

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



**VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD DE  
AFLUENTES Y EFLUENTES DE ESTACIONES  
DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES  
(EDARs) DE LA COMUNIDAD VALENCIANA  
MEDIANTE BATERÍA DE ENSAYOS**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ALUMNO/A: Victor Caso Gregori**

**TUTOR/A: M<sup>a</sup> Ángeles Castillo López**

**COTUTOR/A: Consuelo Sabater Marco**

**Curso Académico: 2015-2016**

**VALENCIA, JULIO 2016**

## Datos personales

Alumno/a: Victor Caso Gregori

## Datos del Trabajo Fin de Grado

Título del TFG:	Valoración de la toxicidad de afluentes y efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) de la Comunidad Valenciana mediante batería de ensayos.
Lugar de realización:	Departamento de Biotecnología
Fecha de lectura:	Julio 2016
Titulación:	Grado en Biotecnología
Especialidad:	Toxicología ambiental
Director/a:	M <sup>a</sup> Ángeles Castillo López
Codirector/a:	Consuelo Sabater Marco

## Resumen

Las diversas actividades humanas contaminan los ecosistemas de la Tierra, pero sobre todo cabe destacar los efectos que provocan en el agua. Cada año se detectan miles de compuestos diferentes en ríos, lagos, mares, etc., que provocan alteraciones en la ecología acuática. Estos compuestos son incorporados al medio ambiente por la actividad industrial, agrícola y por efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, donde, en muchos casos, no se consigue una eliminación completa de los mismos, causando efectos ecotoxicológicos. El uso de bioensayos nos da la posibilidad de obtener datos sobre dichos efectos, permitiendo evaluar los riesgos ambientales ligados a las sustancias tóxicas presentes; no obstante, los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que la prevalencia de cada sustancia depende del tipo de contaminación del que se trate así como del nivel de depuración que experimentan. Además, en muchas ocasiones las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas y la problemática todavía se agrava más por la presencia simultánea de diversos compuestos contaminantes.

Objetivo: Analizar la calidad ecotoxicológica de aguas procedentes de afluentes y efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de Valencia. Para ello, se realizan tres bioensayos: ensayo de reproducción y ensayo agudo de inmovilización del microcrustáceo *Daphnia magna* y ensayo de viabilidad celular con tres especies de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora* sp. y *Rhodotorula* sp.). También se evalúa la eficacia de los tratamientos de depuración de aguas residuales llevados a cabo en las EDARs estudiadas.

## Palabras clave

Ecotoxicidad, Bioensayos, Aguas residuales, Depuración, *Daphnia*, Levaduras

## Resum

Les diverses activitats humanes contaminen els ecosistemes de la Terra, però sobretot cal destacar els efectes que provoquen en l'aigua. Cada any es detecten milers de compostos diferents en rius, llacs, mars, etc., que provoquen alteracions en l'ecologia aquàtica. Estos compostos són incorporats al medi ambient per l'activitat industrial, agrícola i per efluent d'estacions depuradores d'aigües residuals, on, en molts casos, no s'aconsegueix una eliminació completa dels mateixos, causant efectes ecotoxicològics. L'ús de bioassajos ens dóna la possibilitat d'obtenir dades sobre aquests efectes, permetent avaluar els riscos ambientals lligats a les substàncies tòxiques presents; no obstant açò, els riscos que segueixen a la contaminació de l'aigua són difícils de precisar, ja que la prevalença de cada substància depèn del tipus de contaminació de què es tracte així com del nivell de depuració que experimenten. A més, en moltes ocasions les dosis tòxiques sobre les quals es treballa són molt xicotetes i la problemàtica encara s'agreuja més per la presència simultània de diversos compostos contaminants.

Objectiu: Analitzar la qualitat ecotoxicològica d'aigües procedents d'afluent i efluent d'estacions depuradores d'aigües residuals de la província de València. Per a açò, es realitzen tres bioassajos: assaig de reproducció i assaig agut d'immobilització del microcrustaci *Daphnia magna* i assaig de viabilitat cel·lular amb tres espècies de llevats (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora* sp. i *Rhodotorula* sp.). També s'avalua l'eficàcia dels tractaments de depuració d'aigües residuals duts a terme en les EDARs estudiades.

## Paraules clau

Ecotoxicitat, Bioassajos, Aigües residuals, Depuració, *Daphnia*, Llevats

## Abstract

Several human activities pollute the ecosystems on Earth, but especially include the effects they cause in the water. Every year thousands of different compounds in rivers, lakes, seas, etc., which cause changes in aquatic ecology are detected. These compounds are incorporated into the environment by industrial and agricultural activity and effluents from sewage treatment plants, where, in many cases, not a complete removal is achieved, causing ecotoxicological effects. The use of bioassays gives us the possibility to obtain data on these effects, allowing assessing the environmental risks associated with toxic substances; however, the risks related to water pollution are difficult to pinpoint, since the prevalence of each substance depends on the type of pollution concerned and the level of treatment received. Moreover, often toxic doses on which you work are very small and the problem is still further aggravated by the simultaneous presence of different pollutants compounds.

Objective: To analyze the ecotoxicological quality of water from influent and effluent wastewater treatment plants in the province of Valencia. For this purpose, there have been three essays: reproduction test, acute test about the immobilization of *Daphnia magna* microcrustacean and cell viability assay with three species of yeast ( *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora* sp. and *Rhodotorula* sp. ). Also it is evaluated the effectiveness of sewage treatments carried out in the WWTPs studied.

## Keywords

Ecotoxicity, Bioassays, Wastewaters, Sewage treatment, *Daphnia*, Yeasts

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. La problemática de la contaminación del agua.....	2
1.2. Contaminantes emergentes.....	3
1.3. Depuración de aguas residuales.....	4
1.3.1 Tipos de tratamientos .....	5
1.4. Nuevos tratamientos de descontaminación de aguas residuales.....	6
1.5. Utilización de bioensayos en estudios de toxicidad.....	7
1.5.1. Bioensayos con <i>Daphnia magna</i> .....	9
1.5.2. Bioensayos con levaduras .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1. Origen de las muestras.....	12
3.1.1. Obtención de las muestras.....	14
3.2. Ensayos de toxicidad con <i>Daphnia magna</i> .....	14
3.2.1. Organismo de ensayo .....	14
3.2.2. Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> .....	15
3.2.2.1. Metodología utilizada en el ensayo .....	15
3.2.2.2. Procesamiento de los resultados .....	16
3.2.3. Ensayo de toxicidad crónica con <i>Daphnia magna</i> .....	16
3.3.2.1. Metodología utilizada en el ensayo .....	16
3.3.2.2. Procesamiento de los resultados .....	16
3.3. Ensayos de toxicidad con levaduras.....	16
3.3.1. Organismos de ensayo .....	16
3.3.2. Preparación y extracción de las muestras.....	17
3.3.3. Equipos utilizados.....	17
3.3.4. Metodología utilizada en el ensayo .....	18
3.3.5. Procesamiento de los resultados .....	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>20</b>
4. 1. Ensayos de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> .....	20
4.1.1. Ensayo de inmovilización a las 24 horas.....	20
4.1.2. Ensayo de inmovilización a las 48 horas.....	24
4.2. Ensayo de toxicidad crónica con <i>Daphnia magna</i> .....	28
4.2.1. Mortalidad.....	28
4.2.2. Reproducción.....	28
4.3. Ensayo de toxicidad con levaduras.....	31

5. CONCLUSIONES.....	38
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de contaminantes considerados como emergentes .....	2
<b>Tabla 2.</b> Información relevante para la selección de especies para bioensayos .....	9
<b>Tabla 3.</b> Caudales, poblaciones y tratamientos de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales de la provincia de Valencia. ....	13
<b>Tabla 4.</b> Porcentajes de inhibición de la movilidad de <u>D.magna</u> expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua, a las 24 horas de ensayo .....	21
<b>Tabla 5.</b> Valores LID para <u>D. magna</u> de las muestras de agua, a las 24 horas de ensayo .....	22
<b>Tabla 6.</b> Valores MID para <u>D. magna</u> de las muestras de agua, a las 24 horas de ensayo .....	22
<b>Tabla 7.</b> Porcentajes de inhibición de la movilidad de <u>D.magna</u> expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua, a las 48 horas de ensayo .....	25
<b>Tabla 8.</b> Valores LID para <u>D. magna</u> de las muestras de agua, a las 48 horas de ensayo .....	26
<b>Tabla 9.</b> Valores MID para <u>D. magna</u> de las muestras de agua, a las 48 horas de ensayo .....	26
<b>Tabla 10.</b> Número medio de crías acumuladas/muestra, al finalizar el ensayo (día 21) .....	28
<b>Tabla 11.</b> Análisis de regresión de la evolución del número total de crías acumuladas/día de <u>D. magna</u> para cada muestra en el ensayo de toxicidad crónica. ....	29
<b>Tabla 12.</b> Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura <u>Hanseniaspora</u> expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua.....	32
<b>Tabla 13.</b> Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura <u>Rhodotorula</u> expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua.....	33
<b>Tabla 14.</b> Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura <u>Saccharomyces</u> expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua.....	34
<b>Tabla 15.</b> Valores LID para las tres especies de levaduras .....	35
<b>Tabla 16.</b> Valores MID para las tres especies de levaduras, con los intervalos de confianza al 95%.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Croquis de las líneas de una EDAR .....	5
<b>Figura 2.</b> Hembra de <u>Daphnia magna</u> .....	9
<b>Figura 3.</b> Localización EDARs estudiadas, Provincia de Valencia. ....	12
<b>Figura 4.</b> Microplacas de 12 pocillos usadas para el ensayo de toxicidad aguda con <u>Daphnia magna</u> .....	15
<b>Figura 5.</b> Sistema de extracción a vacío Extra Vac 12 (Scharlau) para cartuchos de SPE .....	17
<b>Figura 6.</b> Lector de microplacas TECAN Infinite M200 .....	18
<b>Figura 7.</b> Cámara climatizada modelo LMS .....	18

