

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



VALORACIÓN DE TOXICIDAD EN AGUAS PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA CORCHERA TRATADAS MEDIANTE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNO/A: Amparo Valcárcel Alarcón

TUTOR/A: Consuelo Sabater Marco

COTUTOR/A: M^a Ángeles Castillo López

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, MARZO 2016



Datos personales:

Alumno/a: Amparo Valcárcel Alarcón

Datos del Trabajo Fin de Grado :

Título del TFG:	Valoración de toxicidad en aguas procedentes de la industria corchera tratadas mediante procesos de oxidación avanzada
Localidad y fecha:	Valencia, marzo 2016
Titulación:	Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural
Especialidad:	Recursos naturales y medioambiente
Tutor/a:	Consuelo Sabater Marco
Cotutor:	M ^a Ángeles Castillo López
Tipo de licencia:	Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”

Resumen

La presión creciente de los procesos de urbanización, desarrollo industrial y la utilización, en muchas ocasiones indiscriminada del agua, han provocado el deterioro de la calidad de las mismas. La principal fuente de contaminación es el vertido de aguas residuales de las industrias; esto se debe a que muchos de los tratamientos convencionales de descontaminación no consiguen eliminar algunos productos. Particularmente, resulta de interés las aguas procedentes de la industria del corcho ya que poseen una elevada carga orgánica difícil de eliminar con las técnicas actualmente utilizadas en las EDARs. De ahí la importancia de aplicar nuevas técnicas para eliminar este tipo de compuestos. Entre ellas, destacan los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) (foto-Fenton, ozonización, etc.). Dado que estos procesos pueden dar lugar a la aparición de compuestos intermedios, se hace necesario evaluar el impacto que tendrían las aguas tratadas de este modo sobre los ecosistemas y sus organismos. El propósito de este trabajo ha sido evaluar la toxicidad de un efluente procedente de una industria corchera, antes y después de ser sometido a diferentes tratamientos de POAs, mediante una batería de bioensayos. Este trabajo demuestra la eficiencia de los procesos de oxidación avanzada utilizado ya que, tras el tratamiento, se reduce el grado de toxicidad.

Palabras clave:

Toxicidad, aguas residuales, industria corchera, bioensayo, disrupción endocrina, POAs

Abstract:

Increasing pressure from urbanization processes, industrial development and the indiscriminate use of water in many occasions, have triggered the deterioration of the water quality. The main source of pollution is the discharge of waste water from industries. This is mostly because conventional decontamination treatments fail in the removal of some products. Particularly, it is interesting to pay attention to water from the cork industry because it has a high organic load which is difficult to get rid of with the techniques currently used in the WWTPs. Hence the importance of applying new techniques to remove such compounds. These processes include Advanced Oxidation Processes (AOPs) (photo-Fenton, ozonation, etc.). Because these processes can give rise to intermediate compounds, it is necessary to assess the impact that treated water would have on the ecosystems and its living organisms. The purpose of this study is to evaluate the toxicity of an effluent from a cork industry before and after being treated with different POAs techniques, by the use of a battery of bioassays. This work demonstrates the efficiency of the used advanced oxidation processes because after treatment, the degree of toxicity is reduced.

Keywords:

Toxicity, waste water, cork industry, bioassay, endocrine disruption, AOPs

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, Consuelo y M^a Ángeles, con las que he aprendido mucho y que me han guiado en los últimos meses .

A Laura, pese la distancia, siempre juntas.

A mi familia, en especial a mi hermana y a mis padres que me han dado lo que soy; mi carácter, mis principios, mis valores.

A Chema, por tu bondad, tu infinita paciencia, y por estar siempre a mi lado.

A Jacinto, quien aunque ya no está me sigue haciendo sonreír.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 PROBLEMÁTICA CONTAMINACIÓN HÍDRICA	6
1.2 LA INDUSTRIA DEL CORCHO	6
1.3 PROBLEMAS DE CONTAMINACIÓN ASOCIADOS A LA INDUSTRIA DEL CORCHO.....	7
1.4 PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA	8
1.4.1 Basados en ozono	10
1.4.2 Procesos foto-Fenton	11
1.5 UTILIZACIÓN DE BIOENSAYOS EN ESTUDIOS DE TOXICIDAD	11
1.5.1 Bioensayos basados en organismos acuáticos	12
1.5.2 Bioensayos basados en microcrustáceos.....	13
1.5.3 Bioensayos basados en organismos terrestres.....	13
1.5.4 Bioensayos basados células animales: citotoxicidad	13
1.5.5 Uso de microorganismos genéticamente modificados	14
1.5.5.1 Medida de la Actividad estrogénica	14
1.5.5.2 Medida de la actividad dioxin-like.....	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1 MUESTRAS	18
3.2 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD	19
3.2.1 Ensayo de toxicidad con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	19
3.2.2 Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	21
3.2.3 Ensayo de toxicidad con <i>Eisenia fetida</i>	22
3.2.4 Ensayo Citotoxicidad.....	23
3.2.5 Ensayo RYA	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 ENSAYO DE TOXICIDAD CON <i>P.SUBCAPITATA</i>	28
4.2 ENSAYO DE TOXICIDAD CON <i>D.MAGNA</i>	30
4.3 ENSAYO DE TOXICIDAD CON <i>E.FETIDA</i>	32
4.4 ENSAYO DE CITOXICIDAD CON LÍNEAS CELULARES ANIMALES.....	33
4.5 ENSAYO DE TOXICIDAD RYA.....	37
4.5.1 Valoración de la actividad de disrupción endocrina.....	37
4.5.2 Valoración de la actividad <i>dioxin-like</i>	37
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40
7. ANEXOS	44
7.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES UTILIZADAS EN LOS BIOENSAYOS	44
7.2 EQUIPOS UTILIZADOS.....	47
7.3 ENSAYO DE TOXICIDAD CON <i>P. SUBCAPITATA</i> PARA LAS MUESTRAS A DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO	50
7.3.1 ANOVA Simple. Tiempo de tratamiento (minutos) según dilución de la muestra (mg/L).....	50
7.3.1.1 0 min.....	50
7.3.1.2 0 min pre	51
7.3.1.3 FF 90 min	52

7.3.1.4 FF 180 min	53
7.3.1.5 O ₃ 15 min.....	54
7.3.1.6 O ₃ 60 min.....	55
7.3.2 Análisis PROBIT: Determinación del valor MID.....	56
7.3.2.1 0 min.....	56
7.3.2.2 0 min pre	58
7.3.2.3 FF 90 min	59
7.3.2.4 FF 180 min	61
7.3.2.5 O ₃ 15 min.....	62
7.3.2.6 O ₃ 60 min.....	64
7.4 ENSAYO DE TOXICIDAD CON <i>D.MAGNA</i> PARA LAS MUESTRAS A DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO	66
7.4.1 ANOVA Simple. Tiempo de tratamiento (minutos) según dilución de la muestra (mg/L).....	66
7.4.1.1 0 min.....	66
7.4.1.2 0 min pre	67
7.4.1.3 FF 90 min	68
7.4.1.4 FF 180 min	69
7.4.1.5 O ₃ 15 min.....	70
7.4.1.6 O ₃ 60 min.....	71
7.4.2 Análisis PROBIT: Determinación del valor MID.....	72
7.4.2.1 T 0 min.....	72
7.4.2.1 0 min pre	74
7.4.2.3 FF 90 min	75
7.4.2.4 FF 180 min	77
7.4.2.5 O ₃ 15 min.....	79
7.4.2.6 O ₃ 60 min.....	80
7.5 ENSAYO DE TOXICIDAD CON CÉLULAS 3T3 PARA LAS MUESTRAS A DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO	83
7.5.1 ANOVA Simple. Tiempo de tratamiento (minutos) según dilución de la muestra (mg/L).....	83
7.5.1.1 0 min.....	83
7.5.1.2 0 min pre	84
7.5.1.3 FF 90 min	85
7.5.1.4 FF 180 min	86
7.5.1.5 O ₃ 15 min	87
7.5.1.6 O ₃ 60 min	88
7.5.2 Análisis PROBIT: Determinación del valor MID.....	89
7.5.2.1 T 0 min.....	89
7.5.2.2 T 0 min pre	90
7.5.2.3 FF 180 min	92
7.5.2.4 O ₃ 60 min.....	93
7.6 ENSAYO DE TOXICIDAD CON CÉLULAS N2A PARA LAS MUESTRAS A DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO	95
7.6.1 ANOVA Simple. Tiempo de tratamiento (minutos) según dilución de la muestra (mg/L).....	95
7.6.1.1 0 min.....	95
7.6.1.2 0 min pre	96
7.6.1.1 FF90 min.....	97
7.6.1.4 FF180 min.....	98
7.6.1.5 O ₃ 15 min	99
7.6.1.6 O ₃ 60 min	100
7.6.2 Análisis PROBIT: Determinación del valor MID.....	101

7.6.2.1 0 min.....	101
7.6.2.2 0 min pre	102
7.6.2.3 FF90 min.....	104
7.6.2.4 O ₃ 60 min.....	105
7.6.2.5 FF 180 min	107
7.7 ENSAYO DE TOXICIDAD CON CÉLULAS HEK PARA LAS MUESTRAS A DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO	109
7.7.1 ANOVA Simple. Tiempo de tratamiento (minutos) según dilución de la muestra (mg/L)	109
7.7.1.1 0 min.....	109
7.7.1.2 0 min pre	110
7.7.1.3 FF 90 min	111
7.7.1.4 FF 180 min	112
7.7.1.5 O ₃ 15 min.....	113
7.7.1.6 O ₃ 60 min.....	114
7.7.2. Análisis PROBIT: Determinación del valor MID.....	115
7.7.2.1 0 min.....	115
7.7.2.2 0 min pre	116
7.7.2.3 O ₃ 60 min.....	117
7.7.2.4 FF 180 min	118
7.8 ENSAYO DE TOXICIDAD RYA.....	120
7.8.1 Actividad de disrupción endocrina - ensayo RYA-ER	120
7.8.2 Actividad <i>dioxin-like</i> - ensayo RYA-AhR	126

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación de fenoles mediante radicales hidroxilo	8
Figura 2. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto estrogénico a su receptor específico (ER). Ensayo RYA-ER con detección colorimétrica (Routledge y Sumpter, 1996).	15
Figura 3. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto con actividad <i>dioxin-like</i> a su receptor específico (AhR). Ensayo RYA-AhR (Céspedes <i>et al.</i> , 2010).	16
Figura 4. Disposición de las distintas diluciones de la muestra analizadas y controles en la microplaca.	26
Figura 5. Ecuaciones para el cálculo de equivalentes	27
Figura 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>P.Subcapitata</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	29
Figura 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>P.Subcapitata</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	30
Figura 8. Porcentajes de inmovilización de <i>D.magna</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	31
Figura 9. Porcentajes de inmovilización de <i>D.magna</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	31
Figura 10. Respuesta neta (%) (media \pm SD) de individuos de <i>E. fétida</i> expuestos a las distintas muestras. .	32
Figura 11. Porcentajes de viabilidad de las tres líneas celulares para la dilución 1:1 de las muestras.	35
Figura 12. Porcentajes de viabilidad de las tres líneas celulares para la dilución 1:1 de las muestras.	35
Figura 13. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	44
Figura 14. Hembra de <i>Daphnia magna</i>	45
Figura 15. <i>Eisenia fetida</i>	46
Figura 16. Imagen al microscopio de un cultivo de células 3T3	46
Figura 17. Imagen al microscopio de un cultivo de células HEK 293	47
Figura 18. Imagen al microscopio de un cultivo de células N2a	47
Figura 19. Lector de microplacas TECAN Infinite M200	48
Figura 20. Cámara climatizada	48
Figura 21. Cámara Cuentaglóbulos	49
Figura 22. Sistema de vacío	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Potenciales de oxidación de especies oxidantes	9
Tabla 2. Principales tecnologías de procesos de oxidación avanzada	9
Tabla 3. Caracterización de las aguas.....	18
Tabla 4. Caracterización del agua del corcho después del pretratamiento.....	18
Tabla 5. Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> expuesta a las muestras de ensayo.....	28
Tabla 6. Valores LID y MID de <i>P. subcapitata</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	29
Tabla 7. Porcentaje de inmovilización de <i>D.magna</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	30
Tabla 8. Valores LID y MID de <i>D.magna</i> expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.....	32
Tabla 9. Viabilidad de la línea celular 3T3 expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	33
Tabla 10. Viabilidad de la línea celular N2a expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	34
Tabla 11. Viabilidad de la línea celular HEK expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.	34
Tabla 12. Valores LID de las tres líneas celulares.....	36
Tabla 13. Valores MID de las tres líneas celulares.	36
Tabla 14. Actividad estrogénica (EEQ de E2) de las muestras de agua.	37
Tabla 15. Actividad estrogénica (EEQ de BNF) de las muestras de agua.	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMÁTICA CONTAMINACIÓN HÍDRICA

La escasez hídrica es un problema global, afecta tanto a países desarrollados, en vías y subdesarrollados; aunque en estos últimos causa estragos.

Del agua total en el planeta solo el 2,5 % es agua dulce, pero sólo el 0,4 % está disponible en aguas superficiales y en la atmosfera y por lo tanto disponible para el consumo humano (Shiklomanov y Rodda , 2003). Su adecuado uso y su posterior depuración son vitales para el ser humano y el mantenimiento del medio ambiente.

El agua dulce del planeta es destinada principalmente para uso agrícola, uso industrial y uso domestico, aunque el uso industrial aumenta considerablemente según el nivel económico del país.

En los países desarrollados la problemática no está en sí en la escasez, sino en la presencia de contaminantes en el agua, introducidos principalmente por acción humana, y sobre todo por actividades industriales.

Las aguas residuales urbanas e industriales cuando se vierten a dominio públicos pueden llevar unos niveles de contaminación orgánica e inorgánica muy altos y superiores a los que el ecosistema puede asimilar y autodepurar. Causan una gran preocupación la presencia de metales pesados, disolventes, plaguicidas pero todavía son más peligrosos los contaminantes emergentes. Los contaminantes emergentes comprenden un grupo diverso de compuestos químicos, incluyendo productos farmacéuticos, drogas de abuso, productos de cuidado personal, esteroides y hormonas, agentes tensoactivos, compuestos perfluorados, aditivos industriales y agentes y aditivos de la gasolina, así como sus productos de transformación (US. EPA, 2002). Además de una alta toxicidad, estas sustancias se caracterizan por una alta persistencia medioambiental y alta lipofilicidad, lo que da como resultado una bioacumulación en la cadena trófica, incrementando el riesgo medioambiental y para la salud humana.

Los contaminantes emergentes no están contemplados en los actuales reglamentos de calidad del agua, no se han estudiado antes y se cree que son posibles amenazas para los ecosistemas y para la seguridad y salud humana.

Las líneas de investigación han de adaptarse a la problemática actual, y si antes se centraban en detectar los efectos directos e individuales de los contaminantes a corto plazo en el ecosistema, ahora estos se enfocan en la evaluación de los efectos crónicos que no son detectados hasta después de un largo periodo de tiempo. Por ello en la actualidad cada vez son más utilizados los bioensayos, los cuales han demostrado tener ventaja sobre los ensayos químicos tradicionales (Oller *et al.*, 2011).

1.2 LA INDUSTRIA DEL CORCHO

El alcornocal es un ecosistema con una de las mayores biodiversidades de la Península Ibérica. En total se calcula que existen alrededor de 2,5 millones de hectáreas de alcornocal en el mundo; el 27% de las cuales se encuentran en España, principalmente en Andalucía, Extremadura y Cataluña. En el presente, un 23% de todo el corcho que se produce en el mundo (aprox. 375 mil toneladas al año) tiene su origen en España (aprox. 78 mil toneladas) (ICMC-Junta Extremadura).

