas residuales urbanas y de hospitales utilizando una batería de bioensayos, a las que habían aplicado POAs. El agua sin tratar produjo una toxicidad elevada. Después del tratamiento las toxicidades se redujeron significativamente, lo que mejoró la calidad del agua. Sin embargo, todavía detectaron concentraciones traza de estrógenos con un riesgo potencial para la vida acuática. De forma similar, en este trabajo de investigación se detecta cierto grado de toxicidad en las muestras finales de algunos experimentos.

Valores de toxicidad (IC50), de cada contaminante de estudio, encontrados por Álvarez (2017) para *A. fischeri* fueron 27,7 mg/L, 11,3 mg/L, 0,4 mg/L y 13,8 mg/L para clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol y terbutrina, respectivamente. La mezcla de los cuatro compuestos mostró una toxicidad de 1,6 mg/L. En nuestro estudio la muestra sin tratar formada por una mezcla de los contaminantes a una concentración de 200 µg/L no produjo efecto tóxico sobre la bacteria.

En el mismo estudio con el alga *P. subcapitata*, Álvarez (2017) halló valores de toxicidad (EC50) de 8,9 mg/L para clorfenvinfos, de 2,3 mg/L para diclofenaco, de 8,9E⁻⁴ mg/L para pentaclorofenol y de 2,1E⁻³ mg/L para terbutrina. Para la mezcla de los cuatro compuestos obtuvo un valor EC₅₀ de 5,6E⁻³ mg/L. En nuestro trabajo la muestra sin tratar formada por una mezcla de los mismos contaminantes a una concentración de 200 µg/L cada uno, mostró una toxicidad del mismo orden, con valores EC50 comprendidos entre 2,1 y 12,5 mg/L, según las condiciones experimentales.

Soluciones acuosas contaminadas con fármacos antidepresivos produjeron mayor toxicidad sobre *P. subcapitata* que soluciones con cada componente individual (Minguez et al., 2018).

Calomarde (2017), en otro estudio, encontró valores LC₅₀ para *D. magna* de 0,1 mg/L expuesta a una solución acuosa con cinco contaminantes (clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, perfluorooctano y terbutrina). La muestra sin tratar, en nuestro trabajo, ha producido una toxicidad menor, con valores LC₅₀ comprendidos entre 3,1 y 6,3 mg/L, según las condiciones experimentales, lo cual es razonable teniendo en cuenta que esta muestra contenía cuatro contaminantes y no cinco.

Soluciones acuosas contaminadas con cinco compuestos (clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, perfluorooctano y terbutrina) produjeron un efecto significativo sobre la reducción de peso de la lombriz de tierra *E. fetida* y sobre la reproducción en un ensayo de toxicidad crónica realizado por Calomarde (2017). Además, la mezcla de los compuestos fue más tóxica que cada compuesto estudiado individualmente. En este trabajo, la mayor reducción de

peso correspondió a las lombrices expuestas a la muestra de los cuatro contaminantes no tratada.

Para los organismos estudiados, se han observado diferencias significativas respecto a los efectos tóxicos de las muestras ensayadas, lo que demuestra la necesidad de recurrir a una batería de bioensayos en los estudios de toxicidad. El organismo más sensible a las muestras contaminadas y tratadas bajo diferentes condiciones experimentales ha sido *D. magna* y el más resistente *A. fischeri*.

Hernando et al. (2006) evalúan la utilidad y validez de ensayos de toxicidad realizados con *A. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna* para controlar la calidad de aguas residuales. Concluyen que las baterías de ensayos pueden ser consideradas como herramientas analíticas de alta sensibilidad y el mejor enfoque para evaluar el riesgo del impacto tóxico de los efluentes en el medio ambiente acuático. El ensayo agudo con *D. magna* permitió detectar concentraciones ambientales de contaminantes a niveles tan bajos como ng/L. En cambio, la mayoría de muestras ambientales no fueron tóxicas para *A. fischeri*. Además, evaluaron efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos, indicando la capacidad de la prueba de toxicidad para evaluar la combinación de efectos de los contaminantes en las aguas residuales.