<b>Figura 8.</b> Porcentaje medio de inmovilización de <u>D. magna</u> de las muestras de agua para las diluciones 1:1 y 1:2, a las 24 horas de ensayo.....	20
<b>Figura 9.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 10.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:2 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 11.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:4 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 12.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:8 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 13.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 14.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:32 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 15.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:64 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	23
<b>Figura 16.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad de <u>D. magna</u> de las muestras de agua para las diluciones 1:1 y 1:2, a las 48 horas de ensayo.....	24
<b>Figura 17.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 18.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:2 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 19.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:4 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 20.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:8 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 21.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 22.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:32 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 23.</b> Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:64 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).....	27
<b>Figura 24.</b> Número total de crías/muestra de <u>D. magna</u> , a los 21 días de ensayo.....	29
<b>Figura 25.</b> Evolución del número de crías de <u>D. magna</u> de la muestra control y de las muestras tomadas a la entrada de las EDARs, a lo largo de los 21 días de ensayo.....	30
<b>Figura 26.</b> Evolución del número de crías de <u>D. magna</u> de la muestra control y de las muestras tomadas a la salida del tratamiento secundario de las EDARs, a lo largo de los 21 días de ensayo.....	30
<b>Figura 27.</b> Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura <u>Hanseniaspora</u> para las diluciones 1:1 y 1:2 de las muestras de agua.....	32
<b>Figura 28.</b> Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura <u>Rhodotorula</u> para las diluciones 1:1 y 1:2 de las muestras de agua.....	33

<b>Figura 29.</b> Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura <u>Saccharomyces</u> para las diluciones 1:1 y 1:2 de las muestras de agua .....	34
<b>Figura 30.</b> Porcentaje de viabilidad celular/muestra de <u>Hanseniaspora, Rhodotorula y Saccharomyces</u> .....	35
<b>Figura 31.</b> Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para <u>Hanseniaspora</u> .....	37
<b>Figura 32.</b> Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para <u>Hanseniaspora</u> .....	37
<b>Figura 33.</b> Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para <u>Rhodotorula</u> .....	37
<b>Figura 34.</b> Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para <u>Rhodotorula</u> .....	37
<b>Figura 35.</b> Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para <u>Saccharomyces</u> . ....	37
<b>Figura 36.</b> Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para <u>Saccharomyces</u> . ....	37



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. La problemática de la contaminación del agua

El agua es un recurso fundamental para nuestras vidas y para el conjunto de los ecosistemas existentes en nuestro planeta, de forma que es imprescindible disponer de una cantidad de agua suficiente y con adecuada calidad, pues de acuerdo al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), alrededor de un quinto de la población mundial vive en áreas de escasez física de agua. Por tanto, entre los diversos problemas ambientales, los relacionados con el agua son quizás los más importantes debido a la seria amenaza que representan para la humanidad.

En los últimos tiempos, el rápido desarrollo humano y económico que trajo consigo la industrialización y el aumento de la demanda de agua asociada a este desarrollo, unido a la escasez de los recursos hídricos anteriormente mencionada, ha impuesto la necesidad de recuperar y reutilizar las aguas residuales de una manera respetuosa con el medio ambiente (Kamizouliset *al.*, 1999).

Numerosas sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, industria o medicina se han ido vertiendo al medio ambiente. La aparición de dichas sustancias tóxicas y la variación de las concentraciones de los constituyentes comunes tienen su origen en el denominado ciclo del agua. La calidad del agua se ve alterada en algún punto de este ciclo, siendo las principales vías de entrada de contaminantes, en el medio ambiente acuático, las aguas residuales, incluyendo las urbanas, industriales y las de origen agrícola o ganadero (Jurado *et al.*, 2012). Por ello, muchas de las investigaciones se centran en la búsqueda de nuevos métodos más efectivos para la eliminación de dichas sustancias nocivas o métodos que mejoren las técnicas ya existentes utilizadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP) que permitan detectar la calidad del agua y los posibles efectos en el ecosistema.

Actualmente, un tipo de evaluación de la calidad del agua se basa en la realización de bioensayos. Sin embargo, los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que la prevalencia de cada sustancia depende del tipo de contaminación del que se trate así como del nivel de depuración que experimentan. Además, en muchas ocasiones las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas y la problemática todavía se agrava más por la presencia simultánea de diversos compuestos contaminantes.

Así pues, a la hora de aplicar un método de tratamiento a las aguas contaminadas hay que tener en cuenta la naturaleza y las propiedades físico-químicas de éstas, así como los efluentes a tratar. Dichas aguas contaminadas por la actividad humana, por lo general, pueden ser procesadas de forma eficiente mediante distintos métodos, incluyendo los tratamientos biológicos, la adsorción con carbón activado, la filtración con membranas o los tratamientos químicos convencionales. Sin embargo, cada una de estas opciones tiene sus ventajas y limitaciones, lo cual hace esencial la adaptación de estos métodos a la aplicación de eliminación de los contaminantes que corresponda (Silva *et al.*, 2012).

Además, las aguas residuales industriales, a diferencia de las aguas urbanas y domésticas, presentan una menor homogeneidad en cuanto a composición y carga contaminante, lo cual dificulta en mayor medida la eliminación de la contaminación. Por ello, en algunos casos la metodología empleada no es eficaz y los efluentes pueden contener pequeñas concentraciones de estos compuestos contaminantes o incluso sustancias derivadas de éstos que son igualmente tóxicas para el medio ambiente o que debido a la ineficacia de los tratamientos depurativos puedan llegar a acumularse en el medio acuático aumentando cada vez más su concentración, como ocurre, por ejemplo, con el caso de los compuestos contaminantes con actividad endocrina.

## 1.2. Contaminantes emergentes

En los últimos años, se han destinado muchos esfuerzos al análisis y control de microcontaminantes presentes en el medio acuático con propiedades tóxicas y de difícil tratamiento por su elevada estabilidad, los llamados “contaminantes prioritarios”. No obstante, en términos de número de productos químicos de uso comercial, los contaminantes prioritarios representan sólo un pequeño porcentaje del total de productos químicos que se pueden detectar en el medio ambiente. La mayoría de estos compuestos orgánicos, están poco estudiados y, para ellos, no se han establecido todavía criterios de calidad ambiental.

Dentro de los contaminantes prioritarios se encuentran un gran número, de los conocidos, como contaminantes emergentes. Éstos son aquellos contaminantes desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, aunque su detección es relativamente reciente. En la mayoría de los casos corresponden a contaminantes no regulados de los que a día de hoy se desconocen sus efectos potenciales por lo que es difícil predecir qué efectos pueden provocar en la salud de los seres humanos y en el medio ambiente. Dichos contaminantes emergentes comprenden un grupo diverso de compuestos, tal y como se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de contaminantes considerados como emergentes.

<b>CONTAMINANTES EMERGENTES</b>	
<b>Grupos de compuestos</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Productos farmacéuticos</b> <i>Antibióticos (de uso humano y animal)</i>  <i>Analgésicos y anti-inflamatorios</i>  <i>Fármacos psiquiátricos</i> <i>Anti-epilépticos</i> <i>Reguladores de lípidos</i> <i>B-bloqueadores</i> <i>Rayos-X, contraste de</i>	<i>Trimetoprim, eritromicina, lincomicina, Sulfametoxazol, flumequina, Codeína, ibuprofeno, acetaminofen, ácido acetil salicílico, diclorofenaco, fenoprofen Diazepan</i> <i>Carbamazepina</i> <i>Benzafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico</i> <i>Metoprolol, propanolol, timolol</i> <i>Iopromide, iopamidol, diatrizoato</i>
<b>Esteroides y hormonas (anticonceptivos)</b>	<i>Estradiol, estrona, estriol, dietilbestrol</i>
<b>Productos de higiene personal</b> <i>Fragancias</i> <i>Cremas solares, compuestos activos</i> <i>Repelentes de insectos</i>	<i>Nitro, policíclic y macroclic almizcle</i> <i>Benzofenona</i> <i>N,N-dietiltoluamida</i>
<b>Antisépticos</b> <b>Detergentes y sus metabolitos</b>	<i>Triclosan, clorofeoe</i> <i>Etoxilatos de alquilfenol, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), carboxilatos de Alquilfenol</i>
<b>Retardadores de llama</b>	<i>Difenil éteres polibrominados (PBDEs), bisfenol A tetrabromo, Tris(2-cloroetil)fosfato</i>
<b>Aditivos industriales</b>	<i>Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos</i> <i>Aromáticos</i>
<b>Aditivos de gasolina</b>	<i>Dialquil éteres, metil-ter-butil éter (MTBE)</i>
<b>Subproductos de desinfección</b>	<i>Bromoácidos, bromoacetónitros, Bromoaldehídos, cianoformaldehídos</i>

La reciente detección de este grupo de contaminantes se debe en gran medida al desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis, tales como la cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y la cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría

de masas (MS), que permiten llegar a límites de detección de concentraciones traza ( $\mu\text{g/L}$  o  $\text{ng/L}$ ). Muchos estudios han demostrado la presencia de microcontaminantes, principalmente de naturaleza orgánica, en aguas superficiales, en aguas residuales e incluso en aguas depuradas. La principal fuente de entrada en el medioambiente de dichos contaminantes es a través de aguas residuales no tratadas y los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (Marugán *et al.*, 2012). Estas plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales no están diseñadas para la eliminación de este tipo de microcontaminantes, por lo que su eliminación en algunos casos no es eficaz.