Las industrias corcheras son el grupo industrial con mayor potencial del sector forestal debido al aumento constante de los precios, lo cual genera una explotación beneficiosa del producto (Barroso *et al.*, 1998).

Las aplicaciones del corcho son diversas: en construcción, como aislante térmico, en la industrias del frío, automovilística, química y farmacéutica como suberina y ceras, aunque principalmente se utiliza en la industria del embotellado, en tapones de vino y cava. Teniendo en cuenta la importancia de la industria

vinícola en España, en los últimos años, se han realizado diversos esfuerzos para incrementar los controles de calidad de estos tapones, con un especial interés en cómo los cambios en la composición del corcho afectan a la calidad del producto final (Benitez *et al.*, 2003).

La cadena de producción consta de varias etapas desde la extracción de las planchas (corteza del árbol) hasta la obtención del producto final. La primera operación que se realiza es el descorche que se efectúa desde mediados de abril a finales de octubre. De media, un alcornoque es sometido a 16 sacas a lo largo de sus aproximadamente 200 años de vida. Las sacas se realizan cada 9-20 años a partir de que el árbol tiene entre 25 y 30 años.

Después de la extracción de las planchas, éstas son separadas en función de su calidad, y amontonadas de manera que permanecen expuestas a las inclemencias meteorológicas como sol, viento, lluvia durante aproximadamente seis meses. Tras este periodo de tiempo, los factores atmosféricos eliminan gran parte de la savia del corcho, los polifenos se oxidan y la textura del corcho se estabiliza. Tras ello, las planchas de corcho son cocidas en agua limpia (aproximadamente a 98 °C) durante al menos una hora. Esta cocción mejora la elasticidad del corcho, elimina posibles tensiones internas del mismo, lo ablanda, aumenta hasta un 20% en volumen, pierde peso y gana espesor. Después las planchas permanecerán en reposo de dos a cuatro semanas con niveles de humedad y temperatura controlados; en algunos casos se procesa en ambientes cerrados, como depósitos de hormigón, acero e incluso autoclaves con sistema CCV (captador continuo de volátiles como TCA u otros) (Remacha, 2008).

Finalmente las planchas de corcho son recortadas en láminas rectangulares que se separan en base a su espesor y calidad para, posteriormente, ser perforadas para la producción de tapones.

1.3 PROBLEMAS DE CONTAMINACIÓN ASOCIADOS A LA INDUSTRIA DEL CORCHO

Pese a que la industria del corcho puede ser considerada como ecológica ya que el corcho es un material natural no contaminante y reciclable; en el proceso de cocción, antes citado, se hidrolizan componentes naturales del corcho como lignina y compuestos tanínicos o clorados que se transforman entre otros en pentaclorofenol, 2,4,6- tricloroanisol y ácidos polifenólicos, grupo de sustancias químicas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol.

Químicamente, los fenoles son compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo (OH) como grupo funcional. La débil acidez del grupo fenólico ha determinado que estas sustancias sean agrupadas químicamente junto a los ácidos carboxílicos y a los taninos, conformando así el grupo de los ácidos orgánicos. Las concentraciones naturales de compuestos fenólicos son usualmente inferiores a 1 µg/L y los más habituales son los fenoles, cresoles y los ácidos siríngico, vainílico y p-hidroxibenzoico. Respecto de su incidencia con el medio ambiente, es una sustancia nociva para los organismos acuáticos, provocándoles efectos adversos de distinta magnitud en función de la concentración a la que se encuentren expuestos. Esta sustancia está clasificada como Compuesto Orgánico Volátil (VOC) y puede contribuir potencialmente a la formación de ozono troposférico, dañino para los cultivos, la fauna y el hombre.(EINECS,2015).

Los compuestos tanínicos contienen grupos funcionales fenólicos, agrupaciones moleculares complejas de gran peso molecular, generalmente solubles en agua, e insolubles en la mayoría de solventes orgánicos que producen soluciones de carácter coloidal y no son cristalizables. La actividad de los taninos causa gran impacto negativo sobre la fisiología de las células debido a su capacidad de formar complejos con sus componentes celulares: carbohidratos, proteínas, polisacáridos, membranas y enzimas, por ello es muy necesario que el agua procedente de la industria corchera no sea vertidas directamente sobre aguas de origen natural (Escárcega, 2001). Se ha demostrado la toxicidad de los taninos sobre bacterias anaerobias, actividad relacionada con la función de aquéllos en las plantas: inhibir a los microorganismos patógenos. Por lo tanto, no es de extrañar, que dichas aguas puedan ser tóxicas para las bacterias que realizan la depuración (Sorlini *et al.*, 1986), impidiendo la biodegradación de estas moléculas en los digestores anaerobios.

Por cada tonelada de corcho tratado se generan unos 400 L de agua residual (Mendoza *et al.*, 2007). Esta agua se caracteriza por una DQO y DBO altas, y un pH alrededor de 5. Entre los componentes fenólicos que contienen, encontramos los ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, sirínico, ferúlico y eláico, así como fracciones de ácidos tánicos (Oller *et al.*, 2011).

Estos componentes polifenólicos son de descomposición complicada, potentes toxinas y peligrosos contaminantes orgánicos. El vertido de estas aguas al medioambiente puede provocar graves efectos de toxicidad en los ecosistemas, ya que en la mayoría de los casos son vertidas al dominio público o a ríos o lagunas después de un proceso de depuración insuficiente.

1.4 PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA

La cantidad de contaminantes tóxicos que contienen las aguas residuales de procedencia industrial afectan seriamente al desarrollo natural de los ecosistemas. Tradicionalmente estas aguas han sido tratadas por métodos químicos y biológicos comunes, pero la efectividad de estos métodos es cada vez más limitada, sobretodo cuando se trata de aguas con gran carga orgánica.

Como respuesta a la actual demanda ambiental para la depuración de aguas residuales de la industria, en los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías que tienen en cuenta factores como la naturaleza y las propiedades físico-químicas del sistema, así como las posibilidades de reutilización, rentabilidad económica y eficiencia de los procesos y sus rangos de aplicación.

Para lograr una eficiente depuración se requiere la combinación de, por una parte tratamientos convencionales, en los que se consigue eliminar sólidos en suspensión, materia orgánica biodegradable y algunos microcontaminantes, y por la otra, el uso de Procesos de Oxidación Avanzada (POAs), los cuales han demostrado su eficacia en aguas con concentraciones de contaminantes tóxicos no biodegradables muy altas (> 1 g/L), o muy bajas (< 5 mg/L).

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 uso de especies transitorias con un elevado poder oxidante como el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$). En la Figura 1 podemos observar como los radicales hidroxilo reaccionan con los grupos fenoles. Este radical puede ser generado por varios medios y es altamente efectivo para la oxidación de materia orgánica, en especial aquella que no es biodegradable. 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 (Legrini *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993). En la Tabla 1 se presentan los potenciales de oxidación de distintas especies químicas. Se observa que después del flúor, el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) es el oxidante más potente.

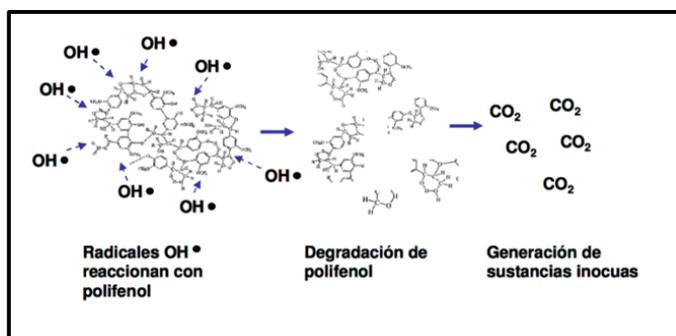


Figura 1. Degradación de fenoles mediante radicales hidroxilo

La Tabla 1 presenta los potenciales de oxidación de distintas especies, se observa que tras el flúor, el oxidante más potente es el HO•.

Tabla 1. Potenciales de oxidación de especies oxidantes

Especie	Eo (V,25°C)	Especie	Eo (V,25°C)
Flúor	3,03	Radical perhidróxilo	1,70
Radical hidroxilo	2,80	Permanganato	1,68
Oxígeno atómico	2,42	Dióxido de cloro	1,57
ozono	2,07	Acido hipocloroso	1,49
Peróxido de hidrogeno	1,78	cloro	1,36

Existen diferentes tecnologías de oxidación avanzada, algunas de las cuales son evaluadas a escala de laboratorio y planta piloto (Tabla 2). Existen diferentes tipo de POAs, tales como ozonización, fotocátalisis, proceso Foto-Fenton, utilización de ultrasonidos, oxidación húmeda, etc., y la mayoría de ellos pueden ser potenciados a través de la acción de la luz UV. Los POAs generalmente pueden usarse solos o combinados entre ellos, pudiendo ser aplicados también a contaminantes de aire y suelos (Forero *et al.*, 2005).

Tabla 2. Principales tecnologías de procesos de oxidación avanzada

Oxidación	Oxidación en agua sub/supercrítica
Ozono/ peróxido de hidrógeno	Fotólisis ultravioleta de vacío(UVV)
Procesos Fenton	Ultravioleta / peróxido de hidrógeno
Oxidación electroquímica	Ultravioleta/ ozono
Plasma no térmico	Fotólisis/ fenton
Ultrasonido	Foto catálisis heterogénea

Ventajas de los POAs respecto a los métodos tradicionales:

- Transforman y destruyen químicamente el contaminante hasta la mineralización, consiguiendo porcentajes de mineralización altos.
- En general, no generan subproductos que requieran posterior procesamiento.
- Son muy útiles para contaminantes refractarios que resisten otros métodos de tratamiento, principalmente el biológico.
- Operan en rangos donde los sistemas convencionales no son factibles.
- Pueden tratar contaminantes presentes en muy baja concentración.
- Además, se cree que son ideales como tratamiento previo a una depuración biológica que es más barata y capaz de depurar mayor caudal.
- Son técnicas poco selectivas. Se pueden tratar mezclas de contaminantes

La oxidación parcial de los contaminantes orgánicos puede dar como resultado la formación de componentes intermedios más tóxicos que el original. Para evitar esto, los POAs deben ser realizados y

monitorizados cuidadosamente, y deben acompañarse de test de toxicidad para evaluar el efluente resultante (Rizzo *et al.*, 2009; Klamerth *et al.*, 2010).

Debido al tratamiento que las muestras de este estudio han recibido nos centraremos en los métodos de ozonización y Foto-fenton.

1.4.1 Basados en ozono

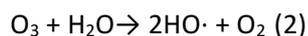
El ozono es un gas con un alto poder de oxidación (Tabla 1), sin embargo, como es inestable se ha de generar *in situ*. Además de ser un buen oxidante, es un buen desinfectante que no forma intermedios peligrosos como ocurre con el cloro. Esta última característica hace de la ozonización un tratamiento excelente para ser acoplado a un proceso biológico.

El ozono en solución acuosa puede reaccionar con la mayoría de los contaminantes presentes en aguas residuales industriales por dos vías:

1. Por reacción directa del ozono molecular a través de una reacción lenta y selectiva (Ecuación 1):



2. Por reacción de las especies formadas por la descomposición del ozono en el agua (Ecuación 2) (radicales libres en medio alcalino-rápido y no selectiva), (Masten *et al.*, 1994 ; Hoigné y Bader, 1977):



La predominancia de una u otra vía depende fuertemente del pH de la disolución a tratar. A pH bajo, el ozono es el agente oxidante principal, y reacciona exclusivamente con compuestos que presentan determinados grupos funcionales (OH, CH₃, OCH₃, dobles enlaces C=C) a través de reacciones por vía directa. A pH elevado y en presencia de especies como cationes metálicos, el ozono se descompone y genera radicales hidroxilo que reaccionan de manera no selectiva (vía indirecta). Generalmente, a pH<4 domina el mecanismo directo, entre pH=4 y pH=9 tienen lugar los dos tipos, y a pH>9 prevalece la ozonización indirecta.

La eficiencia del proceso de ozonización puede ser mejorada por procesos que incluyan radiación ultravioleta (UV), procedimiento conocido como ozonización fotolítica. En este proceso se pueden generar radicales hidroxilo de dos formas diferentes. En primer lugar la fotólisis del ozono en medio acuoso produce dos radicales hidroxilo que se combinan para dar peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno se descompone en radicales hidroxilo al ser irradiado. Además el ozono acelera la descomposición del peróxido de hidrógeno en más radicales hidroxilo.

Otra opción para aumentar la capacidad oxidativa del ozono es la adición de catalizadores en medio homogéneo (Fe²⁺, Cu²⁺) o en heterogéneo (semiconductores tipo TiO₂, ZnO); ambas opciones pueden ir acompañadas por la radiación UV. Se consiguen tasas de degradación mucho mayores que con el ozono, y además si se emplean catalizadores heterogéneos éstos pueden ser separados y reutilizados nuevamente.

La oxidación de las especies químicas presentes en el agua por parte del ozono es de especial interés en el presente trabajo ya que los fenoles son un grupo de sustancias potencialmente susceptibles a la ozonización. Los productos fenólicos (el fenol, los compuestos fenol-sustituídos, las quinonas y los polifenoles) se caracterizan por la presencia de un grupo donador de OH sobre el núcleo aromático. Este radical los hace fuertemente reactivos hacia el ozono de ahí que su oxidación, relacionada con el tratamiento de agua potable y el manejo de agua de desecho, haya sido extensamente estudiada (Masten *et al.*, 1994).

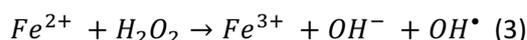
Dependiendo de su estructura, la reacción de los compuestos fenólicos se incrementa cuando la densidad electrónica en el anillo aromático es mayor y decrece con el tamaño del sustituyente. También se ha demostrado que la velocidad de reacción se incrementa a un valor de pH alto debido a la disociación del fenol en iones fenatos.

1.4.2 Procesos foto-Fenton

El proceso foto-Fenton es un proceso de fotocatalisis solar homogénea, que se ha desarrollado con el fin de ser utilizado como tratamiento terciario en las EDARs, y conseguir una mayor eliminación de microcontaminantes en los efluentes.

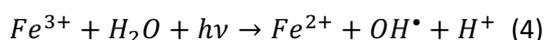
El proceso foto-Fenton se basa en la reacción Fenton (Ecuación 3) tradicional, y en la mezcla de sales de hierro (II) y peróxido de hidrógeno conocida como reactivo Fenton.

En la reacción Fenton tradicional el ión ferroso inicia y cataliza la descomposición del H_2O_2 dando lugar a la generación de radicales hidroxilo ($\bullet OH$) mediante una serie de complejas reacciones en cadena (Neyens *et al.*, 2003). Esta serie de reacciones da lugar a la mineralización de los compuestos orgánicos a CO_2 , H_2O e iones inorgánicos. Al mismo tiempo, los radicales $\bullet OH$ pueden formar de nuevo H_2O_2 o reaccionar con el H_2O_2 para formar agua y radicales hidroperóxido ($HO_2\bullet$), que son mucho menos reactivos que los $\bullet OH$ y, por lo tanto, reducen la eficiencia del proceso. Por este motivo, la concentración de H_2O_2 es un parámetro que debe optimizarse de forma que toda la cantidad se utilice de forma eficiente.



En esta reacción Fenton, los iones Fe^{3+} se van acumulando en el sistema a medida que los iones Fe^{2+} se consumen y la reacción finalmente se detiene.

Se ha observado que la velocidad de degradación de los contaminantes orgánicos se ve considerablemente aumentada cuando el reactivo Fenton se combina con la radiación UV-Visible debido a la regeneración continua del Fe^{2+} , como consecuencia del mecanismo de fotorreducción del Fe^{3+} (Ecuación 4), y la generación de Fe^{2+} y de nuevos radicales hidroxilo ($\bullet OH$) a partir de H_2O_2 (Pignatello *et al.*, 1992). Este proceso se conoce como foto-Fenton.