La eliminación de contaminantes presentes en las aguas residuales mediante Procesos de Oxidación Avanzada, como el foto-Fenton o la ozonización, actualmente, resulta costosa. Una forma de optimizar estos tratamientos para su aplicación en aguas residuales es determinar su toxicidad en las diferentes etapas de las que constan dichos tratamientos.

Ya que la toxicidad es una respuesta biológica, los valores obtenidos en un único bioensayo es una medida insuficiente del riesgo ambiental; por lo tanto, es recomendable utilizar una batería de ensayos, con organismos pertenecientes a diferentes eslabones de la cadena trófica, estandarizados y de comprobada fiabilidad. De este modo, se podrían reducir los costes operativos al predecir la etapa en la que se alcanza la completa detoxificación y la biocompatibilidad del agua tratada con el medio ambiente (Malato et al., 2003).

La información obtenida a partir de la bibliografía y en este trabajo de investigación demuestran la necesidad de realizar baterías de ensayos de toxicidad cuando se estudia la eficacia de los tratamientos de oxidación avanzada, particularmente, cuando se prevé una degradación incompleta con la consiguiente formación de subproductos, lo que llevaría a una ampliación de los tiempos de tratamiento. El uso de ensayos de toxicidad ha significado una importante mejora en la evaluación de los POAs debido a su elevada reproducibilidad, rapidez, bajo coste, etc. (Fernández-Alba et al., 2002).

5. CONCLUSIONES

1. La respuesta biológica de los organismos frente a las muestras contaminadas y tratadas bajo diferentes condiciones experimentales ha mostrado diferencias significativas, siendo el organismo más sensible *D. magna* y el más resistente *A. fischeri*.
2. De todas las condiciones experimentales, las muestras del Experimento 2, tratadas mediante foto-Fenton, han registrado una mayor toxicidad.
3. Los tratamientos foto-Fenton y ozonización han sido eficaces en la detoxificación de las muestras contaminadas, como muestra la disminución de la toxicidad sobre los organismos ensayados, sin embargo, las muestras finales presentaron cierta toxicidad, lo cual indica la posible formación de productos intermedios tóxicos. Sería necesario alargar los tiempos de tratamiento.
4. Una forma adecuada de evaluar la eficacia de los tratamientos de oxidación avanzada no se debe basar, únicamente, en la comprobación mediante técnicas analíticas de la reducción de los contaminantes sino también en demostrar la completa detoxificación mediante el uso de una batería de ensayos de toxicidad.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ NAVARRO, C. (2017). Evaluación de los riesgos ambientales de contaminantes de preocupación emergente en la Unión Europea. Trabajo Final de Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia
- AZAB, A. & KAMEL, M. (2016). Sensitive and selective fluorescent chemosensor for the detection of some organophosphorous pesticides using luminescent Eu (III) complex. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 321, 33-40.
- BARCELO, D. & PETROVIC, M. (2008). Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.
- BUTTIGLIERI, G., KNEPPER, T.P. (2008) Removal of emerging contaminants in wastewater treatment: conventional activated sludge treatment. En: *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 5 / 5S / 5S/2* (eds. Barceló D., Petrovic M.). Springer, Berlin, Heidelberg, Germany. pp, 1-35.
- CALOMARDE JUÁREZ, C. (2017). Valoración ecotoxicológica y actividad estrogénica de contaminantes de preocupación emergente o de riesgo significativo contenidos en la Directiva 2013/39/CE. Trabajo Final de Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
- CAMBRONERO, M., MARSHALL, H., MEESTER, L., DAVIDSON, T., BECKERMAN, A. P., & ORSINI, L. (2018). Predictability of the impact of multiple stressors on the keystone species *Daphnia*. *Scientific Reports*, 8. 17572 (<http://eprints.whiterose.ac.uk/140707/>).
- CALISI, A., ZACCARELLI, N., LIONETTO, M.G. & SCHETTINO, T. (2013). Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: Application to the monitoring of soil heavy metal pollution. *Chemosphere*, 90 (11), 2637-2644.
- CASTILLO, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), México.
- CUI, Y., LIANG, L., ZHONG, Q., HE, Q., SHAN, X., CHEN, K., & HUANG, F. (2017). The association of cancer risks with pentachlorophenol exposure: Focusing on community population in the areas along certain section of Yangtze River in China. *Environmental Pollution*, 224, 729-738.
- DALZELL, D.J.B., ALTE, S., ASPICHUETA, E., DE SOTA, A., ETXEBARRIA, J., GUTIERREZ, M., HOFFMANN, C.C., SLES, D., OBST, U. & CHRISTOFI, N. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, 47 (5), 535-545.
- DEBLONDE, T., COSSU-LEGUILLE, C., & HARTEMANN, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214 (6), 442-448.
- DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H., PAVLOVSKÝ, J., FIŠEROVÁ, L., & KOSÁROVÁ, H. (2018). Toxicity of Diclofenac: Cadmium Binary Mixtures to Algae *Desmodesmus subspicatus* Using Normalization Method. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 101 (2), 205-213.
- DOMÍNGUEZ, J., VELANDO, A. & FERREIRO, A. (2005) Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?. *Pedobiologia*, 9 (1), 81-87.
- ESCHER, B. I., ALLINSON, M., ALTENBURGER, R., BAIN, P. A., BALAGUER, P., BUSCH, W., CRAGO, J., DENSLow, N. D., DOPP, E., HILSCHEROVA, K., HUMPAGE, A. R., KUMAR, A., GRIMALDI, M., JAYASINGHE, B.S., JAROSOV, A B., JIA, A., MAKAROV, S., MARUYA, K.A., MEDVEDEV, A., MEHINTOM A. C., MENDEZ, J. E., POULSEN, A., PROCHAZKA, E., RICHARD, J., SCHIFFERLI, A., SCHLENK, D., SCHOLZ, S., SHIRAIISHI, F., SNYDER, S., SU, G., TANG,