De este modo, la gran preocupación generada por este tipo de sustancias se debe al efecto negativo que pueden causar en el medio ambiente por su continua incorporación. Pese a que los contaminantes emergentes están sujetos a procesos de degradación (biodegradación y degradación química y fotoquímica) que contribuyen a su eliminación, en la mayoría de los casos, pueden llegar a formarse productos que difieren en comportamiento ambiental y perfil ecotoxicológico (Sánchez-Prado *et al.*, 2010). Este tipo de contaminantes representa un riesgo potencial para las especies vivas, puesto que se ha comprobado que muchos de ellos presentan efectos de mutación genética, carcinogénesis, defectos congénitos y disrupción del sistema endocrino (Bolong *et al.*, 2009).

### **1.2.1. Disruptores endocrinos (EDCs)**

Entre los contaminantes emergentes que han suscitado mayor preocupación y estudio en los últimos años destacan los denominados disruptores endocrinos (EDCs), cuyos efectos pueden llegar a tener una enorme repercusión tanto en la salud humana como en la de los organismos.

Un disruptor endocrino es un agente exógeno que causa efectos adversos en la salud de un organismo provocando cambios en la función endocrina, pudiendo imitar o antagonizar las acciones de las hormonas (European Commission, 1997), las cuales son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos.

En las últimas décadas, se ha prestado cada vez más atención a la aparición de las alteraciones endocrinas por xenobióticos. Los disruptores endocrinos pueden ser productos químicos sintéticos o naturales, medicamentos u hormonas naturales, estimándose que anualmente se producen alrededor de quinientos nuevos compuestos químicos de síntesis, que al ser liberados al medio ambiente pueden interactuar con los seres vivos, todos ellos con estructuras químicas y usos muy variados sobre los que se conoce o se sospecha su actividad estrogénica. La exposición de los seres vivos a los disruptores endocrinos es universal, ya que se encuentran repartidos por todo el mundo como consecuencia de un empleo generalizado. Contribuye a ello su baja biodegradabilidad, el transporte a otros lugares por el aire, el agua y la bioacumulación en la cadena trófica. Además, los compuestos acumulados en la grasa son transmitidos a la descendencia a través de la madre durante la gestación y después de la lactancia (Rivas *et al.*, 2004).

En los seres humanos, entre los efectos adversos que pueden llegar a provocar dichos compuestos se encuentran los desórdenes de carácter reproductivo, la aparición de cánceres dependientes de hormonas y las anomalías en el comportamiento normal reproductivo. También se han documentado numerosos efectos sobre la población animal, como es el caso de moluscos, crustáceos, peces, reptiles, aves y mamíferos, entre los que destacan alteraciones de la función tiroidea en aves y peces, disminución de la fertilidad en aves, peces, moluscos y mamíferos, disminución de la eficacia en el proceso de incubación en peces, aves y tortugas, desmasculinización y feminización de peces machos, aves y mamíferos, desfeminización y masculinización de peces hembras, gasterópodos y aves y, finalmente, alteraciones del sistema inmune en aves y mamíferos (Ma *et al.*, 2005; Sole *et al.*, 2001).

Estas sustancias que interactúan directamente con el receptor, son contaminantes capaces de actuar a concentraciones muy bajas, lo que dificulta su detección cuando se encuentran por debajo de los límites de detección de los procedimientos analíticos (Fernández *et al.*, 2009).

Los efluentes industriales y municipales y los desechos urbanos y agrícolas son importantes fuentes de vertidos de EDCs dentro del medio acuático. Se estima que un tercio de los efluentes municipales e industriales en Europa son fuertemente estrogénicos (Bistan *et al.*, 2011). En particular, destacan los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales de origen doméstico ya que pueden contener estrógenos sintéticos (por ejemplo etinilestradiol) utilizados en formulaciones de anticonceptivos y para el tratamiento de condiciones hormonales que son excretados con la orina y que son sólo parcialmente eliminados por tratamiento convencional (Mauricio *et al.*, 2006).

Compuestos como nonilfenol, bisfenol A, y los estrógenos esteroideos naturales y sintéticos tales como estrona,  $17\beta$ -estradiol (E2), estriol y  $17\alpha$ -etinil estradiol, han sido identificados como los principales contaminantes. Su presencia en las aguas residuales se agrava ya que algunos son eliminados por el hombre como restos glucurónidos y sulfatos solubles en agua, pudiéndose disociar de nuevo en estrógenos libres más activos (Fernández *et al.*, 2009). Por tanto, es de máxima importancia el desarrollo de herramientas que puedan detectar la presencia de disruptores endocrinos en aguas (Bistan *et al.*, 2011; Noguerol *et al.*, 2006; Céspedes *et al.*, 2004).

La clave para resolver el problema que se plantea es la identificación de los EDCs, la medida real de su presencia en sistemas acuáticos y el desarrollo de métodos más eficaces para la eliminación de éstos (Liu *et al.*; 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la implementación de tratamientos de eliminación en EDARs se complica por el elevado volumen de aguas a tratar. Además, la escasez cada vez mayor de aguas de abastecimiento, de agua potable y el incremento de consumo de agua por la industria y la agricultura hacen que la reutilización de las aguas residuales está creciendo en importancia, pero se ha de tener cuidado en su uso para obtener los máximos beneficios y minimizar los riesgos.

A pesar de que muchos estudios han demostrado los numerosos efectos de los EDCs, todavía muchos países no tienen establecidos los límites en el vertido de EDCs en aguas residuales (Belgiorno *et al.*, 2007). En Europa, existen varias normativas que regulan los disruptores endocrinos. En 1999 La Comisión Europea publicó la Estrategia Comunitaria en materia de alteradores endocrinos COM (1999)706, que estableció las líneas de actuación a corto, medio y largo plazo para hacer frente a los riesgos de la salud ocasionados por los EDCs. A lo largo de los años 2001, 2004 y 2007 la Comisión ha ido publicando informes sucesivos sobre la aplicación de la estrategia. Entre otras iniciativas destacan el establecimiento de una lista prioritaria de sustancias con capacidad de alteración endocrina, actualizaciones periódicas de estas listas que generan la adecuación de nuevas propuestas de normas de calidad ambiental para este tipo de sustancias, identificación de grupos de población vulnerables y mediciones de niveles de EDCs en el medioambiente. En el caso de España, el único avance importante ha sido la inclusión de una anotación "ae" (alteración endocrina) en la lista de valores límite de exposición profesional a agentes químicos que publica anualmente el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Romano-Mozo, 2012).

### **1.3. Depuración de aguas residuales**

En la actualidad, las medidas legislativas adoptadas tratan de evitar la contaminación del agua. Es por ello, que la mayoría de las aguas domésticas e industriales son colectadas y posteriormente depuradas antes de ser vertidas nuevamente al medio natural (ríos, lagos, mares, etc.). La depuración de aguas residuales se lleva a cabo en las llamadas estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), también conocidas como plantas de depuración o plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP). Son instalaciones que limpian y tratan las

aguas residuales para que puedan ser devueltas al medio natural. Por lo tanto, su principal objetivo es conseguir que a partir de aguas residuales y mediante diferentes procesos físicos, químicos y biotecnológicos, un agua efluente de mejores características de calidad y cantidad, tomando como base ciertos parámetros normalizados.

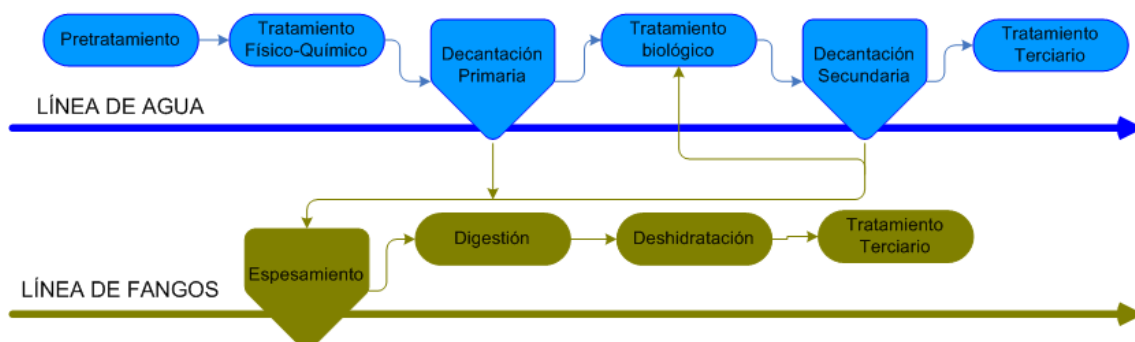
En general, las estaciones depuradoras de aguas residuales tratan agua residual local, procedente del consumo ciudadano en su mayor parte, así como de la escorrentía superficial del drenaje de las zonas urbanizadas y el agua procedente de pequeñas ciudades, mediante procesos y tratamientos más o menos estandarizados y convencionales. Existen también EDARs diseñadas para grandes empresas, con tratamientos especializados del agua residual que se genera. Por lo tanto, se distinguen dos tipos de EDARs principalmente: las urbanas y las industriales (García *et al.*, 2001).