En el proceso foto-Fenton, los complejos de Fe^{3+} que se suelen formar en solución ácida son el $Fe(OH)^{2+}$ y $Fe_2(OH)_2^{4+}$, que absorben luz UV y visible. Estos complejos sufren una fotorreducción para dar lugar a radicales $\bullet OH$ y Fe^{2+} logrando que éste siga reaccionando con los radicales $\bullet OH$ existentes, o los que se adicionaron al agregar nuevas cantidades de H_2O_2 al sistema continuando así la reacción de oxidación.

Los parámetros que influyen en el proceso foto-Fenton son pH, concentración inicial de H_2O_2 y concentración inicial de $Fe(II)$.

1.5 UTILIZACIÓN DE BIOENSAYOS EN ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Tradicionalmente, el efecto que tenían los contaminantes descargados en el medio ambiente era evaluado mediante ensayos químicos o parámetros físicos. De este modo, técnicas como HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) o GC-MS (Cromatografía de gases acoplada a detector de masas) eran frecuentemente utilizadas, pero su elevado coste económico, largos tiempos de análisis, personal cualificado y la escasa información que aportan sobre su toxicidad han exigido la elaboración de otros análisis llamados bioensayos (Girotti *et al.*, 2008).

Los ensayos de toxicidad son los bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, un organismo, o grupo de organismos como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Los criterios de selección de las especies se fundamentan en: alta y constante sensibilidad a tóxicos, alta disponibilidad, estabilidad genética y uniformidad de poblaciones, representatividad de su nivel trófico, amplia distribución e importancia económica y facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

Son procedimientos experimentales controlados y estandarizados en los cuales se controlan las condiciones bióticas (especie, edad) y abióticas (temperatura, humedad, intensidad lumínica, duración e intensidad de la exposición, composición físico-química del medio). Esta estandarización y protocolarización en el desarrollo de los experimentos permite, de una parte, poder fijar mejor los factores que influyen sobre la respuesta de los organismo y, de otra, poder comparar los resultados obtenidos entre diferentes poblaciones y laboratorios (Volatier, 2004; Clément, 2006).

Se expone a un grupo de individuos de una especie a una serie de dosis crecientes de un xenobiótico; el efecto buscado es la mortalidad y el parámetro ecotoxicológico es la dosis o concentración letal 50 (DL₅₀ o CL₅₀). Además se dispone de grupos de control (que no se exponen al tóxico). Por otro lado, están los ensayos a largo plazo, de ciclo de vida o de toxicidad crónica cuya duración oscila entre 7 días y uno o varios meses. Este tipo de test nos proporciona mayor fiabilidad y nos aporta información sobre aquellas sustancias tóxicas que actúan más lentamente, produciendo efectos crónicos sobre la reproducción y el desarrollo. Los parámetros más importantes son NOEC/NOAEL (No Observed Effect Concentration/No Observed Adverse Effect Level) o LOEC/LOAEL (Lowest Observed Effect Concentration/Lowest Observed Adverse Effect Level). Un ensayo definitivo de toxicidad crónica puede utilizarse para estimar el tiempo requerido para producir un efecto al 50% de los organismos (TE₅₀), a una concentración específica (Esclapés, 1999; Serrano Gallego, 2003; Girotti *et al.*, 2008).

No existe un ensayo ni un organismo universal. La mayoría de biosensayos emplean bacterias (procariotas) y células eucariotas. Las bacterias y otros microorganismos tienen la ventaja de presentar rutas bioquímicas similares a las de los organismos superiores, ciclos de vida cortos y además responden rápidamente a los cambios en el medio ambiente, por lo que son de gran utilidad en ensayos de toxicidad. También son de gran utilidad organismos superiores como microcrustáceos, mejillones, algas unicelulares, plantas y sus semillas, peces. Ya que las especies del mismo o de diferente nivel trófico responden de manera distinta a las sustancias tóxicas, es de gran importancia desarrollar múltiples bioensayos de toxicidad usando diversos organismos (Dalzell *et al.*, 2002).

En el Anexo 7.1 se describen principales características de las especies utilizadas en los bioensayos de este trabajo.

1.5.1 Bioensayos basados en organismos acuáticos

Las microalgas, como componentes del fitoplancton, constituyen el grupo de productores primarios que son fundamentales en todos los ecosistemas acuáticos, cualquier efecto nocivo sobre esta comunidad podrá generar alteraciones en la estructura y el funcionamiento del ecosistema. Este nivel trófico determina la productividad del ecosistema y permite el desarrollo de consumidores de diferentes niveles tróficos, es por ello que resulta importante evaluar los efectos sobre este grupo de organismos, siendo la tasa de crecimiento una respuesta sensible y fácil de monitorear, se puede evaluar la disminución de dicha respuesta como un indicador del estrés al cual están sujetas las poblaciones de microalgas.

Los test algales son generalmente sensibles, rápidos y de coste efectivo (Walsh, 1988; Nalewajko y Olaveson, 1998). Por estas razones han sido utilizados frecuentemente en estudios ambientales y aplicados en diferentes contextos. Los ensayos de toxicidad con algas son también test obligatorios para la notificación de químicos en los países de la Unión Europea.

En general, para la evaluación de tóxicos en ambientes acuáticos se utilizan especies del grupo de las clorófitas o algas verdes. Las especies algales más comúnmente utilizadas en ensayos de toxicidad son: *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes *Selenastrum capricornutum*), *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Cyclotella* spp., *Nitzschia* spp. En muchos estudios ambientales se selecciona un grupo de especies microalgales que representan una amplia variedad de sensibilidad para un amplio espectro de sustancias tóxicas (Lewis, 1990).

1.5.2 Bioensayos basados en microcrustáceos

El zooplancton constituye una comunidad clave. Sus componentes poseen un rol central en las tramas tróficas, y su elevada sensibilidad a los cambios físicos y químicos del medio los tornan adecuados para su utilización como bioindicadores. Si bien pertenecen a diversos grupos funcionales, en conjunto contribuyen al transporte de materia y energía desde los niveles tróficos inferiores hacia los superiores. Intervienen activamente en el reciclado de materia orgánica disuelta, se alimentan de algas, detritos u otros microorganismos y son el principal recurso de numerosos peces e invertebrados acuáticos (Ortiz *et al.*, 2006).

Los cladóceros y copépodos pertenecen al grupo de los microcrustáceos del zooplancton y dada su gran sensibilidad, son los más utilizados en estudios ecotoxicológicos si se los compara con otros miembros de dicha comunidad. Además, su pequeño tamaño, cortos períodos generacionales y facilidad para los cultivos les otorgan relevancia y practicidad para estudios experimentales y de impacto ambiental (Gaete y Paredes 1996). En este sentido, permiten evaluar no sólo los efectos directos, sino también el impacto indirecto de los contaminantes o estresores ambientales, otorgando mayor representatividad a los resultados obtenidos y estimaciones a largo plazo (Boyd 2010).

1.5.3 Bioensayos basados en organismos terrestres

Los organismos que viven en el suelo, por su diversidad y su capacidad de adaptación a condiciones diversas, pueden desempeñar múltiples funciones de gran importancia para el sistema: acción mecánica (mezcla de material orgánico, diseminación de organismos dentro del suelo, etc.) o química (degradación de compuestos orgánicos, mineralización, etc.). Asimismo, algunos de ellos pueden actuar como indicadores de calidad de suelo, ya que pueden tener diferentes grados de sensibilidad a distintos cambios, midiendo el grado de desequilibrio ecológico causado por el contaminante (Otero, 2002). Entre los organismos terrestres que más pueden verse afectados por los plaguicidas, se encuentran las lombrices, de gran importancia por su contribución tanto a la fertilidad del suelo como a la degradación de la materia orgánica.

Las lombrices son unas magníficas bioindicadoras de la salud relativa de los organismos del suelo. Son fáciles de obtener, bastante numerosas y están siempre en contacto con el sustrato en el que viven. Otra ventaja es que las lombrices pueden responder a diferentes concentraciones de contaminantes, debido a una uniforme distribución de receptores sensitivos a lo largo del cuerpo, lo que hace que estos animales sean representativos del suelo y aptos para test de toxicidad (Haque y Ebing, 1983).

1.5.4 Bioensayos basados células animales: citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular. La toxicidad en tejidos y células se define como una alteración de las funciones celulares básicas debido a efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos. A través de estímulos las células pierden su equilibrio homeostático, que puede causar su adaptación o sufrir un proceso regresivo o morir.

La supervivencia celular depende de la capacidad del organismo para sustituir las células lesionadas o muertas o reparar los tejidos.

Con las pruebas de citotoxicidad *in vitro*, se puede analizar el comportamiento de las células en un ambiente controlado, siendo posible evaluar: inhibición del crecimiento celular; permeabilidad de membrana, replicación y transcripción del ácido ribonucleico, síntesis de proteínas, hormonas y enzimas, metabolismo energético, transformación celular, mutagénesis y carcinogénesis, entre otros (Freshney, 2011).

El amplio uso de líneas celulares y su utilización para la caracterización y desarrollo de compuestos con actividades sobre sistemas biológicos es cada vez más creciente.

Es muy importante utilizar líneas celulares que se encuentren libres de la presencia de contaminantes biológicos como bacterias, hongos, micoplasmas o virus. Por otra parte, se debe conocer su morfología natural, mantener una viabilidad alta y determinar su tasa de multiplicación lo que permite monitorizar las líneas y así confiar en la calidad de los procesos de almacenamiento prolongado, lo que garantiza contar con sistemas reproducibles (Freshney, 2011).

Los ensayos con células de mamíferos han desempeñado un importante papel para identificar y caracterizar los potenciales efectos biológicos de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre, tanto farmacológicos como tóxicos.

1.5.5 Uso de microorganismos genéticamente modificados

Existen en la actualidad diferentes ensayos de toxicidad en el que se utilizan microorganismos genéticamente modificados, entre ellos, el denominado RYA (Recombinant Yeast Assay) que utiliza levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* modificadas para la detección de actividad estrogénica y/o *dioxin-like*.

1.5.5.1 Medida de la Actividad estrogénica

El ensayo de levadura recombinante (RYA) es uno de los más convenientes para evaluar el potencial de disrupción endocrina de una sustancia o de una muestra ambiental (Céspedes *et al.*, 2004).

La levadura recombinante fue desarrollada por Routledge y Sumpter del departamento de Genética de Glaxo (Inglaterra) (Routledge y Sumpter, 1996). Se trata de un organismo del que se conoce totalmente su genoma, además, es considerado como modelo de célula eucariótica. La modificación a la que se sometió consiste en la adición de un receptor estrogénico humano en el ADN de la levadura (hER- α) instalándose como un gen cromosomal, y un gen reportero a nivel plasmidial (Lac-Z), el cual codifica para la síntesis del enzima β -galactosidasa gracias a la ayuda de un promotor transcripcional o elemento de respuesta estrogénica (ERE) y a un promotor fuerte (PGk) (Roda *et al.*, 2006).

La presencia de un contaminante con potencial estrogénico es detectado por la levadura. El contaminante se une al receptor hormonal (hER), el cual estimula al activador transcripcional y se expresa el gen reportero (gen *LacZ*) produciéndose el enzima β -galactosidasa, el cual sale al medio y actúa sobre un sustrato cromógeno. El producto de la reacción se detecta mediante colorimetría o fluorescencia. La cinética de la aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producido, que a su vez se relaciona con la concentración del compuesto estrogénico (Noguerol *et al.*, 2006) (Figura 2).

Los ensayos RYA no permiten la caracterización química exacta de los ligandos de los receptores hormonales, es decir, del compuesto con actividad disruptiva endocrina, sólo la detección y cuantificación de la actividad total, agonista o antagonista de un compuesto dado o de la muestra que lo contiene. Sin embargo, el uso de levaduras para estudiar la estrogenicidad tiene muchas ventajas por su bajo coste, fácil manipulación y crecimiento rápido en el laboratorio, lo que proporciona la oportunidad de probar un gran número de muestras o compuestos pobremente caracterizados así como evaluar simultáneamente su toxicidad aguda (Noguerol *et al.*, 2006; Céspedes *et al.*, 2004).

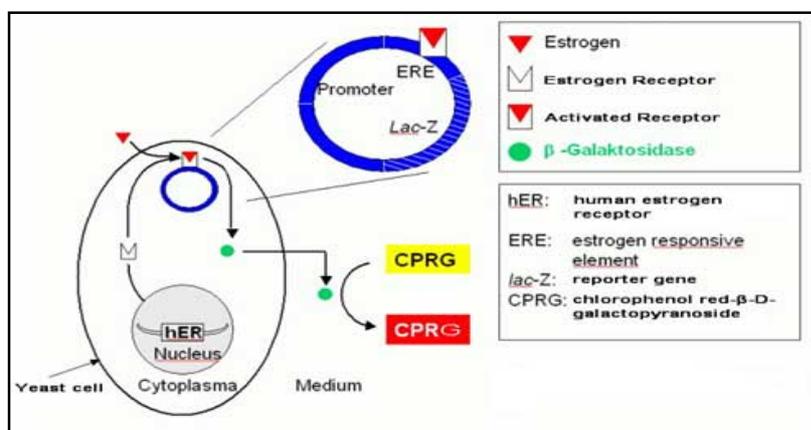


Figura 2. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto estrogénico a su receptor específico (ER). Ensayo RYA-ER con detección colorimétrica (Routledge y Sumpter, 1996).

Estudios previos han indicado que el uso de ensayos basados en levaduras modificadas genéticamente es una metodología altamente fiable para un primer nivel de cribado en la evaluación de la calidad del agua en términos de actividad estrogénica (Reddy y Brownawell, 2005; Schmitt *et al.*, 2005; Pawlowski *et al.*, 2003). En la actualidad, estos bioensayos se utilizan principalmente con fines de investigación dentro de la vigilancia ambiental (Tollefsen *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2004). Sin embargo, un enfoque diferente consistiría en cribar muestras ambientales desconocidas para su actividad estrogénica total sin conocimiento de la presencia de compuestos individuales. En este enfoque, la idea es usar el ensayo como un método de selección previo a su análisis químico, por lo tanto, básicamente, debe dar respuestas afirmativas o negativas respecto a si hay o no actividad hormonal. Las muestras con una respuesta positiva pueden ser analizadas adicionalmente por técnicas cromatográficas para identificar y cuantificar los compuestos activos. El propósito de este tipo de pruebas es realizar una eliminación rápida y barata de muestras que tienen bajas actividades estrogénicas y permitir así un mayor análisis en profundidad de las muestras que dan una clara respuesta positiva en el bioensayo (Brix *et al.*, 2010).

Con este tipo de ensayo se pueden detectar una gran variedad de compuestos estrogénicos ya que el hER no sólo se une a esteroides femeninos, como 17- β -estradiol y sus derivados, sino que puede unirse a otros tipos de estructuras químicas con efectos feminizantes. Gran cantidad de compuestos naturales, farmacéuticos o industriales como plaguicidas, presentan actividad estrogénica, es decir, pueden actuar como ligandos del hER y dar positivo en el ensayo (Noguerol, 2007; Céspedes *et al.*, 2004).

1.5.5.2 Medida de la actividad dioxin-like

El sistema endocrino de los seres humanos y animales se ve afectado también por compuestos similares a las dioxinas (*dioxin-like*). Estas sustancias siguen un patrón de respuesta similar a los disruptores endocrinos, uniéndose a receptores específicos de aril-hidrocarburos (AhR).

A tal efecto se ha desarrollado un método similar al anterior en el que la levadura tiene integrado en el cromosoma un promotor GAL (galactosa), el translocador ARNt y el receptor AhR (Miller, 1999). El receptor AhR forma un complejo con el compuesto *dioxin-like* (Figura 3). El translocador ARNt se une a dicho

complejo formando una estructura que se une al elemento de respuesta a xenobióticos XRE e inicia la transcripción del gen reportero *LacZ*. La presencia de ARNt hace que el complejo tenga el tamaño suficiente para ocupar el centro activo de la polimerasa y activarla. Se ha demostrado que sin ARNt los ligandos de pequeño tamaño no actúan en la transcripción del gen *LacZ* (Figura 3).