- J. Y., VAN DER BURG, B., VAN DER LINDEN, S. C., WERNER, I., WESTERHEIDE, S. D., WONG, C. K., YANG, M., YEUNG, B. H., ZHANG, X., & LEUSCH, F. D. (2014). Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environmental Science Technology*, 48 (3), 1940-56.
- FERNANDEZ-ALBA, A.R., HERNANDO, D., AGÜERA, A., CÁCERES, J. & MALATO, S. (2002). Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research*, 36 (17), 4255-4262.
- FORERO, J. E., ORTIZ, O., & RÍOS, F. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. *CT&F Ciencia, Tecnología y Futuro*, 3 (1), 97-109.
- FRÍAS, S., SÁNCHEZ, M. J., & RODRÍGUEZ, M. A. (2004). Determination of triazine compounds in ground water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica*, 503 (2), 271-278.
- GINEBRADA, A., MUÑOZ, I., LÓPEZ DE ALDA, M., BRIX, R., LÓPEZ-DOVAL, J., & BARCELÓ, D. (2009). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, 36 (2), 153-162.
- GOSSET, A., WIGH, A., BONY, S., DEVAUX, A., BAYARD, R., DURRIEU, C., BROCCART, M., APPLAGNAT, M., & BAZIN, C. (2018). Assessment of longterm ecotoxicity of urban stormwaters using a multigenerational bioassay on *Ceriodaphnia dubia*: A preliminary study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53 (3), 244-252.
- GRAS ANDRÉS, CLARA. (2015). Eficacia de tratamientos de Oxidación Avanzada en la descontaminación y detoxificación de aguas residuales industriales y urbanas mediante batería de ensayos de toxicidad. Trabajo Final de Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
- GREGORIO, V., & CHÈVRE, N. (2014). Assessing the risks posed by mixtures of chemicals in freshwater environments: case study of Lake Geneva, Switzerland. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water* 1 (3), 229-247.
- HERNANDO, M. D., PETROVIC, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., & BARCELÓ, D. (2004). Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 1046 (1–2), 133-140.
- HERNANDO, M. D., MEZCUA, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., & BARCELÓ, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69 (2), 334-342.
- HUOVINEN, P., & GÓMEZ, I. (2017). Algas en ecotoxicología: Hacia el desarrollo de microbioensayos (<http://www.centroideal.cl/wp-content/uploads/2017/11/Rev-VD27-IDEAL.pdf>).
- IKEHATA, K., GAMAL EL-DIN, M., & SNYDER, S. (2007) Ozonation and Advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater. *Ozone: Science & Engineering. The Journal of the International Ozone Association*, 30 (1), 21-26.
- JHA, A. N. (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- JUGAN, M. L., OZIOL, L., BIMBOT, M., HUTEAU, V., TAMISIER-KAROLAK, S., BLONDEAU, J. P., & LÉVI, Y. (2009). *In vitro* assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 407 (11), 3579-3587.