Las aguas residuales pueden contener diferentes tipos de contaminación, ya sea física, con sólidos, temperatura, olor y color, o química, la cual está causada por productos químicos inorgánicos (mercurio, aluminio, nitratos, fosfatos, etc.) u orgánicos (por ejemplo, plaguicidas) procedentes de vertidos incontrolados, tanto domésticos, como agrarios o industriales. También existe la contaminación biológica debida a la presencia de virus, bacterias y parásitos, que pueden vivir en el agua y provocar problemas sanitarios, o incluso la contaminación por radioactividad (Hernández *et al.*, 1995).

Por ello, existen parámetros normalizados para la medida de la contaminación en general, que se puede estimar con indicadores medioambientales como la DBO5 (demanda biológica o bioquímica de oxígeno), que es la cantidad de oxígeno disuelto consumida durante la oxidación por vía biológica de la materia orgánica biodegradable en un periodo normalizado de 5 días. Por otra parte, la DQO (demanda química de oxígeno) es la cantidad de oxígeno disuelto consumida durante la oxidación “por vía química” de la materia orgánica presente en un agua residual. Además, existen otros parámetros muy aleatorios como es la cantidad de sólidos totales (ST) que se refiere a la materia sólida total presente, independientemente de que su naturaleza sea orgánica o inorgánica (García *et al.*, 2001).

### 1.3.1. Tipos de tratamientos

Los tratamientos convencionales que se emplean en las estaciones depuradoras de aguas residuales son el pretratamiento, el tratamiento primario, el tratamiento secundario, el tratamiento terciario y la línea de fangos (Figura 1).



**Figura 1.** Croquis de las líneas de una EDAR (Hernández *et al.*, 1995).

El pretratamiento tiene como objetivo la separación de partículas sólidas gruesas (>1mm) para no dañar a los equipos de los tratamientos posteriores e incluye etapas como el desbaste, el desengrasado y el desarenado.

Los tratamientos físicos, asociados en el ámbito europeo a la terminología tratamiento primario, consisten fundamentalmente en separar la contaminación presente en el agua en suspensión, flotación o arrastre. De este modo, tras el pretratamiento, se realiza como tratamiento primario una decantación primaria para la eliminación de las partículas menores de un determinado tamaño (sólidos en suspensión) que no hayan podido eliminarse a lo largo del pretratamiento. Esto se logra mediante una decantación o sedimentación primaria.

A continuación, el proceso de depuración tiene como finalidad eliminar la materia orgánica biodegradable, conocido como tratamiento secundario. Para ello se utilizan tratamientos biológicos con microorganismos en biorreactores, normalmente en condiciones aerobias, para transformar la materia orgánica biodegradable en sus componentes minerales. Tras el paso por el biorreactor el agua suele entrar en un sedimentador para conseguir la sedimentación de la biomasa, conocida como decantación secundaria, y su posterior recirculación.

Seguidamente, le seguirían los tratamientos terciarios, tratamientos físico-químicos e incluso biológicos destinados a afinar algunas características del agua efluente de la depuradora con vistas a su empleo para un determinado uso.

En cuanto a la línea de fangos, hay que tener en cuenta que los fangos procedentes de las decantaciones reciben un tratamiento especial (espesamiento, digestión y deshidratación) hasta que son susceptibles de ser tratados como residuo sólido urbano o incinerados, o bien a un subproducto capaz de, tras otros tratamientos como la estabilización o el compostaje, ser reutilizado como abono en la agricultura u otros usos (Hernández *et al.*, 1995).

Además de éstos, también existen tratamientos adicionales, como son los tratamientos de desinfección que tratan de eliminar a los agentes patógenos (cloración) y los tratamientos especiales que buscan eliminar sustancias específicas, como los metales pesados.

#### **1.4. Nuevos tratamientos de descontaminación de aguas residuales**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la contaminación del agua por la continua aportación de una gran variedad de contaminantes y la necesidad de conservar el medio ambiente ha provocado la búsqueda y desarrollo de nuevos métodos cada vez más eficientes para descontaminar las aguas residuales.

De todos los procedimientos, los métodos biológicos, tanto aerobios como anaerobios, han sido reconocidos por ser la forma más viable de depuración de aguas residuales. Sin embargo la alta toxicidad de los efluentes puede inhibir parcialmente los microorganismos, particularmente sensibles a la presencia de algunos componentes orgánicos (Peres *et al.*, 2004), lo cual resulta en una disminución de la actividad de degradación (Bernardo *et al.*, 2011).

La biodegradabilidad es un factor importante a considerar cuando se elige un tratamiento de aguas residuales apropiado. Muchos estudios han demostrado que los procesos biológicos usados para el tratamiento de estas aguas, especialmente los lodos activados, resultan en una reducción insuficiente de la demanda química de oxígeno (DQO) debido a la baja biodegradabilidad del contenido orgánico, especialmente de los componentes fenólicos que también presentan una toxicidad significativa. Por ello, han sido estudiados varios métodos fisicoquímicos para mejorar esa disminución de la DQO e incrementar la biodegradabilidad (Bernardo *et al.*, 2011).

Para aumentar la biodegradabilidad de la materia orgánica de las aguas residuales se han propuesto diferentes tecnologías (Segneanu *et al.*, 2013):

- Procesos no-destructivos basados en procesos físicos de adsorción y/o filtración.
- Procesos biológicos destructivos mediante lodos activados.

- Procesos oxidativos destructivos basados en procesos de oxidación química, que a su vez pueden incluirse en una de estas categorías:
  - Incineración.
  - WO (“Wet Oxidation”): Alta temperatura de presión y temperatura.
  - Oxidación líquida: AOPs (Procesos de oxidación avanzada), operando en condiciones de presión y temperatura mediante el uso de agentes oxidantes como el O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con catalizadores y/o radiaciones UV.

De todos estos procedimientos o tecnologías, los AOPs constituyen los más estudiados y sobre los que se dirigen la mayoría de los esfuerzos en investigación. Los AOPs se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. Entre los AOPs más estudiados en el tratamiento de aguas residuales se encuentran la fotocatálisis heterogénea y homogénea, la ozonización, la reacción de Fenton, los ultrasonidos, la oxidación electroquímica y la oxidación en húmedo del aire (Rizzo, 2011).

### 1.5. Utilización de bioensayos en estudios de toxicidad

La evaluación medioambiental de sustancias y productos químicos tiene como objetivo principal estimar los riesgos que una sustancia química puede ocasionar en el medio ambiente tras su aplicación o emisión.

El procedimiento de evaluación medioambiental se fundamenta en:

- Una identificación del peligro que permite evaluar la peligrosidad potencial de una sustancia.
- Una valoración del riesgo que permite estimar la probabilidad de que ocurran efectos adversos, es decir, de que una sustancia peligrosa para el medio supere una concentración umbral que origina daños en los organismos del medio.

La ecotoxicología o toxicología ambiental, integra los efectos ecológicos y toxicológicos de los contaminantes químicos sobre las poblaciones, comunidades y ecosistemas con el destino de dichos contaminantes en el ambiente (Chapman, 1995). Así, esta rama de la toxicología, comprende el estudio de la relación dosis-efecto de contaminantes presentes en el ambiente respecto de los sistemas bióticos, abarcando niveles de organización inferiores y superiores al de los organismos individuales. A su vez, la ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones (Ronco *et al.*, 2004). En este sentido, el objetivo fundamental de la ecotoxicología es poder predecir los efectos ecológicos de los contaminantes en los organismos (Cairns *et al.*, 1989).

Los ensayos de toxicidad o bioensayos, son procedimientos en los cuales se miden las respuestas de los organismos expuestos a una o varias sustancias, residuos o factores ambientales aislados o en combinación. Es decir, comprenden cualquier ensayo en el cual el poder o potencia del tóxico es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Ronco *et al.*, 2004). Son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar los efectos de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas 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 protocolización 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 (Clément, 2006; Volatier, 2004 ). Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios



morfológicos, fisiológicos o histológicos. Asimismo, los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. De esta manera, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo.

Los tipos de bioensayos se pueden clasificar de acuerdo al procedimiento, la duración del ensayo o tipo de respuesta y la infraestructura del laboratorio.