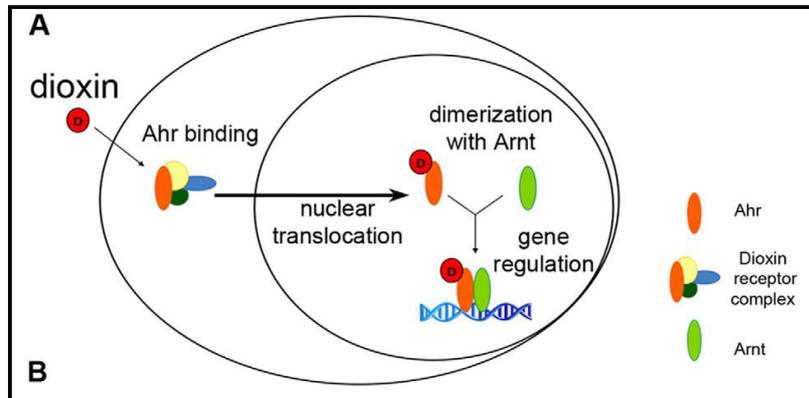


Figura 3. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto con actividad *dioxin-like* a su receptor específico (AhR). Ensayo RYA-AhR (Céspedes *et al.*, 2010).

Aunque este ensayo puede servir como una herramienta útil en la identificación de sustancias químicas, la opinión general es que no sólo un ensayo *in vitro* puede determinar la actividad disruptiva de una sustancia química, ya que no se tiene en cuenta la acumulación de estas sustancias en el organismo, el metabolismo y la disponibilidad de los componentes en la célula diana. Por eso se propone este tipo de ensayos como un componente útil dentro de una estrategia *in vitro-in vivo* para encontrar los efectos de disrupción endocrina (Gaido *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este trabajo de investigación han sido:

Determinar la toxicidad de una muestra de agua residual, procedente de la industria del corcho, tratada a diferentes tiempos mediante los procesos de ozonización y fotofenton, utilizando una batería de bioensayos.

Evaluar la eficacia de los tratamientos de ozonización y fotofenton, a diferentes tiempos, en la detoxificación de aguas residuales procedentes de la industria del corcho.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los ensayos realizados en este trabajo de investigación se han realizado en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN). A continuación se detalla la procedencia de las muestras a ensayar, así como la metodología empleada y las características de los ensayos.

3.1. MUESTRAS

Las muestras provienen de agua residual industrial procedente de la fabricación de corcho en una industria de San Vicente de Alcántara en Badajoz (Extremadura, España). Los procesos de oxidación (tratamientos) de las muestras de agua han sido llevados a cabo en el Departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy (EPSA) de la Universidad Politécnica de Valencia.

La Tabla 3 muestra las características de las muestras antes de ser sometidas a los procesos de oxidación avanzada.

Tabla 3. Caracterización de las aguas

Parámetro	mg/L
COT*	862,5
DQO*	3695
DQO	2550

*filtrado por 0,45µm;
pH 5,84

Las aguas originales fueron sometidas a un pretratamiento consistente en un proceso de coagulación, floculación, sedimentación y filtración.

Se llenan vasos de precipitado de 1L con la muestra, y se le añade:

- Coagulante (1,5 g/L): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (P.M = 270,30gr/Mol)
- Floculante (0,5 g/L): Polielectrolito magnafloc (0,3 ppm, pH=7)

Los vasos de precipitado se ponen en el Jar-test 3 minutos a 100 rpm para que se produzca una mezcla rápida, y otros 30 minutos a 30 rpm para que se dé una mezcla lenta. A continuación se dejan sedimentar los sólidos en suspensión durante 30 minutos, y se procede a la filtración, que se realiza dos veces a través de bomba de vacío con papel de filtro. La Tabla 4 refleja los parámetros obtenidos tras el tratamiento.

Tabla 4. Caracterización del agua del corcho después del pretratamiento.

Parámetro	mg/L	% Eliminado
COT filtrado*	165,2	80,0
DQO filtrado*	640	74,9
DQO sin filtrar	826	73,64

* Se ha utilizado un filtro de 0,45µ
pH 3,16

Previamente a la realización de los ensayos de citotoxicidad y RYA, las muestras se filtran al vacío a través de papel Whatman nº1 y se concentran en un sistema de vacío (Extra Vac 12, Scharlab) (Anexos 7.2; Figura 22) mediante cartuchos SPE (Solid Phase Extraction) (ExtraBond EBH 500 mg, 6 mL, Scharlab). Los cartuchos son previamente acondicionados con 10 mL de Hexano, seguido de 10 mL de diclorometano, 10 mL de metanol y 15 mL de agua MiliQ a un flujo de 5 mL/min. Todos los disolventes utilizados son grado HPLC (J.T Baker).

Un volumen de 500 mL de muestra de agua se filtra a través de los cartuchos a un flujo aproximado de 10 mL/min. El cartucho es finalmente lavado con 5 mL de agua MiliQ y se seca al vacío durante 30 minutos. Los compuestos son eluidos del cartucho con 10 mL de diclorometano:hexano (1:1), seguido de 10 mL de diclorometano:acetona (1:1). El disolvente es evaporado mediante rotavapor (SELECTA). El extracto seco obtenido se reconstituye en un volumen final de 500 µL de metanol. Las muestras se mantienen a -4°C hasta su ensayo.

Las muestras que se citan en el texto siguen la siguiente nomenclatura:

- 0 min: muestra inicial no tratada.
- 0 min pre: muestra inicial no tratada, pero sometida a un proceso de coagulación, floculación, sedimentación y filtración.
- O₃ 15 min: muestra 0 min pre sometida a ozonización durante 15 minutos.
- O₃ 60 min: muestra 0 min pre sometida a ozonización durante 60 minutos.
- FF 90 min: muestra 0 min pre sometida a foto-Fenton durante 90 minutos.
- FF 180 min: muestra 0 min pre sometida a foto-Fenton durante 180 minutos.

3.2. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

Se han seleccionado distintos tipos de bioensayos en los que se han determinado diferentes parámetros de toxicidad: bioensayo de toxicidad aguda con el alga verde unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata*, bioensayo de toxicidad aguda con el microcrustáceo *Daphnia magna*, bioensayo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente (RYA) y bioensayo de citotoxicidad con las líneas celulares HEK, N2a y 3T3.

3.2.1 Ensayo de toxicidad con *Pseudokirchneriella subcapitata*

Procedimiento

La evaluación de la toxicidad aguda de las muestras de agua residual tratada sobre el alga *P. subcapitata* se ha llevado a cabo de acuerdo a la normativa UNE-EN ISO 8692(2004), adaptado a microplaca. El objetivo del ensayo es determinar la inhibición del desarrollo del alga expuesta a diferentes diluciones de las soluciones acuosas durante 72 horas. Este tipo de alga es adecuada para realizar pruebas para estimar el potencial de fitotoxicidad de muestras líquidas (Díaz-Báez *et al.*, 2004).

En primer lugar, se realiza la movilización del alga, ya que ésta se suministra inmovilizada en una matriz, utilizando el medio Matrix dissolving Medium, agitando y centrifugando varias veces, para finalmente, resuspenderla en el medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium). El cultivo madre se mantiene en matraces de 250 mL, en la cámara climatizada a 22 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 horas, bajo una intensidad luminosa de 1100 lux y en agitación continua mediante agitador orbital. El cultivo madre se renueva cuando alcanza la fase exponencial de crecimiento, y los matraces se tapan con tapones permeables al aire para permitir el intercambio gaseoso

El medio de cultivo utilizado en la desinmovilización del alga, en el cultivo madre y en los ensayos de toxicidad ha sido el medio BBM específico para clorofíceas que cumple los requisitos indicados en el

protocolo ISO 8692(2012). Este medio ha sido utilizado en otros ensayos de toxicidad con microplacas (Ramos *et al.*, 1996).

Composición del medio nutritivo BBM, empleado en los bioensayos:

Solución A:

- $NaNO_3$ 2,5 g/L
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,25 g/L
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,75 g/L
- K_2HPO_4 0,75 g/L
- KH_2PO_4 0,25 g/L

Solución B:

- $NaFe EDTA$ 5,0 g/L
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,18 g/L
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,022 g/L
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,01 g/L
- $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0064g/L

Solución C:

- Tiamina 0,2 g/L
- Biotina 0,01 g/L
- B_{12} 0,01 g/L

Para reconstituir un litro de medio BBM, se toman 100 mL de la solución Bristol, 2 mL de la solución B y 2 mL de la solución C, ajustando el volumen final con agua ultrapura 1L.

Siguiendo el protocolo, todas las muestras a ensayar se ajustan a un pH comprendido entre 7,0 y 8,0, añadiendo NaOH (1M) o HCl (1M).

Los ensayos de toxicidad con *P. subcapitata* se realizan en microplacas de 96 pocillos transparentes, de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA). Cada ensayo consta de ocho réplicas del control negativo (medio de cultivo y algas), ocho réplicas de cada dilución (muestra, medio de cultivo y algas) y ocho blancos (medio de cultivo).

Las diluciones ensayadas de las muestras de aguas residuales tratadas han sido 1:1,25, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12, 1:16 y 1:24. Las microplacas se llenan utilizando el módulo inyector automático del lector de placas Tecan Infinite M200, siendo el volumen final de ensayo de 300 µL/pocillo.

Cada pocillo, excepto los blancos, han sido inoculados con el alga, a una concentración inicial de 104 células/mL. Una vez terminado el llenado de la placa se introducen, individualmente, en una bolsa de plástico transparente que se sella y se satura con CO₂; las microplacas de ensayo se incuban en la cámara climatizada LMS, a 24 ± 1°C, bajo iluminación continua (6000-10000 lux) y en agitación orbital (120 rpm.).

El crecimiento del alga se determina, con el lector de placas Tecan Infinite M200(Anexo7.2, Figura 19) , a través de la medida de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila, a 430 nm and 663 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente, cada 24 horas, hasta un total de 72 horas de incubación.

Procesamiento de resultados

Una vez obtenidos los datos de fluorescencia, se transforman en valores de concentración celular (Nº células/mL), mediante la ecuación de regresión lineal $y=129,27x+6971,7$ ($R^2=0,99$; $p<0,005$), correspondiente a la curva de calibrado obtenida previamente por (Meliá ,2013).

En cada ensayo de toxicidad, los valores de concentración celular obtenidos para cada dilución (muestra y control) y tiempo de ensayo, se utilizan para calcular las curvas de crecimiento y los porcentajes de inhibición del desarrollo del alga. El efecto de las muestras de ensayo sobre el desarrollo del alga se determina por el método de comparación de áreas bajo las curvas de crecimiento, según la Ecuación 5:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{(n-1)} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{(n-1)}) \quad (5)$$

Donde,

A es el área bajo la curva de crecimiento

N0 es el nº de células/mL nominal a un tiempo t0

N1 es el nº de células/ml medidas a un tiempo t1

Nn es el nº de células/mL medidas a un tiempo tn

t1 es el tiempo de la primera tras el comienzo del ensayo

tn es el tiempo de la medida enésima tras el comienzo del ensayo

El porcentaje de inhibición del crecimiento del alga para cada dilución de la muestra de ensayo (IA) se calcula como la diferencia entre el área bajo la curva de crecimiento del control (Ac) y el área bajo la curva de crecimiento de la dilución (At) según la Ecuación 6:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \quad (6)$$

Los datos expresados como porcentajes de inhibición del desarrollo se han analizado mediante ANOVA para determinar diferencias significativas entre los diferentes niveles de dilución y los controles, de cada muestra estudiada y para calcular los valores LID (mínima dilución sin efecto). El test de Fisher (LSD) se ha utilizado para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, para cada nivel de dilución ($p < 0.05$) (Statgraphics Plus v. 5.1).

Cuando ha sido posible, los datos expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento del alga se han utilizado también para calcular los valores MID (dilución que produce un 50% de respuesta) y sus intervalos de confianza al 95%, mediante análisis Probit, utilizando el programa estadístico SPSS (v. 16.0).

3.2.2 Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Procedimiento

El ensayo de toxicidad aguda se basa en la determinación de la inhibición de la movilidad del cladóceros causada por la exposición a las muestras. Para ello se ha seguido el protocolo UNE-IN.ISO 6341(2013).

Los individuos de *Daphnia magna* que se emplean para la realización de este ensayo tienen menos de 24 horas y proceden de la eclosión de los huevos de resistencia (efipias) suministradas por la empresa EcoTest S.L. (Valencia). Para lograr su eclosión, se siguen las instrucciones del ensayo para Ecotoxicidad DaphToxKit F TM.

El cultivo de las efipias de *Daphnia* debe realizarse cuatro días antes de iniciar el ensayo de toxicidad. Para ello, hay que vaciar el contenido de un vial de efipias en un tamiz y lavar abundantemente con agua corriente para eliminar cualquier traza de medio en el que vienen almacenadas. Seguidamente se transfieren a una placa Petri de 9-10 cm de diámetro con 12 mL de medio de reconstitución

La composición del medio de reconstitución química es la siguiente:

- 11,76 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 4,93 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 2,59 g/L de NaHCO_3 y 0,23 g/L de KCl

A continuación, las efipias se incuban a 22° C bajo iluminación constante (3000-4000 lux, 3-4 tubos fluorescentes de 8 W a 20-25 cm de distancia) en la cámara climatizada. Una vez obtenidos los neonatos de menos de 24 h ya se puede iniciar el ensayo de toxicidad aguda.

Las condiciones físico-químicas del agua de reconstitución utilizada en el ensayo de inmovilización de dafnias fueron las siguientes: pH $7,8 \pm 0,2$, dureza total de 250 ± 25 mg/L (expresados en CaCO_3), concentración de oxígeno disuelto superior a 7 mg/L, y temperatura de 22 ± 1 °C.

Las diluciones ensayadas para las muestras de las soluciones acuosas tratadas han sido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32.

Las placas utilizadas en los ensayos de toxicidad aguda son placas transparentes, de fondo plano y de 12 pocillos . Para cada muestra, se prepara una placa de lavado y se llena cada pocillo con 10 mL de las diluciones preparadas. A cada pocillo de lavado se transfieren entre 20 y 25 neonatos. De esta manera se logra prevenir la dilución de la muestra durante la transferencia de los neonatos a los pocillos de ensayo, disminuyendo el error por dilución. A continuación, se transfieren cinco individuos a los pocillos de ensayo con 10 mL de la dilución correspondiente. La transferencia de los neonatos a los pocillos se hace con la ayuda de una pipeta de plástico con un orificio adecuado para no dañar los organismos. Se realizan 2 ensayos por muestra con 4 réplicas por dilución más 8 réplicas control.

Las placas se incuban a 22 °C y en oscuridad. Los organismos no se alimentan durante el ensayo. Se realiza un recuento de los individuos inmóviles (y muertos), a las 24 y 48 horas de ensayo. Se consideran inmóviles aquellos individuos que tras una ligera agitación del recipiente no se desplazan en los 15 segundos siguientes.

Procesamiento de resultados

Los porcentajes de inhibición de la movilidad se han analizado mediante ANOVA para determinar diferencias significativas entre los diferentes niveles de dilución y los controles, para cada muestra estudiada y, para calcular los valores NOEC (máxima concentración ensayada sin efecto observable) y los valores LID (mínima dilución sin efecto) de las muestras. Estos análisis se han realizado con el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

Cuando ha sido posible, los datos expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento del alga se han utilizado también para calcular los valores MID (dilución que produce un 50% de respuesta) y sus intervalos de confianza al 95%, mediante análisis Probit, utilizando el programa estadístico SPSS (v. 16.0).