- JUNGHANS, M., BACKHAUS, T., FAUST, M., SCHOLZE, M., & GRIMME, L. H. (2006). Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquatic Toxicology*, 76 (2), 93-110.
- JURADO, A., VAZQUEZ-SUÑE, E., CARRERA, J., LÓPEZ DE ALDA, M., PUJADES, E., & BARCELÓ, D. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment*, 440, 82-94.
- KATSUMATA, M., IKUSHIMA, Y., BENNETT, K., SATO, Y., TAKEUCHI, A., TATARAZAKO, N., & HAKAMATA, T. (2017). Validation of rapid algal bioassay using delayed fluorescence in an interlaboratory ring study. *Science of the Total Environment*, 605-606, 842-851.
- KIM, S. W., KIM, D., MOON, J., CHAE, Y., KWAK, J. I., PARK, Y., JEONG, S. W., & AN, Y. J. (2017). Earthworm dispersal assay for rapidly evaluating soil quality. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36 (10), 2766-2772.
- LEE, J., JI, K., LIM KHO, Y., KIM, P., & CHOI, K. (2011). Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (5), 1216-25.
- LEHOTAY, S. J. (2006). Multiclass, multiresidue analysis of pesticides. Strategies for pesticides. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation. Wiley, New York, USA.
- LONAPPAN, L., BRAR, S. K., DAS, R. K, VERMA, M., & SURAMPALLI, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environmental International*, 96, 127-138.
- LUO, Y., GUO, W., NGO, H. H., NGHIEM, L. D., HAI, F. I., ZHANG, J., LIANG, S., & WANG, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474, 619-641.
- MALATO, S., BLANCO, J., CAMPOS, A., CÁCERES, J., GUILLARD, C., HERMANN, J.M. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2003). Effect of operating parameters on the testing of new industrial titania catalysts at solar pilot plant scale. *Applied of Catalysis B: Environmental*, 42, 349-357.
- MEIER, J.R., CHANG, L.W., JACOBS, S., TORSSELLA, J., MECKES, M.C. & SMITH, M.K. (1997). Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (5), 928-938.
- MINGUEZ, L., BUREAU, R., & HALM-LEMEILLE, M.P. (2018). Joint effects of nine antidepressants on *Raphidocelis subcapitata* and *Skeletonema marinoi*: A matter of amine functional groups. *Aquatic Toxicology*, 196, 117-123.
- OLEA, N., FERNÁNDEZ, M.F., MARTÍN-OLMEDO, P. (2001). Disruptores endocrinos: el caso particular de los xenobióticos estrogénicos. II Estrógenos sintéticos. *Revista de Salud Ambiental*, 1 (2), 64-72.
- OLIVEIRA, C., ARMINDA, A. & MADEIRA, L. M. (2014). Treatment of water networks (waters and deposits) contaminated with chlorfenvinphos by oxidation with Fenton's reagent. *The Chemical Engineering Journal*, 241, 190-199.
- OLLER, I., MALATO, S., & SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review. *Science of the Total Environment*, 409 (20), 4141-66.
- OPPENLÄNDER, T. (2007) Photochemical Purification of Water and Air. Wiley-Vch Verlag, Weinheim, Germany.