- Según el procedimiento:
  - Ensayos de toxicidad con muestra única: son aquellos que se realizan a partir de una sustancia química pura conocida o con una muestra de aguas residuales compleja. Estos bioensayos permiten determinar la concentración necesaria para producir una cierta respuesta indicativa de toxicidad de las muestras evaluadas. El desarrollo de estos ensayos se realiza a nivel de laboratorio.
  - Ensayo de toxicidad con efluentes: se realizan para determinar la calidad toxicológica de un efluente de vertido constante o variable. El agua residual se toma continuamente de una conducción de descarga perforada en un punto apropiado.
  - Bioensayos *in situ*: estos se realizan en el sitio de descarga y permiten determinar si las aguas receptoras del vertido o de otros contaminantes producen una respuesta medible, que por lo general es la muerte de los organismos de ensayo.
- Según el tipo de respuesta:
  - Bioensayos de toxicidad aguda: éstos cuantifican las concentraciones letales de una o más sustancias para una especie en particular y por lo general son de corta exposición (24-96 horas). El tiempo del bioensayo debe ser constante y suficiente para que los efectos de las sustancias evaluadas proporcionen unas respuestas claras y bien definidas en las especies expuestas. El valor calculado se denomina concentración letal media ( $CL_{50}$ ), y representa la concentración que causa la muerte del 50% de la población experimental, en un tiempo determinado.
  - Bioensayos de toxicidad crónica: por definición son bioensayos de larga exposición. Generalmente días, semanas e incluso meses y se extiende sobre un periodo de vida de las especies utilizando como medida de la respuesta parámetros tales como capacidad reproductiva, crecimiento, longevidad, número de crías, etc. Se estima la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), que es la concentración de la sustancia que causa un efecto al 50 % de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del estadio de vida considerado o del ciclo de vida del organismo empleado.
- Según la infraestructura del laboratorio:
  - Estáticos: se efectúa sin renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo. Las desventajas están dadas por la posible degradación de las sustancias a ensayar y por la acumulación de las excretas de los animales en los recipientes durante el ensayo. Cuando no hay renovación de las diluciones los organismos se exponen a la misma solución de prueba el tiempo de duración del ensayo. Si se produce renovación de las diluciones sometidas al ensayo, los organismos se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada. Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes

sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente en los resultados del ensayo.

- De flujo continuo: circula continuamente una corriente de sustancia de prueba de ensayo nueva en contacto con los individuos experimentales, a través de una fuente de suministro de agua y una unidad dosificadora de la sustancia a evaluar. Con este tipo de ensayo se eliminan la mayoría de los efectos negativos que aparecen en los sistemas estáticos.

Los bioensayos se pueden plantear a nivel de ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos, y siempre se realizan de acuerdo a los protocolos normalizados por los organismos internacionales (OCDE, ASTM, CEE, UE, ISO, USEPA), en especies representativas de cada uno de los niveles tróficos que componen el ecosistema estudiado. Las especies utilizadas en estos bioensayos se seleccionan en función de los criterios reflejados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Información relevante para la selección de especies para bioensayos.

- ✓ Especie cosmopolita
- ✓ Organismos de demostrada sensibilidad a tóxicos
- ✓ Organismos o etapas de su ciclo biológico que ofrezcan la menor variabilidad
- ✓ Especies sobre las que se disponga de suficiente información sobre su biología
- ✓ Estabilidad genética y uniformidad de poblaciones
- ✓ Ciclo de vida corto
- ✓ Mantenimiento en laboratorio fácil y sencillo
- ✓ Especie de relevancia ecológica dentro de su nivel trófico, y perteneciente a un nivel trófico relevante dentro del ecosistema
- ✓ Manifestación de efectos en el menor tiempo disponible
- ✓ Parámetros de expresión representativos y fácilmente mensurables y cuantificables

Se habla de ensayos de ecotoxicología acuática cuando se realizan respecto de cualquier matriz acuática de medio dulce (aguas naturales, vertidos urbanos e industriales, lixiviados, etc.) o de medio marino/salobre (aguas marinas, intermareales, emisarios submarinos, dragados marinos, etc.). Los organismos acuáticos utilizados en este tipo de ensayos de toxicología, se hallan inmersos en un medio donde la homogeneidad y rápida biodisponibilidad de los contaminantes se traduce en una exposición continuada a través de la ingestión y contacto dérmico, pudiendo absorber e ingerir cantidades significativas de tóxicos, sin que puedan diferenciarse la aportación específica de cada una de estas vías.

### 1.5.1. Bioensayos con *Daphnia magna*

*Daphnia magna* (Figura 2) es un pequeño crustáceo cuya longitud máxima es de 6 mm (sin contar la espina caudal), su coloración es variable ya que el déficit de oxígeno disuelto y la salinidad, de forma conjunta o aislada, provocan una coloración anaranjada o parda (Alonso, 1996).



**Figura 2.** Hembra de *Daphnia magna*

Los dáfnidos son hembras partenogenéticas; producen huevos diploides los cuales eclosionan dando hembras partenogenéticas durante muchas generaciones. El desarrollo es directo y cuando los juveniles abandonan la cámara de incubación, situada bajo el caparazón, el exoesqueleto se desprende, se produce la muda y una nueva puesta es expulsada dentro de la cámara incubadora. Ciertos factores como la temperatura del agua o un descenso en la disponibilidad de alimento (generalmente debida a un aumento de la población), inducen la aparición de machos y así se producen huevos fecundados. Las paredes de la cámara incubadora, ahora, se transforman en una cápsula protectora en forma de estribo llamada ehipium o ehipia.

Toleran un amplio rango de condiciones ambientales, prefiriendo aguas de pequeño volumen (charcas, zanjas inundadas, etc.) de escasa turbidez y expuestas a radiación solar, aunque también pueden habitar en la zona litoral o formar parte del zooplancton de embalses pequeños y mineralizados. Por sus características, muchos autores la recomiendan como especie bioindicadora, siendo utilizada para evaluar los riesgos ambientales producidos por vertidos industriales y urbanos, plaguicidas, metales pesados, miméticos de hormonas sexuales, etc.

### **1.5.2. Bioensayos con levaduras**

Los bioensayos con levaduras tratan de identificar compuestos tóxicos en muestras ambientales con rapidez, debido al alto coste de los métodos químicos analíticos y, en algunos casos, la baja sensibilidad y efectividad. Sin embargo, muchos de los bioensayos clásicos siguen siendo muy laboriosos (Fai y Grant, 2009). Durante muchos años se utilizaron animales en los test de toxicidad, sin embargo, existe la necesidad de desarrollar y validar ensayos más sencillos y rápidos, de manera que se reduzca la utilización de animales.

Los hongos juegan un papel muy importante en los ecosistemas, donde las levaduras son agentes importantes en la biodegradación y el reciclaje de la materia orgánica. La alta conservación de los mecanismos metabólicos y reguladores en eucariotas ha contribuido a la utilización de las levaduras como sistema para estudios biológicos (Sherman, 2002). De este modo, el uso de levaduras para bioensayos ha aumentado recientemente dada su sencillez, facilidad de mantenimiento y cultivo, rapidez, bajo coste, bajos volúmenes requeridos de muestra, reproducibilidad y posibilidad de ser miniaturizado (Papaefthimiou *et al.*, 2004; Bitton, 1999; Blaise, 1998).

Las levaduras han sido utilizadas de una forma satisfactoria para evaluar la toxicidad de compuestos químicos, tales como los fungicidas y herbicidas que intervienen directamente en las funciones de las levaduras como la respiración, la biosíntesis de esteroides o la división celular (Leroux, 2003).

El resazurín se trata de un colorante no tóxico que es reducido intracelularmente a un compuesto fluorescente, el resorufín, por enzimas de la cadena de transporte de electrones. Por ello, ha sido utilizado para examinar la viabilidad de microorganismos desde un punto de vista no destructivo (Fai y Grant, 2009). La inhibición de la reducción del resazurín es indicativo de una discapacidad del metabolismo celular (Dayeh *et al.*, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

---

Numerosos autores han descrito como, en los últimos años, debido al desarrollo económico y social, el agua ha sufrido un alarmante deterioro. El vertido de sustancias procedentes de la agricultura, la industria, hospitales, residuos urbanos, etc. ha provocado la alteración de la calidad del agua, convirtiendo las aguas residuales en la principal vía de entrada al medio ambiente de los contaminantes que no han sido degradados durante el tratamiento de las mismas (Jurado *et al.*, 2012).

Uno de los principales interrogantes que se plantea es la eficacia de los tratamientos de depuración en la eliminación o disminución de la carga contaminante, siendo necesario evaluar el grado de toxicidad de las aguas. Por ello, en este Trabajo Fin de Grado se pretende evaluar la eficacia de los tratamientos de estaciones depuradoras de aguas residuales, a través de bioensayos de toxicidad, siendo éste el principal objetivo.

Concretamente, los objetivos propuestos para el presente trabajo fueron:

1. Seleccionar diferentes EDARs de la Comunidad Valenciana
2. Seleccionar los bioensayos de toxicidad a realizar:
  - a. Ensayo de toxicidad aguda o de inmovilización con *Daphnia magna*
  - b. Ensayo de toxicidad crónica sobre *Daphnia magna*.
  - c. Ensayo miniaturizado de viabilidad celular con levaduras
3. Evaluar desde el punto de vista toxicológico la eficacia del tratamiento depuración, comparando el grado de toxicidad antes y después de la depuración.