3.2.3 Ensayo de toxicidad con *Eisenia fetida*

Procedimiento

La evaluación de la toxicidad de las seis muestras sobre la lombriz *E. fetida* se ha realizado de acuerdo a la normativa ISO 17512-1(2008). El objetivo del ensayo es determinar la evitación o repulsión del gusano de los sustratos contaminados por las muestras de corchero no tratadas y tratadas.

Para la realización del ensayo se han utilizado recipientes de cristal de 15 cm de diámetro y 7 cm de altura, con una capacidad de 500 mL. Cada recipiente se divide en dos compartimentos iguales con un separador de cartón o plástico y se llena cada parte con 200 g del sustrato de ensayo (Anexo 2). A una de las partes se añaden 50 mL de la solución acuosa del plaguicida en estudio y a la otra parte 50 mL de agua destilada (control), mezclando cuidadosamente cada parte, hasta obtener una masa homogénea. A continuación se quita el separador y se colocan 10 lombrices, previamente purgadas durante 24 horas, en el surco medio que deja el separador al quitarlo .

Todos los recipientes se precintan con film de plástico para evitar que las lombrices escapen. El papel se perfora con pequeños agujeros (1-2 mm) para permitir el intercambio de aire y evitar una excesiva pérdida de humedad del sustrato durante el ensayo. Los recipientes se incuban en la cámara climatizada, a 23±1°C, durante 48 horas.

Tras 48 horas de ensayo, el separador se coloca de nuevo en la línea media, con cuidado para no dañar las lombrices, y se cuentan las lombrices que están en cada parte

Las lombrices que se utilizan en los ensayos de toxicidad se seleccionan de las bandejas de purga, a simple vista, en base a la presencia de clitelo y al tamaño (4-5 mm). Estas lombrices se lavan con agua destilada para eliminar la tierra y se secan cuidadosamente evitando dañarlas.

Procesamiento de resultados

Para cada réplica de ensayo, la respuesta de evitación se calcula de acuerdo a la Ecuación 7 :

$$A = [(n_c - n_t)/N] \times 100 \quad (7)$$

Donde,

A es la respuesta de evitación (%)

n_c es el número de lombrices en el suelo control

n_t es el número de lombrices en el suelo contaminado y

N es el número total de lombrices en cada recipiente de ensayo.

Una respuesta positiva indica evitación por el compuesto y una negativa, atracción por el compuesto.

3.2.4 Ensayo Citotoxicidad

Procedimiento

Para la evaluación de la citotoxicidad de las muestras de agua se ha seguido el protocolo CellTiter-Blue® Cell Viability Assay de Promega. El objetivo del ensayo es determinar la viabilidad celular de las líneas 3T3, HEK, N2a expuestas a diferentes diluciones de las muestras no tratadas y tratadas mediante ozonización y foto-Fenton.

Para el mantenimiento de las células y para el ensayo de citotoxicidad se ha utilizado medio DMEM (4,5 g de D-glucosa/L) suplementado con 20% de suero fetal bovino, 2% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina. En todos los casos las células han crecido en un incubador, a 37°C y en una atmósfera con el 5% de CO₂. Todos los pasos descritos a continuación se realizan en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar.

Antes de iniciar el ensayo de citotoxicidad se preparan, en primer lugar, los subcultivos de las células en placas Petri tratadas, se dejan crecer en el incubador y cuando están subconfluentes se tripsinizan y se prepara una suspensión celular de $1 \cdot 10^5$ células/mL. También se preparan diferentes diluciones de cada una de las muestras concentradas con PBS (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 y 1:128).

El ensayo de citotoxicidad se realiza en placas transparentes y con fondo en U, de 96 pocillos, tratadas para el cultivo de células. Se llena cada pocillo de la placa con 100 µL de la suspensión celular, excepto los pocillos de la primera columna que se llenan con 100 µL de PBS (blanco negativo). Trás 24 horas de incubación se añaden, a cada pocillo, 30 µL de la dilución correspondiente; se realizan 8 réplicas control (blanco positivo) y 8 réplicas de cada una de las diluciones. Como las muestras concentradas están en metanol también se realizan 8 réplicas con 30 µL de metanol cada una. Se incuban las placas otras 24 horas. Después de este tiempo de incubación se aspira el medio de los pocillos y se añade medio fresco que contiene el compuesto resazurin (Alamar Blue) a una concentración X mM. Finalmente, se incuban las placas durante 3 horas y se mide la fluorescencia (Ex560/Em590) en el lector multifuncional Tecan Infinite M200.

Procesamiento de resultados

Con los datos de fluorescencia obtenidos se calculan los porcentajes de viabilidad celular, tomando como referencia el crecimiento de los controles, con un 100% de viabilidad.

3.2.5 Ensayo RYA

Procedimiento

Los ensayos de toxicidad realizados consisten en valorar la actividad estrogénica y la actividad dioxin-like de las muestras tratadas mediante ozonización.

Los organismos utilizados en los ensayos de toxicidad RYA pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para el ensayo de estrogenicidad se utiliza la cepa BY4741 (en adelante cepa ER) y la cepa YCM1 de la misma especie para determinar la actividad *dioxin-like* (en adelante cepa AhR).

Se dispone de cultivos de las levaduras en sus respectivos medios selectivos (SD-ER y SD-AhR)

Preparación medios de cultivo

Suplementos

Las disoluciones necesarias para el cultivo de la cepa ER son glucosa (Sigma-Aldrich) al 40%, histidina (Sigma-Aldrich, riqueza $\geq 98\%$) al 1%, metionina (Sigma-Aldrich, riqueza $\geq 98\%$) al 1%. Todas ellas se esterilizan en autoclave (121 °C, 15 min) y se conservan a 5-6 °C. La disolución de histidina se cubre con papel de aluminio para protegerla de la luz.

Para la levadura AhR se preparan las siguientes disoluciones: galactosa (Sigma-Aldrich) al 20%, adenina (Sigma-Aldrich) al 0,5 %, uracilo (Sigma-Aldrich) al 0,5% y CAS AA (aminoácidos de caseína, Difco) al 10%. Adenina y CAS AA son esterilizados por filtración (Millex, 0,2 μm); uracilo se esteriliza en autoclave (121 °C, 15 min).

Medio enriquecido YPD

Se disuelven 50 g de YPD (Yeast Peptone Dextrose, Difco) en 1L de agua MilliQ. Se reparte en tubos de ensayo a razón de 1-2 mL y esterilizándose en autoclave (121 °C, 15 minutos).

Para preparar YPD sólido se añaden 20 g/L de Bacto Agar (Difco) antes de la esterilización. A continuación, una vez atemperado se reparte en placas Petri.

Medio selectivo SD (Synthetic Dextrose)

Se pesan 1,7 g de YNBAA/AS (Yeast Nitrogen Base) y 5 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (DIFCO) y se disuelven en un litro de agua MilliQ. El medio se esteriliza en autoclave (120 °C, 20 min). Si no se va a usar inmediatamente se conserva a temperatura de refrigeración.

Para el cultivo de la cepa ER se añade en condiciones de asepsia 20 g/L de glucosa (40%), 0,01 g/L de histidina y 0,01 g/L de metionina. Para el cultivo de la cepa AhR se añade en condiciones de asepsia 10 g/L de galactosa (20%), 0,01 g/L de adenina, 0,04 g/L de uracilo y 1 g/L de CAS AA.

Para SD sólido se añaden, antes de su esterilización y de la adición de los suplementos, 20 g/L de Bacto Agar (Difco). A continuación, una vez atemperado se reparte en placas Petri.

Reactivos

Tampón Z

Las concentraciones finales de los reactivos para el tampón Z son: 60 mM de Na_2HPO_4 (Scharlau), 40 mM de NaH_2PO_4 (Scharlau), 10 mM de KCl (Scharlau), 1mM de MgSO_4 (Panreac).

En un matraz de 500 mL se añaden 300 mL de Na_2HPO_4 0,1 M, 20 mL de NaH_2PO_4 1M, 5 mL de KCl 1M, 5 mL de MgSO_4 0,1M y se completa con agua MiliQ (170 mL) hasta conseguir un volumen de 500 mL. Hay que ajustar el pH a 7.

Sustrato Mu-Gal

El Mu-Gal se prepara con 100 mL Tampón Z, 1 mL de tritón x-100 (Fisher Chemical) al 10%, 1 mL de SDS (Fisher Chemical) al 10%, 21 mg de Mu-Gal (4-metilumbeliferil b-d galactosidasa) (Sigma-Aldrich) y 70 μl de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

Se pesa la cantidad indicada de Mu-Gal y se disuelve en el Tampón Z junto a los otros componentes excepto el β -mercaptoetanol; se deja en agitación toda la noche a una temperatura de 35-38°C, protegida de la luz. Al día siguiente, se reparte en tubos Falcon a razón de 15 mL y se añade la cantidad adecuada de β -mercaptoetanol en campana. Los tubos se protegen de la luz y se conservan a -20 °C.

Patrones

Para los ensayos de actividad estrogénica se utiliza como patrón la hormona 17 β -estradiol (E2). Se requiere una disolución 10 μM . Para ello, se pesa 1 mg de E2 (Sigma-Aldrich) y se disuelve en 1,5 mL de metanol (grado HPLC). Esta disolución se diluye a 100 μM y a partir de esta última se prepara la de 10 μM , diluyendo de nuevo.

Para los ensayos de actividad dioxin-like se utiliza como patrón (BNF). Se requiere una disolución 100 μM . Para ello, se pesa 1 mg de BNF (Sigma-Aldrich) y se disuelve en 1,5 mL de metanol. De esta disolución se diluye a 100 μM .

A partir de criocultivos (-80 °C) se siembran placas con medio YPD y se incuban a 30 °C durante 24-48 horas. Estos cultivos son considerados cultivos stock a partir de los cuales se toma una colonia de cada placa con el fin de obtener un cultivo de noche en medio YPD líquido (30 °C, agitación). Este cultivo servirá de inóculo para sembrar 50 mL de medio selectivo (30 °C, agitación orbital a 150 rpm, 17 h) de manera que se obtenga una DO entre 0,08 y 0,15 correspondiente a la fase exponencial de crecimiento de la levadura. (Una DO, medida a 600 nm, de 0,1 equivale a 2×10^6 células/mL).

El ensayo se lleva a cabo en placa multipocillo de polipropileno (NUNCTM, Thermo Scientific). Las distintas columnas contienen:

- columna 1: 190 μL de cultivo + 10 μL extracto de la muestra
- columna 2-9: 50 μL de cultivo (5% metanol) + 50 μL de dilución del extracto de la muestra
- columna 10, control de toxicidad: 50 μL de cultivo + patrón de la hormona + 50 μL del extracto de la muestra
- columna 11, control positivo: 50 μL de cultivo + patrón de la hormona
- columna 12, control negativo: 50 μL de cultivo (5% metanol)

Para ello se preparan las siguientes soluciones:

- solución A: cultivo + metanol al 5%
- solución B: 1 mL de cultivo + 1 μL de E2 o 10 μL de β -naftoflavona (BNF).

La placa se carga del siguiente modo:

- cargar la columna 1 con 190 μL de cultivo en cada pocillo y 10 μL del extracto de la muestra, de esta manera se obtiene la dilución 1/20 de la muestra
- cargar las columnas 2-9 y 12 con 50 μL de la solución A
- cargar las columnas 10 y 11 con 50 μL de solución B

Mezclar mediante pipeteo el contenido de la columna 1 y pasar 50 μL a la columna 2 y otros 50 μL a la columna 10. Pasar 50 μL de la columna 2 a la columna 3, mezclar mediante pipeteo y repetir esta operación hasta la columna 9; de esta manera la muestra es diluida en cada columna por un factor de 2. Por tanto, obtendremos diluciones desde 1/20 hasta 1/5120. Con el fin de que el volumen de todos los pocillos sea el mismo se descartan 50 μL de la columna 1, de la 9 y de la 10. La organización de la placa se muestra en la Figura 4.

Una vez cargadas las placas se incuban 6 horas a 30 °C en agitación a una velocidad de 120 rpm.

Pasado este período de tiempo se añade YPER (Yeast Protein Extraction Reagent) (Thermo Scientific), un tampón de lisis para levaduras basado en detergentes que permeabilizan la pared de la levadura y permite extraer las proteínas solubles.

Se añaden 50 μL de YPER a todos los pocillos. Si la lectura se lleva a cabo el mismo día de la preparación de la placa, éstas se incuban a 30 °C durante 30 min. Si no se pueden leer el mismo día se congelan inmediatamente. Una vez descongeladas se deben incubar a 30 °C durante 60 min.

A continuación se añaden 75 μL de Mu-Gal (sustrato de reacción) a cada pocillo, teniendo en cuenta que si se tarda mucho en rellenar la placa la reacción enzimática puede saturarse. Se deja reposar la placa durante 5 min con el fin de que los restos celulares se depositen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● Cultivo + sample ● Control positivo
 ● Cultivo ● Control negativo
 ● Toxicidad

Figura 4. Disposición de las distintas diluciones de la muestra analizadas y controles en la microplaca.

La lectura se lleva a cabo midiendo la fluorescencia (lector de microplacas multifuncional TECAN Infinite M200) con una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm durante 20 minutos.

Procesamiento de los resultados: Cálculo de equivalentes

La cantidad de fluorescencia que se produce a lo largo del tiempo corresponde a la actividad del enzima β -galactosidasa, calculada a partir de la pendiente de las rectas obtenidas (fluorescencia vs. tiempo) que, a su vez es proporcional a la cantidad de complejo receptor-ligando que se forma.

Este valor se escala usando la actividad del control positivo y del control negativo para obtener todos los valores entre 0 (sin actividad) y 1 (actividad máxima). De este modo se obtiene una Actividad relativa (A_{rel}) según la Ecuación 7.

A partir de la curva dosis-respuesta donde se representa la A_{rel} frente a las distintas diluciones de la muestra ensayadas, se obtiene la EC_{50} correspondiente a aquella dilución con la que se obtiene una A_{rel} del 50% de la A_{rel} máxima.

Considerando R el receptor, L el compuesto o compuestos con carácter disruptor o *dioxin-like*, y RL el complejo entre ambos, la constante de disociación, K_d , se determina según la Ecuación 8:

La respuesta del sistema A_{rel} (Ecuación 9) es proporcional a la cantidad de [RL] que se forma respecto de R_t .

Mediante la Ecuación 9, se puede relacionar la A_{rel} con la constante de disociación, K_d . Con estas formulas podríamos calcular la K_d a partir de una curva dosis-respuesta. Si la mitad del receptor disponible está formando el complejo RL, la respuesta obtenida por el sistema debería ser la mitad de la respuesta máxima. La concentración de ligando que produce la mitad de la respuesta máxima se conoce como EC_{50} , y ese es el valor de K_d (ecuación 10).

No obstante, nosotros no sabemos en nuestras muestras cuál es la concentración del compuesto que produce la respuesta. Trabajamos siempre con factores de dilución, es decir, el inverso de la concentración de ligando, o lo que es lo mismo la K_d aparente.