- PANDARD, P., DEVILLERS, J., & CHARISSOU, A. (2006). Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment*, 363 (1-3), 114-125.
- PARVEZ, S., VENKATARAMAN, C., MUKHERJI, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environmental International*, 32 (2), 265-268.
- PICA GRANADOS, Y., & TRUJILLO DOMÍNGUEZ, G. (2005). Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) en *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelos. La experiencia en México* (Eds. Romero, P. & Mendoza, A.) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México DF, México, pp. 307-317.
- RIBEIRO, A. R., NUNES, O. C., PEREIRA, M. F., & SILVA, A. M. (2015). An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. *Environment International*, 75, 33-51.
- RÍOS, Y. (2005). Importancia de las Lombrices en la Agricultura. En: *Sistemas integrados de producción con especies no rumiantes. VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos* (eds. Nieves, D., Vivas, J., Zambrano, C.). Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel, Zamora, Venezuela.
- ROSELLÓ-MÁRQUEZ, G., FERNÁNDEZ-DOMENE, R. M., SÁNCHEZ-TOVAR, R., GARCÍA-CARRIÓN, S., LUCAS-GRANADOS, B., & GARCÍA-ANTÓN, J. (2019). Photoelectrocatalyzed degradation of a pesticide mixture solution (chlorfenvinphos and bromacil) by WO₃ nanosheets. *Science of the Total Environment*, 674, 88-95.
- ROTINI, A., MANFRA, L., TORNAMBÈ, A., COSSI, R., LAMUNNO, F., & BENVENUTO, G. (2017a). Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 852-860.
- ROTINI, A., MANFRA, L., SPANU, F., PISAPIA, M., CICERO, A. M., & MIGLIORE, L. (2017b). Ecotoxicological method with marine bacteria *Vibrio anguillarum* to evaluate the acute toxicity of environmental contaminants. *Journal of Visualized Experiments*, 123, e55211.
- SALANITRO, J.P. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*, 31, 1769-1776.
- SCHWARZENBACH, R. P., ESCHER, B. I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, C. A., VON GUNTEN, U., & WEHRLI, B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313 (5790), 1072-1077.
- STANISKIENE, B., MATUSEVICIUS, P., BUDRECKIENE, R., & SKIBNIEWSKA, K. A. (2006). Distribution of Heavy Metals in Tissues of Freshwater Fish in Lithuania. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 585-591.
- VELISEK, J., STARA, A., KOLÁŘOVÁ, J., & SVOBODOVA, Z. (2011). Biochemical, physiological and morphological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100 (3), 305-313.
- VERBRUGGE, L. A., KAHN, L., & MORTON, J. M. (2018). Pentachlorophenol, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzo furans in surface soil surrounding pentachlorophenol-treated utility poles on the Kenai National Wildlife Refuge, Alaska USA. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 19187-19195.
- VIENO, N., & SILLANPÄÄ, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - A review. *Environmental International*, 69, 28-29.

VILLARINI, M., SCASSELLATI-SFORZOLINI, G., MORETTI, M., & PASQUINI, R. (2000). *In vitro* genotoxicity of terbutryn evaluated by the alkaline single-cell microgel-electrophoresis "comet" assay. *Cell Biology and Toxicology*, 16(5), 285-292.

YANG, L., ZHA, J., & WANG, Z. (2017). Pentachlorophenol affected both reproductive and interrenal systems: *In silico* and *in vivo* evidence. *Chemosphere*, 166, 174-183.

ZHANG, K., ZHAO, Y. & FENT, K. (2017). Occurrence and Ecotoxicological Effects of Free, Conjugated, and Halogenated Steroids Including 17 α -Hydroxypregnanolone and Pregnanediol in Swiss Wastewater and Surface Water. *Environmental Science and Technology*, 51 (11), 6498–6506.