#### **Plan de Trabajo:**

1. Búsqueda bibliográfica relacionada con EDARs de la Comunidad Valenciana y ensayos de toxicidad aguda y crónica.
2. Recogida de las muestras de agua de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales seleccionadas.
4. Realización de los ensayos preliminares y del ensayo definitivo: ensayo agudo de inmovilización de *D. magna* según la normativa ISO 6341:2012.
3. Realización de los ensayos preliminares y del ensayo definitivo: ensayo crónico de reproducción de *D. magna* según la normativa OECD 211. Análisis de los efectos subletales (comportamiento, respuesta a estímulos, fertilidad, fecundidad...).
5. Realización del ensayo de viabilidad celular con tres especies de levaduras según el estudio de Papaefthimiou *et al.* (2004). Análisis de la viabilidad celular mediante el colorante resazurín.
6. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante los programas Statgraphics Plus v. 5.1 y SPSS v. 16.0.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

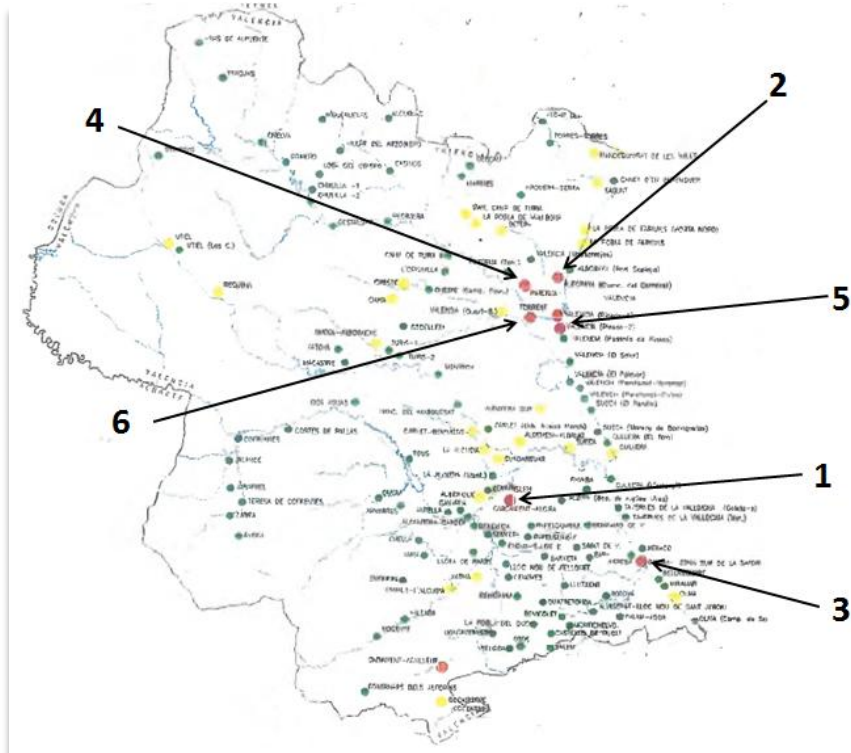
---

A continuación, se describen los materiales utilizados, así como la metodología empleada para la realización del presente trabajo de investigación. Todos los trabajos de experimentación que forman parte del estudio se han realizado en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Natural (ETSIAMN) de la Universidad Politécnica de Valencia.

### 3.1. Origen de las muestras

Para los ensayos de toxicidad, se han utilizado muestras procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) de la Provincia de Valencia de mayor población servida. Cada una de las estaciones depuradoras de aguas residuales tiene unas características, que quedan reflejadas en la Tabla 3:

- EDAR de Carcaixent (la Ribera Alta): abarca su servicio a las poblaciones de Alzira, Carcaixent, la Poble Llarga y Villanueva de Castellón.
- EDAR de la Cuenca del Carraixet (l’Horta Nord): proporciona servicio a los municipios de Albalat dels Sorells, Alboraya, Alfara del Patriarca, Almàssera, Bonrepòs i Mirambell, Foios, Godella, Meliana, Moncada, Rocafort, Tavernes Blanques, Valencia y Vinalesa.
- EDAR de Gandia (la Safor): da servicio a los municipios de Almoines, Bellreguard, Beniarjó, Beniflá, Benirredrà, Daimús, Gandia, Guardamar de la Safor, la Font d'En Carròs, L'Alqueria de la Comtessa, Miramar, Palmera, Piles, Potríes, Rafelcofer, Real de Gandía y Villalonga.
- EDAR de Paterna (l’Horta Oest): da servicio de los municipios de Paterna y san Antonio de Benagéber.
- EDAR de Pinedo: proporciona servicio a las poblaciones de Albal, Alcàsser, Alfafar, Benetússer, Beniparrell, Burjassot, Catarroja, Llocnou de la Corona, Massanassa, Mislata, Paiporta, Paterna, Picanya, Picassent, Sedaví, Silla y Valencia.
- La EDAR de Torrent (l’Horta Oest) abastece a la ciudad de Torrent.



**Figura 3.** Localización EDARs estudiadas, Provincia de Valencia.

(1:Carcaixent; 2:Carraixet; 3:Gandia; 4:Paterna; 5:Pinedo; 6:Torrent)





### 3.1.1. Obtención de las muestras

Como ya se ha mencionado, los ensayos de toxicidad se han llevado a cabo sobre muestras procedentes de diferentes estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs):

1. **EDAR Carcaixent:** dos muestras fueron proporcionadas. La primera muestra está constituida por las aguas residuales de entrada a la planta de tratamiento, procedentes de los distintos municipios previamente nombrados, tanto urbanas como industriales (Carcaixent E). La segunda muestra fue tomada de las aguas de salida tras el tratamiento secundario (Carcaixent SS).
2. **EDAR la Cuenca del Carraixet:** dos muestras fueron proporcionadas. La primera muestra está constituida por las aguas residuales de entrada a la planta de tratamiento, procedentes de los distintos municipios previamente nombrados, tanto urbanas como industriales (Carraixet E). La segunda muestra fue tomada de las aguas de salida tras el tratamiento secundario (Carraixet SS).
3. **EDAR Gandia:** dos muestras fueron proporcionadas. La primera muestra está constituida por las aguas residuales de entrada a la planta de tratamiento procedentes de los distintos municipios previamente nombrados, tanto urbanas como industriales (Gandia E). La segunda muestra fue tomada de las aguas de salida tras el tratamiento secundario (Gandia SS).
4. **EDAR Paterna:** tres muestras fueron proporcionadas. Las dos primeras muestras están constituidas por las aguas residuales de entrada a la planta de tratamiento, procedentes de los distintos municipios previamente nombrados, una de procedencia urbana (Paterna Urb) y la otra de procedencia industrial (Paterna Ind). La tercera muestra fue tomada de las aguas de salida tras el tratamiento secundario (Paterna SS).
5. **EDAR Pinedo:** dos muestras fueron proporcionadas. La primera muestra está constituida por las aguas residuales de entrada a la planta de tratamiento, procedentes de los distintos municipios previamente nombrados, tanto urbanas como industriales (Pinedo E). La segunda muestra fue tomada de las aguas de salida tras el tratamiento secundario (Pinedo SS).
6. **EDAR Torrent:** dos muestras fueron proporcionadas. La primera muestra está constituida por las aguas residuales de entrada a la planta de tratamiento, procedentes de los distintos municipios previamente nombrados, tanto urbanas como industriales (Torrent E). La segunda muestra fue tomada de las aguas de salida tras el tratamiento secundario (Torrent SS).

Las muestras utilizadas en los ensayos de toxicidad aguda y toxicidad crónica con *D. magna* y las muestras para el ensayo de toxicidad con levaduras fueron tomadas en enero de 2016. Todas las muestras fueron refrigeradas hasta su posterior análisis.

## 3.2. Ensayos de toxicidad con *Daphnia magna*

### 3.2.1. Organismo de ensayo

*Daphnia magna* ha sido utilizada desde hace tiempo como una especie estándar en ensayos de ecotoxicidad por organizaciones como la CE, OECD e ISO. El hecho de que *Daphnia* sea utilizada como organismo estándar se debe a los siguientes factores: su reproducción es partenogénica, es fácilmente cultivable en condiciones de laboratorio, es uno de los principales consumidores de los productores primarios y lo más importante, es el alimento de invertebrados y vertebrados predadores (Larsson *et al.*, 1993; Hebert, 1978), es una especie cosmopolita y presenta una sensibilidad alta a los contaminantes.

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, según directiva 84/449 de la CE.

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, cuya composición 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  $\text{NaHCO}_3$  y 0,23 g/L de KCl.

A continuación, las efipias se incuban a 22° C bajo iluminación constante (3.000-4.000 lux, 3-4 tubos fluorescentes de 8 W a 20-25 cm de distancia) en la cámara climatizada modelo LMS (Figura 5). 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  $250 \pm 25$  mg/L (expresados en  $\text{CaCO}_3$ ), concentración de oxígeno disuelto superior a 7 mg/L, y temperatura de  $22 \pm 1$  °C.

El microcrustáceo *D. magna* ha sido suministrado por la empresa ECOtest S.L. (Valencia).

### 3.2.2. Ensayo de toxicidad aguda

#### 3.2.2.1 Metodología utilizada en el ensayo

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-EN-ISO 6341. Las diluciones ensayadas para las muestras han sido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64.

Las placas utilizadas en los ensayos de toxicidad aguda son placas transparentes, de fondo plano y de 12 pocillos (Corning Inc.; Figura 4). 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 con el objetivo de 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 dafnias 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. Para cada dilución se realizan cuatro réplicas. Los ensayos se llevan a cabo en oscuridad, a una temperatura constante de  $21 \pm 1$  °C. Los organismos no se alimentan durante el ensayo.



**Figura 4.** Microplacas de 12 pocillos usadas para el ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (Corning Inc).

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.

### 3.2.2.2. Procesamiento de los resultados

Los resultados se expresan como porcentajes de inmovilización, y cuando ha sido posible, se han utilizado para calcular los valores MID (factor de dilución requerido para producir un 50% de efecto) de las muestras. Este parámetro se ha calculado mediante análisis Probit, utilizando el programa estadístico SPSS (versión 16.0).