Dado que se desconocen los compuestos presentes en las muestras con actividad estrogénica o, en su caso, *dioxin-like*, y dada la necesidad de comparar la actividad hallada en las diferentes muestras analizadas entre sí y con las ensayadas en otros trabajos, los resultados se expresan en equivalentes (EEQ) de E2 para

el caso de actividad estrogénica y de equivalentes de BNF para actividad *dioxin-like*. Los equivalentes representan la concentración de ligando de referencia con la que se obtendría la misma respuesta que la que presenta la muestra analizada, y se obtiene con la siguiente Ecuación 11 teniendo en cuenta la EC_{50} de los patrones utilizados y la dilución en la que se obtiene la EC_{50} de la muestra.

$$A_{rel} = \frac{A - A_{min}}{A_{max} - A_{min}} \quad (7)$$

$$K_d = \frac{[L] \cdot [R]}{[RL]} \quad (8)$$

$$R + L \leftrightarrow RL ; R_t = R + [RL] ; A_{rel} = \frac{[RL]}{R_t} ; [R_t] = [R] + [RL]$$

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} = \frac{[RL]/[RL]}{[R]/[RL] + [RL]/[RL]} = \frac{1}{1 + [R]/[RL]} = \frac{1}{1 + K_d/[L]} \quad (9)$$

$$K_d = \left(\frac{1}{A_{rel}} - 1 \right) \cdot [L] \quad (10)$$

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{[R_t]} = 0,5 ; 0,5 = \frac{1}{1 + K_d/[L]} ; K_d = [L] \gg K_d = EC_{50}$$

$$K_d = K_{dapp} = \frac{1}{[L]_{EC_{50}}} = \frac{1}{K_d} ; [L] = \frac{1}{\text{factor de dilución}} = \frac{1}{f_d} ; K_{dapp} = \frac{1}{1/f_d \cdot (1/A_{rel} - 1)}$$

$$EEQ = EC_{50 \text{ patrón}} \cdot K_{dapp} \quad (11)$$

Figura 5. Ecuaciones para el cálculo de equivalentes

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad llevados a cabo con muestras de agua procedentes del Departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy. Estas han sido tratadas mediante ozonización o foto-Fenton, a diferentes tiempos.

4.1 ENSAYO DE TOXICIDAD CON *P. SUBCAPITATA*

En la Tabla 5 se presentan los valores medios del porcentaje de la inhibición del crecimiento del alga de las muestras no tratadas y tratadas a diferentes tiempos, mediante ozonización o foto-Fenton. También se presentan los valores DS (desviación estándar). El análisis ANOVA de la variable dependiente % de inhibición del crecimiento con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta del alga ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo 7.3.1).

Tabla 5. Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata* expuesta a las muestras de ensayo.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)*						
Dilución	Muestras ensayadas					
	0 min	0 min pretratada	FF 90 min	FF 180 min	O ₃ 15 min	O ₃ 60 min
1:256	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	15,0 ± 2.0 ^b	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a
1:128	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	48,0 ± 7,8 ^c	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a
1:64	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	74,6 ± 4,1 ^d	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a
1:32	13,4 ± 4,0 ^b	9,5 ± 2,8 ^b	91,7 ± 1,4 ^e	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a	0,0 ± 0.0 ^a
1:16	48,9 ± 7,2 ^c	35,1 ± 2,8 ^c	97,0 ± 0,8 ^f	9,0 ± 4,6 ^b	0,0 ± 0.0 ^a	13,0 ± 2,6 ^c
1:8	59,5 ± 5,0 ^d	54,2 ± 5,1 ^d	100,6 ± 0,2 ^g	35,2 ± 2,9 ^c	4,2 ± 2,2 ^b	44,1 ± 4,4 ^d
1:4	94,7 ± 1,6 ^{ef}	78,7 ± 3,4 ^e	100,8 ± 0,1 ^g	69,3 ± 5,3 ^d	11,9 ± 1,8 ^c	83,5 ± 4,3 ^f
1:2	97,5 ± 1,57 ^f	97,8 ± 0,2 ^g	100,6 ± 0,2 ^g	92,9 ± 3,1 ^e	24,0 ± 4,9 ^d	97,1 ± 1,3 ^f
1:1	93,5 ± 0,3 ^e	94,4 ± 0,1 ^f	100,5 ± 0,1 ^g	99,1 ± 0,2 ^f	32,6 ± 4,5 ^e	98,6 ± 0,7 ^f

En esta tabla se puede observar que la muestra FF 90 min es la que produce una mayor inhibición del crecimiento del alga, con unos porcentajes de inhibición próximos al 100.0% para las diluciones 1:1 a 1:32. El efecto de esta muestra sobre la inhibición del desarrollo disminuye a partir de la dilución 1:64, alcanzando un 15% de inhibición en la dilución 1:256.

La muestra tratada mediante ozonización durante 15 min ha producido el menor efecto sobre el crecimiento del alga, ya que para la dilución 1:1, el porcentaje de inhibición ha sido del 32,6%.

En general, a partir de la dilución 1:32, el efecto de las muestras sobre el crecimiento del alga, excepto la muestra tratada mediante foto-Fenton durante 90 min, ha disminuido con unos porcentajes de inhibición comprendidos entre 0,0 y 13,4%.

Las muestras no tratadas han tenido un efecto similar sobre el alga, siendo el efecto de la pretratada mediante nanofiltración ligeramente menor.

Con el fin de calcular los valores LID(Mínima dilución sin efecto) de las muestras tratadas a diferentes tiempos se ha realizado un análisis ANOVA (Anexo 7.3.1).El cálculo del valor MID (dilución ensayada que produce el 50% de efecto) con sus intervalos de confianza al 95%, se ha realizado mediante análisis Probit para todas las muestras menos O₃15 min cuyos porcentajes de inhibición han sido inferiores al 50,0% (Anexo 7.3.2). Los valores LID y MID para *P.subcapitata* se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores LID y MID de *P. subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

MUESTRAS	LID	MID
0 min	1:64	1:12 (1:13 – 1:10)
0 min pretratada	1:64	1:9 (1:10 – 1:8)
FF 90 min	1:16	1:100 (1:111 – 1:100)
FF 180 min	1:32	1:6 (1:6,1 – 1:5,6)
O ₃ 15 min	1:16	---
O ₃ 60 min	1:32	1:7 (1:7,5 – 1:6,8)

Los valores LID muestran el mayor grado de toxicidad de las muestras no tratadas y una disminución del grado de toxicidad para las muestras O₃ 15 min y FF 90 min. Teniendo en cuenta los valores MID obtenidos, la muestra más tóxica ha sido FF 90 min y la menos tóxica O₃ 15 min, ya que los valores de inhibición han sido inferiores al 50% y no se ha podido calcular el valor MID. La toxicidad del resto de muestras ha sido similar con unos valores MID entre 1:6 y 1:12.

Como se ha comentado anteriormente la mayor toxicidad observada en los tratamientos intermedios puede deberse a la formación de compuestos más tóxicos que los compuestos de los cuales derivan como consecuencia de los tratamientos mediante POAs.

En la Figura 6 se observa la evolución de la inhibición del crecimiento del alga expuesta a las muestras. Se observa el menor efecto de la muestra O₃ 15 min sobre el alga, presentando el resto de las muestras un efecto similar.

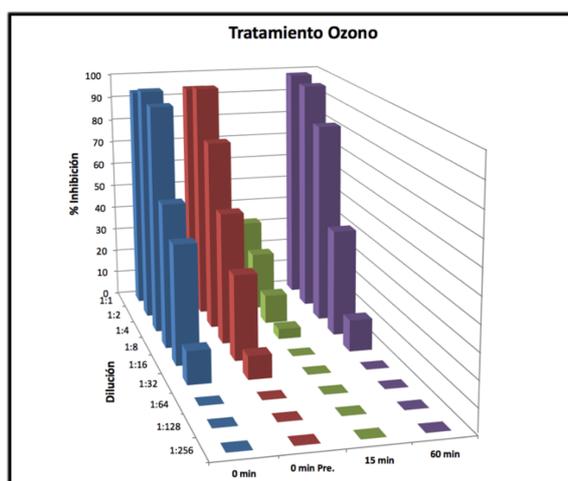


Figura 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *P.Subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

En la Figura 7 se analiza la evolución de la inhibición del crecimiento de *P.subcapitata* expuesta a las muestras. Se observa el menor efecto de la muestra FF180 min sobre el alga y el mayor efecto de la muestra FF 90 min.

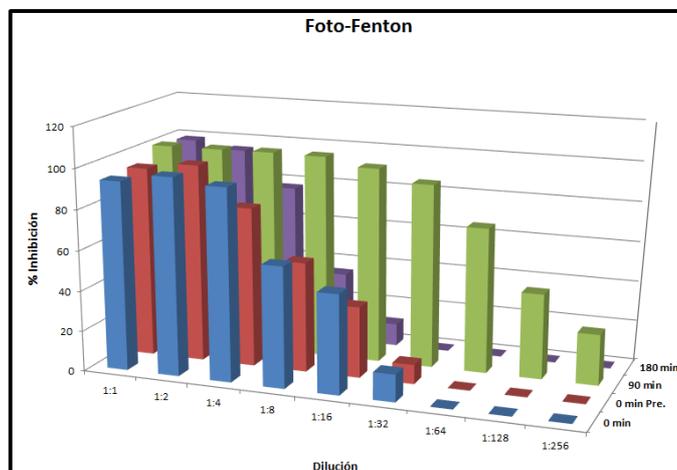


Figura 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *P.Subcapitata* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

4.2 ENSAYO DE TOXICIDAD CON *D.MAGNA*

En la Tabla 7 se presentan los valores medios del porcentaje de la inmovilización de *D.magna* de las muestras no tratadas y tratadas a diferentes tiempos, mediante ozonización o foto-fenton. También se presentan los valores DS. El análisis ANOVA de la variable dependiente % de inhibición del crecimiento con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta del alga ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo7.4.1).

Tabla 7. Porcentaje de inmovilización de *D.magna* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

INMOVILIZACIÓN (%)*						
Dilución	Muestras ensayadas					
	0 min	0 min pre	FF 90 min	FF 180 min	O ₃ 15 min	O ₃ 60 min
1:8	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 10,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 16,33 ^a	0,0 ± 16,33 ^a
1:4	0,0 ± 16,33 ^a	5,0 ± 11,55 ^a	15,0 ± 0,0 ^a	5,0 ± 10,0 ^a	5,0 ± 10,0 ^a	15,0 ± 10,0 ^a
1:2	60,0 ± 0,0 ^b	70,0 ± 10,0 ^b	15,0 ± 11,5 ^c	85,0 ± 10,0 ^c	5,0 ± 10,0 ^a	15,0 ± 19,5 ^a
1:1	100,0 ± 0,0 ^c	95,0 ± 0,0 ^c	80,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^c	20,0 ± 0,0 ^b	80,0 ± 0,0 ^b

En esta tabla se puede observar que las muestras 0 min, 0 min pre y FF 180 min son las que tienen mayor efecto sobre las dafnias, con unos porcentajes de inmovilización comprendidos entre 95,0 y 100, para la dilución 1:1; el efecto de estas muestras sobre las dafnias disminuye a partir de la dilución 1:2. En cambio, la muestra tratada mediante ozonización durante 15 min ha tenido el menor efecto, siendo el porcentaje de inmovilización del 20%, para la dilución 1:1. Para las muestras FF 90 min, O₃ 15 min y O₃ 60 min, se observa una rápida disminución del efecto a partir de la dilución 1:2.

En la Figura 8 se puede observar la evolución de los porcentajes de inmovilización de dafnia expuesta a las diferentes muestras. Destaca la rápida reducción del efecto de las mismas a partir de la dilución 1:4.

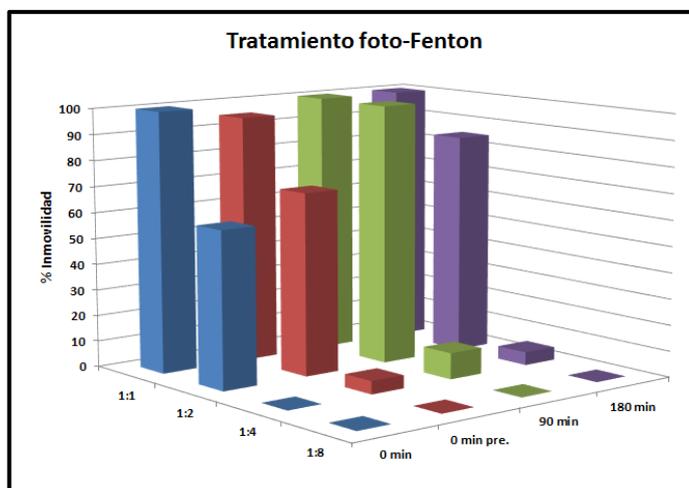


Figura 8. Porcentajes de inmovilización de *D.magna* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

En la Figura 9 se puede observar la evolución de los porcentajes de inmovilización de dafnia expuesta a las diferentes muestras. Destaca el menor efecto sobre dafnia de la muestra O_3 15 min. Las muestras 0 min y 0 min pre producen un efecto similar sobre los organismos. La mayor toxicidad observada en la muestra O_3 60 min puede deberse a la formación de compuestos más tóxicos que los compuestos de los cuales derivan, como consecuencia de los tratamientos mediante POAs.

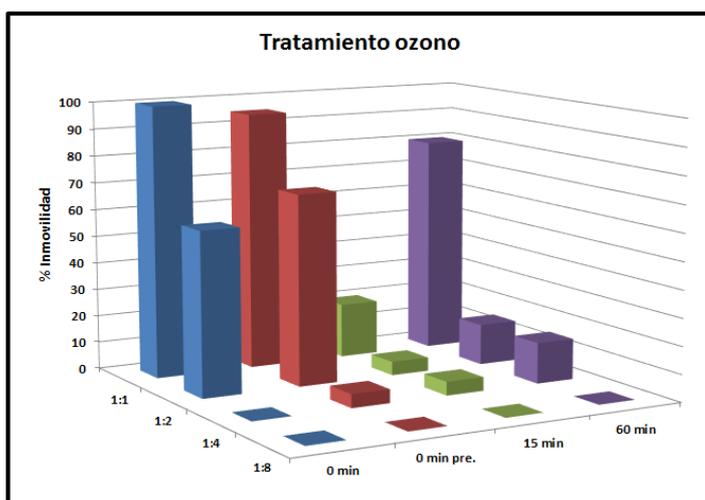


Figura 9. Porcentajes de inmovilización de *D.magna* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

Con el fin de calcular los valores LID de las muestras tratadas a diferentes tiempos se ha realizado un análisis ANOVA (Anexo 7.4.1.).El cálculo del valor MID, con sus intervalos de confianza al 95%, se ha realizado mediante análisis Probit, para todas las muestras ensayadas, excepto O_3 15 min cuyos porcentajes de inmovilización han sido inferiores al 50,0% (Anexo 7.4.2). Los valores LID y MID para *D. magna* se muestran en la (Tabla 8)

Tabla 8. Valores LID y MID de *D.magna* expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

MUESTRAS	LID	MID
0 min	1:4	1:2,1 (1:2,3 – 1:2)
0 min pretratada	1:4	1:2,3 (1:2,7 – 1:1,88)
FF 90 min	1:8	1:3,2 (1:3,5 – 1:2,7)
FF 180 min	1:4	1:2,6 (1:2,8 – 1:2,4)
O ₃ 15 min	1:2	---
O ₃ 60 min	1:2	1:1,5 (1:2 – 1:1)

Los valores LID muestran la efectividad del tratamiento de ozonización, ya que se observa una reducción del grado de toxicidad de la muestra con respecto a las muestras no tratadas. En el caso del tratamiento con foto-Fenton no se observa una reducción de la toxicidad a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Teniendo en cuenta los valores MID obtenidos, la muestra más tóxica ha sido FF 90 min y la menos tóxica O₃ 15 min ya que, en este caso, los valores de inmovilización son inferiores al 50% y no se ha podido calcular el valor MID. La toxicidad del resto de muestras ha sido similar, con unos valores MID entre 1:1,5 y 1:2,6.

4.3 ENSAYO DE TOXICIDAD CON *E. FETIDA*

La Figura 10 muestra la atracción o repulsión de la lombriz de los sustratos contaminados por las muestras de corchera no tratadas y tratadas a diferentes tiempos.

Como se puede ver en dicha figura, las lombrices evitaron el sustrato contaminado con FF 90 min, O₃ 15 min y O₃ 60 min. Se observa una mayor atracción por las muestras no tratadas.