Además, los porcentajes de inhibición de la movilidad también 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 LID (mínima dilución sin efecto) de las muestras. Estos análisis se han realizado con el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

### 3.2.3. Ensayo de toxicidad crónica

#### 3.2.3.1. Metodología utilizada en el ensayo

La evaluación de la toxicidad crónica de las muestras de agua sobre el microcrustáceo *D. magna* se ha llevado a cabo de acuerdo a la normativa OCDE 211, 2012. El objetivo del ensayo es determinar los efectos sobre la supervivencia y reproducción del organismo expuesto a una dilución subletal, que en este caso ha sido la dilución 1:4, durante un periodo de 21 días.

El ensayo crónico se realiza en recipientes de vidrio de 100 mL de capacidad; se preparan 10 réplicas por muestra y cada recipiente se llena con 50 mL de muestra. Además, se preparan 10 réplicas control, con 50 mL de medio de reconstitución.

El ensayo se lleva a cabo en cámara climatizada, a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, la luz se ajusta a un ciclo de luz: oscuridad de 16:8h (OCDE 211, 2012) y una intensidad lumínica de 800 lux. Cada 48h los organismos se alimentan añadiendo a cada recipiente de ensayo 600 µL de un cultivo de algas verdes ( $1,5 \times 10^6$  células/mL). El crecimiento, la reproducción y la supervivencia de invertebrados en el laboratorio pueden sufrir variaciones en función de distintos factores ambientales. Por ello, es importante controlar estos factores con el fin de que no interfieran en los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad (Buikema *et al.*, 1980).

A lo largo del ensayo, el medio de cultivo es renovado dos veces por semana (ensayo semi-estático), utilizando agua de reconstitución y aireada hasta alcanzar un nivel de saturación de oxígeno adecuado. El recuento de crías, en cada recipiente, se realiza al mismo tiempo que se renueva el medio de cultivo. La transferencia de los individuos adultos de un recipiente a otro se debe llevar a cabo con precaución evitando, en la medida de lo posible, el estrés mecánico, utilizando una pipeta de plástico con un orificio adecuado para evitar dañar a los organismos. Para el recuento de crías se emplea papel de filtro, embudo y vaso de precipitados. Una vez filtrada el agua, las crías retenidas sobre el papel de filtro pueden ser contadas con facilidad.

#### 3.2.3.2. Procesamiento de los resultados

Al finalizar el ensayo se determina la mortalidad y la capacidad reproductora. Para determinar esta última se tiene en cuenta el número de neonatos totales/muestra a lo largo de los 21 días de ensayo, así como el tiempo que tardan en realizar las puestas. Los datos obtenidos se analizan mediante ANOVA para determinar diferencias significativas entre las diferentes muestras, mediante el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

### 3.3. Ensayos de toxicidad con levaduras

#### 3.3.1. Organismos de ensayo

Las levaduras utilizadas para la realización del bioensayo son *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp y *Hanseniaspora* sp de fácil cultivo y rápido crecimiento.

*Saccharomyces cerevisiae* es probablemente la levadura más conocida y muy utilizada en una gran variedad de aplicaciones. Pertenece al grupo de los ascomicetos, siendo unicelular y teniendo una morfología y reproducción similar a la *Hanseniaspora*. Se encuentra en la naturaleza asociada al ser humano y fue la primera levadura en obtenerse su genoma entero secuenciado.

*Hanseniaspora* también pertenece al grupo de los ascomicetos. Se reproducen por gemación y tienen una morfología mayormente esferoidal y apiculada. Realiza la fermentación de la glucosa y puede ser encontrada en frutos, principalmente en la uva. Sin embargo, también se puede encontrar en el suelo, en el agua dulce o salada, en moluscos e incluso en mamíferos. (Kurtzman *et al.*, 1998).

Por su parte, *Rhodotorula* es una levadura pigmentosa que pertenece al grupo de los basidiomicetos. Tienen un crecimiento fácil en una gran variedad de medios y se caracterizan, al igual que las otras dos levaduras, por una gran velocidad de crecimiento. Puede ser encontrada en una gran variedad de fuentes incluyendo el aire, suelo, plantas, agua salada y productos de uso cotidiano (Ahearn *et al.*, 1962)

Las cepas han sido proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

### 3.3.2. Preparación y extracción de las muestras de agua

Las muestras de agua fueron concentradas en un sistema de vacío (Extra Vac 12, Scharlab) (Figura 5) 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 por el paso de 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 -20 °C hasta su ensayo.



**Figura 5.** Sistema de extracción a vacío Extra Vac 12 (Scharlab) para cartuchos de SPE.

### 3.3.3. Equipos utilizados

El lector de microplacas multifuncional TECAN Infinite M200 (Figura 6) se ha utilizado para inyectar las microplacas y para medir la fluorescencia en los ensayos de toxicidad las levaduras. Este lector multifuncional está equipado con tres detectores de alta resolución para las medidas de fluorescencia, luminiscencia y absorbancia y un módulo inyector que consiste

en dos bombas de jeringa (XE-1000, Tecan Systems). El lector posee además el software i-Control que permite el manejo de los datos de fluorescencia obtenidos.

Todos los ensayos de toxicidad (incluidos los de toxicidad aguda y crónica de *Daphnia*) se han realizado en la cámara climatizada modelo LMS (Figura 7). Esta cámara presenta un amplio rango de aplicaciones que requieren temperaturas entre 10 °C y 30 °C, con una humedad relativa entre 5 y 85%, sin condensación. De esta forma, los ensayos de toxicidad se han podido realizar bajo las condiciones apropiadas de luz y temperatura, para cada organismo de ensayo, manteniéndose constantes para luego poder sacar resultados representativos.



**Figura 6.** Lector de microplacas TECAN Infinite M200.



**Figura 7.** Cámara climatizada modelo LMS.

### 3.3.4. Metodología utilizada en el ensayo

#### Preparación medios de cultivo

**Medio enriquecido YPD:** se disuelven 50 g de YPD (Yeast Peptone Dextrose, Difco) en 1L de agua MiliQ. Se reparte en tubos de ensayo a razón de 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 SD (Synthetic Dextrose):** se pesan 1,7 g de YNBAA/AS (Yeast Nitrogen Base) (Difco) y 5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Panreac) y se disuelven en un litro de agua MilliQ. El medio así preparado se esteriliza en autoclave (120 °C, 20 min). Si no se va a usar inmediatamente puede ser conservado a temperatura de refrigeración. Se reparte en matraces Erlenmeyer a razón de 50 mL.

#### Cultivo de las levaduras

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. Para iniciar el ensayo se siembran tubos de YPD y se incuban a 30 °C en agitación suave durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo se toma el volumen adecuado del cultivo en YPD para inocular un matraz Erlenmeyer

con 50 mL de medio SD, de manera que tras la incubación (30 °C, agitación orbital a 150 rpm, 24 h) se obtenga una DO de 0,6; el cultivo está listo para hacer el ensayo.

### **Llenado de las placas multipocillo**

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

- Columnas 1-9: muestra de agua concentrada + cultivo de levadura.
- Columnas 10-11: cultivo de levadura a modo de control.
- Columna 12: medio de cultivo a modo de control.

Así pues, la placa se carga del siguiente modo:

1. Se carga la columna 1 con 10 µL la muestra disuelta en metanol.
2. Cargar las columnas 2 a 11 con 200 µL de cultivo de levadura.
3. Dejar que se evapore el metanol de la columna 1 y añadir a cada pocillo 2 µL de etanol. Antes de que se evapore añadir 100 µL del cultivo de la levadura.
4. Se mezcla mediante pipeteo el contenido de la columna 1 y se pasan 100 µL de la columna 1 a la columna 2.

Se repite el paso 4, hasta la columna 9, donde se retirarán 100 µL para dejar un volumen igual en todos y cada uno de los pocillos.

5. Cargar la columna 12 únicamente con medio de cultivo sin inocular.

El mismo proceso se realizará con cada una de las tres levaduras.

### **Incubación y centrifugación de las placas**

Una vez cargadas las placas se incuban durante 30 minutos a 28°C. Transcurridos los 30 minutos, las placas serán centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos.

Una vez ya han sido centrifugadas, y las células hayan quedado bien adheridas al fondo de los pocillos, se vaciará la placa con un golpe seco.

### **Adición del resazurín e incubación de las placas**

A continuación, se añaden 100 µL de resazurín 12,5 µM a cada uno de los pocillos y se incuba la placa a 28 °C durante 45 minutos, o hasta que aparezca el color rosáceo en los pocillos.

### **Lectura de los datos**

Finalmente, la fluorescencia de los pocillos será leída por el lector de microplacas multifuncional TECAN Infinite M200 con una longitud de onda de excitación y de emisión de 563 nm y 587 nm, respectivamente.

### **3.3.5. Procesamiento de los resultados**

Los porcentajes de viabilidad de las células 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 LID (mínima dilución sin efecto) de las muestras. Estos análisis se han realizado con el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

Además, cuando ha sido posible, se han calculado los valores MID (factor de dilución requerido para producir un 50% de efecto) de las muestras contaminadas. Este parámetro se ha calculado mediante análisis Probit, utilizando el programa estadístico SPSS (versión 16.0).