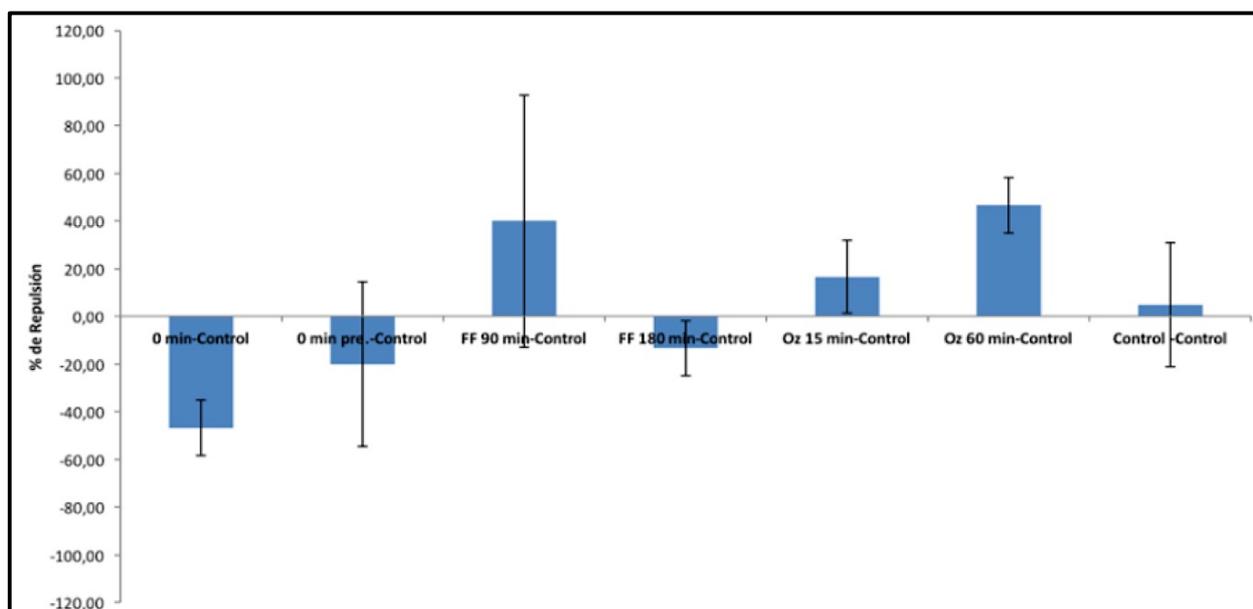


Figura 10. Respuesta neta (%) (media ± SD) de individuos de *E. fetida* expuestos a las distintas muestras.

4.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON LÍNEAS CELULARES ANIMALES

En la Tabla 9 se presentan los porcentajes de viabilidad de la línea celular 3T3 expuesta a las distintas diluciones de las muestras concentradas, no tratadas y tratadas, mediante ozonización o foto-Fenton. También se presentan los valores DS (desviación estándar). El análisis ANOVA de la variable dependiente % de viabilidad con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta de las células ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo 7.5.1).

Tabla 9. Viabilidad de la línea celular 3T3 expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

VIABILIDAD (%)*						
Dilución	Muestras ensayadas					
	0 min	0 min pre	FF 90 min	FF 180 min	O ₃ 15 min	O ₃ 60 min
1:128	96,3 ± 0,0 ^d	98,5 ± 0,5 ^{de}	105,5 ± 2,7 ^b	103,3 ± 2,8 ^c	115,3 ± 2,8 ^d	114,9 ± 0,9 ^d
1:64	99,9 ± 1,3 ^d	99,2 ± 0,3 ^{de}	108,5 ± 1,8 ^b	102,7 ± 9,8 ^c	113,1 ± 0,3 ^d	111,5 ± 6,6 ^{cd}
1:32	78,4 ± 1,4 ^c	97,7 ± 2,6 ^{de}	101,7 ± 0,2 ^b	100,1 ± 3,8 ^c	100,3 ± 0,8 ^d	101,3 ± 3,1 ^{bcd}
1:16	71,8 ± 2,6 ^c	87,2 ± 2,5 ^{cd}	100,3 ± 2,4 ^b	96,4 ± 3,2 ^c	99,8 ± 2,0 ^d	99,7 ± 0,1 ^{bcd}
1:8	48,7 ± 1,7 ^b	78,9 ± 1,7 ^c	100,8 ± 3,2 ^b	102,1 ± 0,6 ^c	101,5 ± 0,6 ^d	100,7 ± 1,9 ^{bcd}
1:4	38,7 ± 0,9 ^b	53,3 ± 0,7 ^b	101,7 ± 0,9 ^b	93,6 ± 2,2 ^c	98,6 ± 0,5 ^d	99,7 ± 0,1 ^{bcd}
1:2	11,2 ± 2,4 ^a	0,04 ± 0,4 ^a	96,2 ± 1,2 ^a	75,3 ± 1,3 ^b	98,5 ± 11,4 ^d	87,4 ± 11,5 ^b
1:1	0,3 ± 4,6 ^a	0,0 ± 1,9 ^a	81,4 ± 0,3 ^b	44,5 ± 1,2 ^a	89,0 ± 16,9 ^d	24,7 ± 9,5 ^a

*A partir del porcentaje de viabilidad del control 3T3 (101,44 ± 1,6%) se han calculado los porcentajes de viabilidad de las células 3T3 expuestas a las distintas diluciones de las muestras.

En esta tabla se puede observar que las muestras 0 min pre y 0 min son las que tienen mayor efecto sobre la viabilidad celular, con unos valores de 0,0 y 0,3%, respectivamente, para la dilución 1:1. Este efecto disminuye progresivamente a medida que aumenta la dilución.

Las muestras que menos afectan a la proliferación celular han sido FF 90 min y O₃ 15 min. Sin embargo, las muestras finales FF 180 min y O₃ 60 min han producido un efecto mayor, con unos valores de 44,5 y 24,7%, respectivamente, para la dilución 1:1. A partir de la dilución 1:2, aumenta rápidamente la viabilidad celular con unos valores comprendidos entre 75,3 y 115,3%. También se observa, en general, que a partir de la dilución 1:4, las muestras tratadas no afectan significativamente a la viabilidad celular.

En la Tabla 10 se presentan los porcentajes de viabilidad de la línea celular N2a expuesta a las distintas diluciones de las muestras no tratadas y tratadas, mediante ozonización o foto-Fenton. También se presentan los valores DS (desviación estándar). El análisis ANOVA de la variable dependiente % de viabilidad con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta de las células ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo 7.6.1).

Tabla 10. Viabilidad de la línea celular N2a expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

VIABILIDAD (%)*						
Dilución	Muestras ensayadas					
	0 min	0 min pre	FF 90 min	FF 180 min	O ₃ 15 min	O ₃ 60 min
1:128	102,3 ± 0,0 ^d	91,5 ± 1,8 ^{de}	106,1 ± 2,9 ^{cd}	97,3 ± 3,7 ^{de}	97,7 ± 6,1 ^d	99,9 ± 0,9 ^d
1:64	100,2 ± 0,1 ^d	87,9 ± 0,1 ^d	113,1 ± 2,6 ^d	98,0 ± 5,1 ^{de}	99,6 ± 9,3 ^d	99,6 ± 3,0 ^d
1:32	93,1 ± 2,1 ^d	71,8 ± 2,2 ^c	102,9 ± 1,8 ^{cd}	97,2 ± 1,9 ^{de}	93,6 ± 1,9 ^{cd}	93,9 ± 1,1 ^{cd}
1:16	49,6 ± 1,9 ^c	53,3 ± 0,3 ^b	98,8 ± 2,3 ^c	96,9 ± 2,1 ^{de}	97,8 ± 2,1 ^{cd}	93,7 ± 2,5 ^{cd}
1:8	27,3 ± 3,4 ^b	48,6 ± 1,0 ^b	100,3 ± 2,0 ^{cd}	88,2 ± 5,7 ^d	93,6 ± 9,1 ^{cd}	92,7 ± 4,9 ^c
1:4	6,9 ± 4,8 ^a	3,7 ± 2,8 ^a	84,6 ± 0,2 ^b	73,4 ± 1,2 ^c	81,3 ± 4,7 ^{bc}	82,9 ± 2,3 ^b
1:2	0,4 ± 2,9 ^a	0,0 ± 9,4 ^a	35,5 ± 9,6 ^b	46,7 ± 1,7 ^b	89,1 ± 1,9 ^{bcd}	29,3 ± 2,7 ^a
1:1	0,3 ± 0,5 ^a	1,3 ± 1,7 ^a	34,5 ± 9,2 ^a	6,4 ± 1,7 ^a	63,6 ± 0,0 ^a	0,0 ± 9,4 ^d

*A partir del porcentaje de viabilidad del control N2a (99,0±2,7%) se han calculado los porcentajes de viabilidad de las células N2a expuestas a las distintas diluciones de las muestras.

En esta tabla se puede observar que las muestras 0 min, 0 min pre, FF 180 min y O₃ 60 min son las que tienen mayor efecto sobre la proliferación celular, con unos valores comprendidos entre 0,3 y 6,4%, para la dilución 1:1. La muestra con menor efecto ha sido O₃ 15 min. También se observa, en general, que a partir de la dilución 1:8, las muestras tratadas no afectan significativamente a la viabilidad celular.

En la Tabla 11 se presentan los porcentajes de viabilidad de la línea celular HEK expuesta a las distintas diluciones de las muestras no tratadas y tratadas, mediante ozonización o foto-Fenton. También se presentan los valores DS (desviación estándar). El análisis ANOVA de la variable dependiente % de viabilidad con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta de las células (p<0,05). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo 7.7.1).

Tabla 11. Viabilidad de la línea celular HEK expuesta a las diluciones de las muestras de ensayo.

VIABILIDAD (%)*						
Dilución	Muestras ensayadas					
	0 min	0 min pre	FF 90 min	FF 180 min	O ₃ 15 min	O ₃ 60 min
1:128	101,2 ± 0,0 ^e	102,2 ± 0,5 ^d	111,1 ± 2,2 ^a	108,7 ± 9,8 ^e	107,4 ± 1,5 ^{cd}	103,7 ± 4,8 ^c
1:64	101,9 ± 5,8 ^e	95,9 ± 5,6 ^d	102,5 ± 0,8 ^{cd}	97,8 ± 9,6 ^d	104,8 ± 0,6 ^c	104,5 ± 5,4 ^c
1:32	99,5 ± 4,0 ^e	105,2 ± 9,4 ^d	103,8 ± 8,5 ^{cd}	93,3 ± 2,4 ^{cd}	108,7 ± 7,8 ^{cd}	103,4 ± 1,4 ^c
1:16	101,9 ± 4,2 ^e	104,6 ± 0,5 ^d	100,2 ± 8,4 ^{cd}	93,7 ± 1,8 ^d	119,8 ± 1,6 ^d	100,8 ± 7,1 ^c
1:8	76,1 ± 4,7 ^d	94,5 ± 3,2 ^d	108,9 ± 11,6 ^{cd}	90,5 ± 6,5 ^{cd}	98,5 ± 9,7 ^{bc}	101,9 ± 14,1 ^c
1:4	42,5 ± 6,0 ^c	58,7 ± 8,5 ^c	102,9 ± 7,7 ^{cd}	79,6 ± 0,9 ^c	98,0 ± 2,8 ^{bc}	91,2 ± 2,3 ^c
1:2	22,4 ± 6,3 ^b	14,3 ± 2,8 ^b	84,9 ± 4,3 ^b	45,7 ± 6,0 ^b	90,3 ± 2,1 ^{ab}	75,1 ± 9,8 ^b
1:1	0,9 ± 5,2 ^a	2,2 ± 4,3 ^a	54,2 ± 0,1 ^a	14,8 ± 3,7 ^a	79,0 ± 4,5 ^a	50,0 ± 9,5 ^a

*A partir del porcentaje de viabilidad del control HEK (100,0%±3,8%) se han calculado los porcentajes de viabilidad de las células HEK expuestas a las distintas diluciones de las muestras.

En esta tabla se puede observar que las muestras 0 min y 0 min pre son las que tienen mayor efecto sobre la proliferación celular, con unos valores comprendidos entre 0,9 y 2,2%, para la dilución 1:1, seguida de la muestra FF 180 min. La muestra con menor efecto ha sido O₃ 15 min seguida de FF 90 min, con unos valores de 79,0 y 54,2%, respectivamente, para la dilución 1:1. También se observa, en general, que a partir de la dilución 1:16, las muestras estudiadas no afectan significativamente a la viabilidad celular.

En las Figuras 11 y 12 podemos observar como las muestras no tratadas han tenido un mayor efecto sobre la proliferación celular. Las muestras finales de los tratamientos han tenido mayor efecto que las muestras tratadas durante menos tiempo, especialmente para la dilución 1:1.

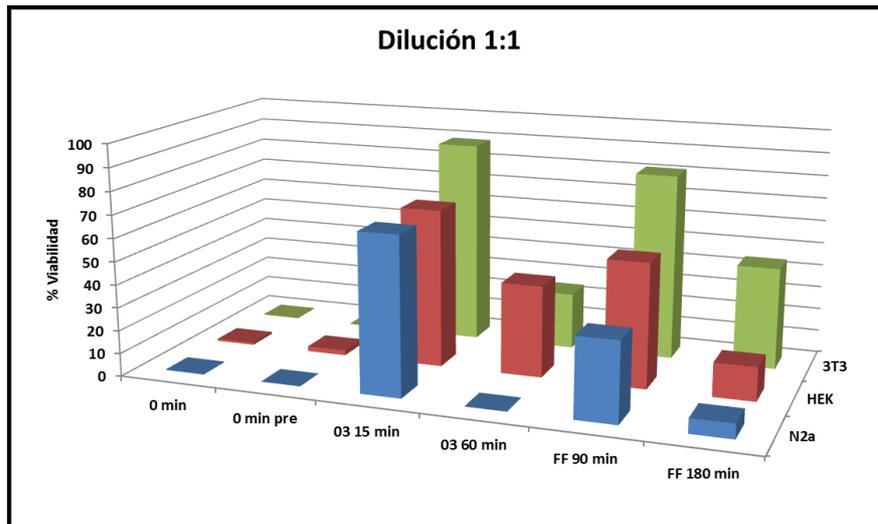


Figura 11. Porcentajes de viabilidad de las tres líneas celulares para la dilución 1:1 de las muestras.

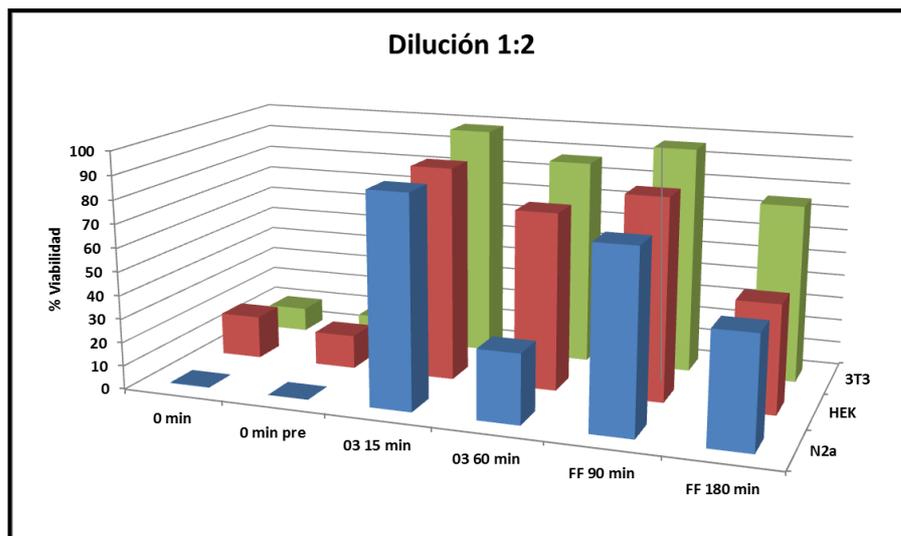


Figura 12. Porcentajes de viabilidad de las tres líneas celulares para la dilución 1:2 de las muestras.

Con el fin de calcular los valores LID (Tabla 12) de las muestras no tratadas y tratadas a diferentes tiempos, se ha realizado un análisis ANOVA (Anexos 7.5.1; 7.6.1; 7.7.1).

Tabla 12. Valores LID de las tres líneas celulares.

Tiempo tratamiento	VALORES LID		
	3T3	N2a	HEK
0 min	1:64	1:32	1:16
0 min pretratada	1:32	1:128	1:8
FF 90 min	1:2	1:8	1:4
FF 180 min	1:4	1:16	1:8
O ₃ 15 min	1:1	1:4	1:4
O ₃ 60 min	1:4	1:8	1:4

Los valores LID demuestran la efectividad de los tratamientos, ya que se observa, en las líneas celulares 3T3 y N2a, una reducción del grado de toxicidad de las muestras con respecto a las muestras no tratadas, si bien hay un ligero aumento de la toxicidad en los tratamientos finales, en cambio para la línea celular HEK, los tratamientos no parecen reducir el grado de toxicidad.

El cálculo de los valores MID con sus intervalos de confianza al 95%, se ha realizado mediante análisis Probit (Anexos 7.5.2; 7.6.2; 7.7.2). Los valores MID para las tres líneas celulares se muestran en la Tabla 13. Estos valores no se han podido calcular en los casos en que los porcentajes de viabilidad han sido inferiores al 50,0%.

Tabla 13. Valores MID de las tres líneas celulares.

Tiempo tratamiento	VALORES MID		
	3T3	N2a	HEK
0 min	1:8,5 (1:11 – 1:7)	1:13 (1:15 – 1:12)	1:5 (1:8 – 1:3)
0 min pretratada	1:5 (1:8 – 1:3)	1:16 (1:20 – 1:12)	1:3,5 (1:5 – 1:2)
FF 90 min	----	1:1,3 (1:2 – 1:1)	----
FF 180 min	1:1,1 (1:1,3 – 1:0,8)	1:2,6 (1:4 – 1:1)	1:2 (1:3 – 1:1)
O ₃ 15 min	----	----	----
O ₃ 60 min	1:1,5 (1:1,6 – 1:1,4)	1:3,5 (1:9 – 1:0,6)	1:0,9 (1:1,6 – 1:0,2)

Para las tres líneas celulares las muestras no tratadas han sido las más tóxicas, con unos valores MID entre 1:16 y 1:3,5. En general, las muestras con menor toxicidad han sido O₃ 15 min y FF 90 min. El aumento de la toxicidad en los tratamientos finales puede deberse a la formación de compuestos intermedios que pueden ser más tóxicos que los compuestos de los cuales derivan, como consecuencia de los POAs.

4.5. ENSAYO DE TOXICIDAD RYA

4.5.1 Valoración de la actividad de disrupción endocrina

En la Tabla 14 se listan los EEQ de E2 obtenidos tras el ensayo a distintas diluciones de las muestras no tratadas y tratadas mediante ozonización o foto-Fenton.

Tabla 14. Actividad estrogénica (EEQ de E2) de las muestras de agua.

Tiempo tratamiento	TOXICIDAD (%)*	EEQ DE E2 (ng/L)
0 min	92	18,8
0 min pretratada	99	9,1
FF 90 min	0	7,9
FF 180 min	50	-
O ₃ 15 min	0	-
O ₃ 60 min	0	-

* Reducción (%) de la viabilidad de las levaduras respecto al control positivo

La actividad estrogénica máxima se ha detectado en la muestra no tratada (0 min) siendo además muy tóxica con niveles de reducción de la viabilidad de las levaduras superior al 90%. En general, se observa una disminución de la actividad endocrina y de la toxicidad a lo largo de los tratamientos.

Los valores de EEQ de E2 se ven reducidos aproximadamente a la mitad tras el pretratamiento de nanofiltración. Tanto el tratamiento foto-Fenton durante 180 min como la ozonización a 15 y 60 min reducen completamente los EEQ de E2. Destaca el proceso de ozonización ya que se reduce totalmente el grado de toxicidad de la muestra.

4.5.2 Valoración de la actividad *dioxin-like*

En la Tabla 15 se listan los EEQ de BNF obtenidos tras el ensayo a distintas diluciones de las muestras no tratadas y tratadas mediante ozonización o foto-Fenton.

Tabla 15. Actividad estrogénica (EEQ de BNF) de las muestras de agua.

Tiempo tratamiento	TOXICIDAD (%)*	EEQ DE BNF (ng/L)
0 min	87	2460
0 min pretratada	97	2400
FF 90 min	77	38,3
FF 180 min	73	18,5
O ₃ 15 min	74	40,2
O ₃ 60 min	99	27,2

* Reducción (%) de la viabilidad de las levaduras respecto al control positivo

La actividad estrogénica máxima se ha detectado en la muestra que no está tratada (0 min) siendo además muy tóxica, con niveles de reducción de la viabilidad de las levaduras superior al 87 %. En general, se observa una disminución de la actividad *dioxin-like* y de la toxicidad a lo largo de ambos tratamientos.

Mediante este ensayo se detecta una gran diversidad de compuestos químicos orgánicos, y por ello es posible que el pretratamiento tenga mayores EEQ de BNF al crearse tras éste compuestos secundarios .

La efectividad de los procesos avanzados foto-Fenton y ozonización funcionan de manera similar.

Trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio refuerzan la idea de la necesidad de una monitorización del proceso desde el punto de vista toxicológico, ya que se pueden formar compuestos secundarios diversos y con grados de toxicidad diferentes. En nuestro caso, la monitorización de los tiempos intermedios en los tratamientos llevados a cabo, nos indica la efectividad de los mismos ya que no se observa actividad endocrina ni *dioxin-like*.

5. CONCLUSIONES

1. En general, los tratamientos de ozonización y foto-Fenton han demostrado ser eficaces ya que producen una disminución del grado de toxicidad sobre los organismos acuáticos y líneas celulares ensayadas, a excepción del tratamiento foto-Fenton sobre *D. magna*.
2. El alga *P. subcapitata* ha sido más sensible que el microcrustáceo *D. magna*, a las muestras ensayadas y, de las tres líneas celulares la más sensible ha sido N2a y la más resistente 3T3.
3. En el ensayo de repulsión, *E. fetida* ha tenido un comportamiento diferente respecto a los organismos acuáticos y líneas celulares, mostrando una atracción por las muestras sin tratar (0 min y 0 min pretratada) y por la muestra FF 180 min.
4. Los dos tratamientos han sido eficaces en la reducción de la actividad endocrina y *dioxin-like* de las muestras iniciales.

6. BIBLIOGRAFÍA

ALONSO, M. (1996). Fauna Iberica, Vol 7, Crustacea Branchiopoda. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Eds. Ramos M.A. Madrid.

ARUOJA, V. (2011). Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles; Laboratory of Molecular Genetics, National Institute of Chemical Physics and Biophysics; Estonian University of Life Science.

BARROSO, V.; LAMAS, O. (1998). El corcho: un producto con posibilidades en Extremadura. Cámara Oficial de Comercio e Industria de Cáceres. Cáceres.

BENÍTEZ, F. J.; ACERO, J. L.; GARCÍA, J.; LEAL, A.I. (2003). Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research* 37(17), 4081–4090.

BOYD, R.S. (2010). Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology* 36, 46-58.

BRIX, R.; NOGUEROL, T.; PIÑA, B.; BALAAM, J.; NILSEN, A.J.; TOLLEFSEN, K.; LEVY, W.; SCHRAMM, K.; BARCELÓ, D. (2010). Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International* 36, 361–367.

CÉSPEDES, M.A.; GALINDO, M.I.; COUSO, J.P. (2010). Dioxin toxicity *in vivo* results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS one* 5(11), 1-7

CÉSPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDÚA, D.; SAURA, U.; PIÑA, B.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3), 697–708.

CLÉMENT, B. (2006). Apports des essais en microcosmes aquatiques lentiques de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire d'HDR-INSA de Lyon et Université de Lyon, Spécialité Biologie et Biochimie Appliquées au LSE de l'ENTPE. Vaulx-en-Velin.

DALZELL, D.J.B.; ALTE, S.; ASPICHUETA, E.; A. DE LA SOTA; ETXEBARRIA, J.; GUTIERREZ, M.; HOFFMANN, C.C.; SALES, D.; OBST, U.; CHRISTOFI, N. (2002). A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47(5), 535–545.

DÍAZ, M.C.; BUSTOS, M.C.; ESPINOSA, A.J. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos; Univ. Nacional de Colombia.

Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, 2013.

EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances)

<http://esis.jrc.ec.europa.eu/index.php?PGM=ein>

ESCÁRCEGA, S.(2001). Biodegradación de taninos de cortezas mediante cultivos de *Aspergillus niger*. Tesis doctoral en biotecnología. Univ. Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

ESCLAPÉS, M. (1999). Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP.

FORERO, J.E; ORTIZ, O.P; RÍOS, F. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. *Ciencia, Tecnología y Futuro* 3, 98-109.

FRESHNEY, R.I. (2011). Culture of Animal Cells: A Manual of basic technique and specialized applications (6th Ed.). John Wiley and Sons Ltd.

GAETE, H.; PAREDES, K. (1996) .Toxicidad de mezclas de contami- nantes químicos sobre el cladócero *Daphnia magna*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 12(1), 23-28.

GAIDO, K. W.; LEONARD, L. S.; LOVELL, S.; GOULD, J. C.; BABAĬ, D.; PORTIER, C. J.; MCDONNELL, D. P. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143(1), 205–212.

GIROTTI, S., FERRI, E. N., FUMO, M. G., MAIOLINI, E. (2008). Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta* 608(1), 2–29.

HAQUE, A.; EBING, W. (1983). Toxicity determination of pesticides to earthworms in the soil substrate. *Journal of Plant Diseases and Protection* 90(4), 395-408.

HEBERT P.D.N. (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Review* 53, 387-426.

HOIGNÉ, J.; BADER, H.(1977). Ozonation of Water: Selec- tivity and Rate of Oxidation of Solutes. *Ozone: Science and Engineering* 1, 73-85.

HUANG C.P.; DONGA C.; TANG Z. (1993). Advanced chemical oxidation, Its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Management* 13, 361-377.

ICMC(Instituto del corcho, la madera y el carbón Vegetal del Gobierno de Extremadura)
<http://iprocor.gobex.es>

KLAMERTH, N.; RIZZO, L.; MALATO, S.; MALDONADO, M.I.; AGÜERA, A. ; FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2010). Degradation of fifteen emerging contaminants at mg L⁻¹ initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. *Water Research* 44, 545–554.

LARSSON, P.; DODSON, S. (1993). Chemical communication in plankton animals. *Archiv fur Hydrobiologie* 129, 129-155.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. (1993). Photo- chemical processes for water treatment. *Chemical Reviews* 93, 671-698.

LEWIS, M.A. (1990). Are laboratory-derived toxicity data for freshwater algae worth the effort? *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 1279–1284.

MASTEN, S.J.; DAVIES, F.R. (1994). The Use of Ozonation to Degrades Organic Contaminants in Wastewaters. *Enviromental Science and Technology* 28(4), 180-185.

MELIÁ, M. (2013). Evaluación de la eficacia de un tratamiento foto-Fenton en la detoxificación de aguas contaminadas con compuestos derivados de la industria del corcho mediante bioensayos con *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Eisenia fetida*. TFG en Biotecnología. UPV.

MENDONÇA, E.; PICADO, A; SILVA, L.; ANSELMO, A M. (2007). Ecotoxicological evaluation of cork-boiling wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66(3), 384–390.

MILLER III, C.A. (1999). A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast display additive responses to ligand mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 160, 297-303.

NALEWAJKO,C.; OLAVESON, M.M. (1998). Ecophysiological considerations in microalgal toxicity tests. In: P.G. Wells, K. Lee and Ch. Blaise, Editors, *Microscale Testing in Aquatic Toxicology*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL., 289–309.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. (2003). A review of classic Fenton’s peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials* 98, 33-50

NOGUEROL, T.N. (2007). Desenvolupament i aplicació de bioassaigs per a la detecció i quantificació de xenobiòtics amb llevats recombinants, Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; JARQUE, S.; BARCELÓ, D. ; PIÑA, B. (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 69, 351–358.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review. *The Science of the Total Environment* 409(20), 4141–4166.

ORTAZ, M.; GONZÁLEZ, E.; PEÑAHERRERA, C. (2006). Depredación de peces sobre el zooplancton en tres embalses neotropicales con distintos estados tróficos. *Interciencia* 31(7), 517-524.

OTERO, M. (2002). Nemátodos bacteriófagos como bioindicadores y como organismos asociados a los procesos de biorremediación. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 6(1), 75-81.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.; BONERZ, M.; KLUCZKA, T.; VAN DER BURG, B.; NAU, H.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. (2003). Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. *Toxicological Sciences* 75(1), 57–65.

PIGNATELLO, J.J.(1992). Dark and photoassisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology* 26, 944-951.

RAMOS, C.; DE LA TORRE, A.I.; TARAZONA, J.V.; MUÑOZ, M.J. (1996). Desarrollo de un ensayo de inhibición de *Chlorella vulgaris*, utilizando un test de microplacas. *Reviews in Toxicology* 13, 97-100.

REDDY, S.; BROWNAWELL, B.J. (2005). Analysis of estrogens in sediment from a sewage-impacted urban estuary using high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5), 1041–1047.

REMACHA, A. (2008). *Tecnología del corcho*. Visión Libros.

RIZZO, L. (2011). Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research* 45, 4311-4340.

RIZZO, L.; MERIC, S.; KASSINOS, D.; GUIDA, M.; RUSSO, F.; BELGIORNO, V. (2009). Degradation of diclofenac by TiO₂ photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays. *Water Research* 43, 979–988.

RODA, A.; MIRASOLI, M.; MICHELINI, E.; MAGLIULO, M.; SIMONI, P.; GUARDIGLI, M.; CURINI, R.; SERGI, M.; MARINO, A. (2006). Analytical approach for monitoring endocrine-disrupting compounds in urban waste water treatment plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 742–752.

ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(3), 241–248.

SCHMITT, M.; GELLERTB, G.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. (2005). The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water Research* 39, 3211–3218.

SERRANO GALLEGU, R. (2003). Introducción Al Análisis de Datos Experimentales: Tratamiento de Datos en Bioensayos. Universitat Jaume I.

SHIKLOMANOV, I.A.; RODDA, J. (2003). World Water Resources at the Beginning of the Twenty-First Century. Cambridge University Press.

SORLINI, C.; ANDREONI, V.; FERRARI, A.; RANALL, G. (1986). The influence of some phenolic acids present in oil-mill waters on microbio groups for the methanogenesis. International Symposium on olive by products valorization, Sevilla.

TOLLEFSEN, K.E.; HARMAN, C.; SMITH, A.; THOMAS, K.V. (2007). Estrogen receptor (ER) agonists and androgen receptor (AR) antagonists in effluents from Norwegian North Sea oil production platforms. *Marine Pollution Bulletin* 54(3), 277–283.

U.S. EPA. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, fifth ed. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460. EPA-821-R-02-012.

UNE-EN ISO 6341. (2013). Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (cladóceras, Crustacea).

UNE-EN ISO 8692. (2012). Ensayo de inhibición de algas de agua dulce con algas verdes unicelulares.

UNE-ISO 17512-1. (2008) .Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour . (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).

VOLATIER, L. (2004). Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe: études en bioessais et canaux artificiels. Thèse-Spécialité Sciences et Techniques du Déchet au LSE de l'ENTPE. INSA de Lyon.

WALSH, G.E. (1988). Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 979–987.