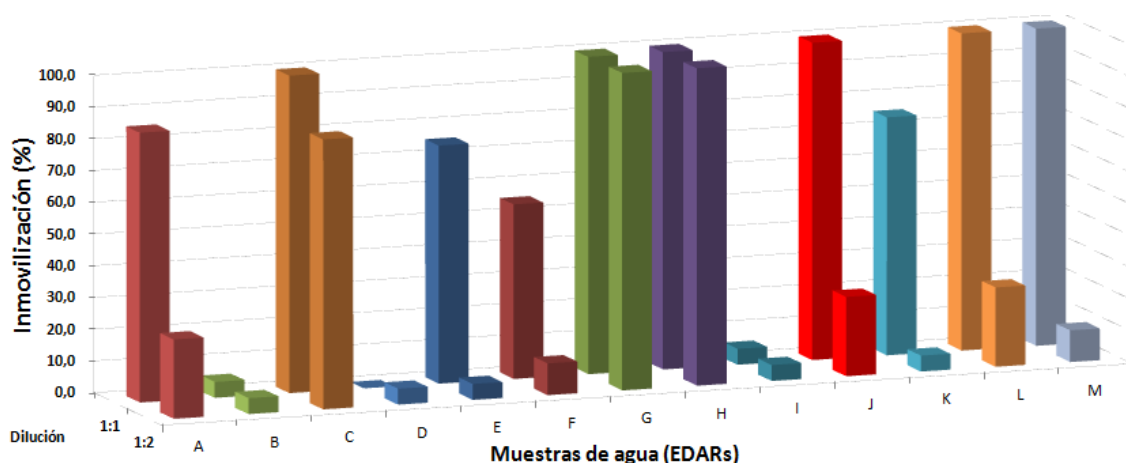
## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

#### 4. 1. Ensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

##### 4.1.1. Ensayo de inmovilización a las 24 horas

En la Figura 8 se presentan los valores medios de los datos obtenidos a las 24 horas en el ensayo de toxicidad aguda, expresados como porcentajes de inhibición de la movilidad del microcrustáceo, para los niveles de dilución 1:1 y 1:2. Destaca el mayor efecto sobre la movilidad del microcrustáceo de las muestras recogidas a la entrada de las EDARs y a la salida del tratamiento secundario de Pinedo y Torrent, para el nivel de dilución 1:1. En esta figura, se puede hacer una primera valoración de la toxicidad de las muestras, destacando aquellas en las cuales el porcentaje de inmovilización es alto y tras disminuir la concentración a la mitad, sigue teniendo un elevado efecto sobre la movilidad; este es el caso de las muestras de entrada a la EDAR de Paterna (Paterna Urb y Paterna Ind) y de la muestra de entrada a la EDAR de Carraixet.



**Figura 8.** Porcentaje medio de inmovilización de *D. magna* de las muestras de agua para las diluciones 1:1 y 1:2, a las 24 horas de ensayo. (A: Carcaixent E; B: Carcaixent SS; C: Carraixet E; D: Carraixet SS; E: Gandia E; F: Gandia SS; G: Paterna Ind; H: Paterna Urb; I: Paterna SS; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS).

En la Tabla 4 se presentan los valores medios de los datos obtenidos a las 24 horas en el ensayo de toxicidad aguda, expresados como porcentajes de inhibición de la movilidad del microcrustáceo, para cada nivel de dilución de las distintas muestras de agua. También se presentan los valores RSD (Desviación Estándar Relativa), para expresar la variabilidad entre las diferentes réplicas.

El análisis ANOVA de la variable dependiente % de inhibición de la movilidad con respecto al factor dilución reflejado en la Tabla 4, muestra que existen diferencias significativas en la respuesta del microcrustáceo ( $p < 0,05$ ). Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras se ha realizado, para cada muestra de agua, un Test de Rango Múltiple.

En general, se observa una disminución rápida del porcentaje de inmovilidad en las daphnias expuestas a las muestras de agua, a medida que aumenta la dilución, con una variación del porcentaje medio de inmovilidad entre el 0 y el 15%, para las diluciones 1:4-1:64. En cambio, para las muestras de entrada a la planta depuradora de Paterna (Ind y Urb), el porcentaje de inmovilidad disminuye lentamente, existiendo diferencias estadísticamente significativas para los niveles de dilución 1:8 a 1:64. Las muestras Carcaixent SS, Carraixet SS y Paterna SS no muestran diferencias significativas para todos los niveles de dilución estudiados.



**Tabla 4.** Porcentajes de inhibición de la movilidad de *D.magna* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua, a las 24 horas de ensayo.

Dil <sup>**</sup>	Inhibición de la movilidad (%)*												
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	URB	IND	SS	E	SS	E	SS
1:1	85,0±9,5 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>o</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	75,0±9,6 <sup>a</sup>	55,0±19,1 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	75,0±9,6 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>
1:2	25,0±5,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>o</sup>	85,0±9,6 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>b</sup>	10,0±5,8 <sup>b</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	25,0±5,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>b</sup>	85,0±9,6 <sup>b</sup>
1:4	5,0±5,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>o</sup>	10,0±5,8 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	95,0±5,0 <sup>a</sup>	95,0±5,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	10,0±5,8 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>
1:8	5,0±5,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>o</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	90,0±5,8 <sup>a</sup>	95,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>
1:16	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>o</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	60,0±8,2 <sup>b</sup>	65,0±5,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>
1:32	5,0±5,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>o</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	40,0±8,2 <sup>c</sup>	40,0±8,2 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>c</sup>
1:64	5,0±5,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>o</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	10,0±5,8 <sup>d</sup>	10,0±5,8 <sup>d</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>

\*: Media de cuatro réplicas ± RSD. Los superíndices en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*\*Dil: dilución).

Con el fin de calcular los valores LID (Tabla 5), a las 24 horas de ensayo, de las diferentes muestras procedentes de las EDARs, para *D. magna* se ha realizado un análisis ANOVA.

**Tabla 5.** Valores LID para *D. magna* de las muestras de agua, a las 24 horas de ensayo.

VALORES LID													
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	IND	URB	SS	E	SS	E	SS
<b>LID</b>	1:4	<1:1	1:4	<1:1	1:2	1:2	1:64	1:64	<1:1	1:4	1:2	1:8	1:2

Los valores LID revelan una disminución de la toxicidad de las muestras de agua recogidas a la salida del tratamiento secundario de las distintas EDARs, siendo las muestras de entrada de Paterna Ind y Paterna Urb las de mayor toxicidad. Estos resultados reflejan la efectividad del tratamiento secundario de las plantas depuradoras.

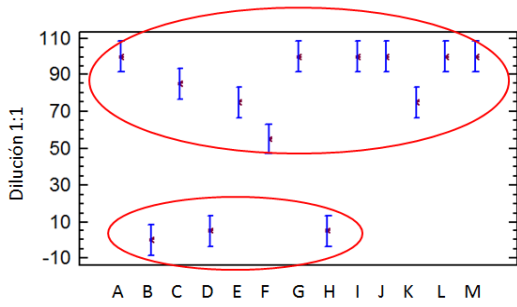
Se han calculado los valores MID (Tabla 6), con sus intervalos de confianza al 95%, mediante análisis Probit, para aquellas muestras con porcentajes de inhibición de la movilidad superiores al 50%. Destaca la toxicidad de las muestras Paterna Ind y Paterna Urb con un valor MID de 1:25.

**Tabla 6.** Valores MID para *D. magna* de las muestras de agua, a las 24 horas de ensayo.

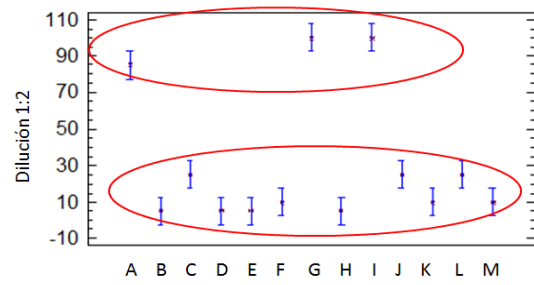
MUESTRA	VALORES MID
CARCAIXENT E	1:2 (1:2 - 1:1)
CARCAIXENT SS	-
CARRAIXET E	1:3 (1:4 - 1:2)
CARRAIXET SS	-
GANDÍA E	1:1 (1:2 - 1:1)
GANDÍA SS	1:1 (1:1 - 1:1)
PATERNA IND	1:25 (1:33 - 1:20)
PATERNA URB	1:25 (1:33 - 1:20)
PATERNA SS	-
PINEDO E	1:2 (1:4 - 1:1)
PINEDO SS	1:1 (1:2 - 1:1)
TORRENT E	1:2 (1:3 - 1:1)
TORRENT SS	1:2 (1:2 - 1:1)

Se ha realizado también un análisis ANOVA de la variable dependiente % de inhibición de la movilidad con respecto al factor muestra de agua, para cada nivel de dilución (Figuras 9-15). Dicho análisis indica diferencias estadísticamente significativas en la respuesta del microcrustáceo ( $p < 0,05$ ) expuesto a las diferentes muestras de agua.

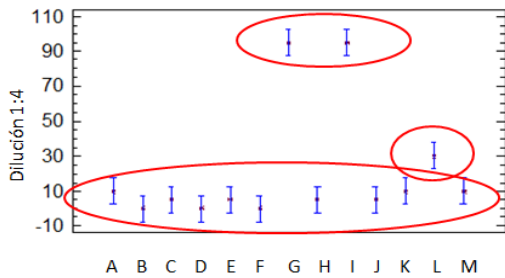
Los resultados indican un efecto significativamente mayor sobre la movilidad de *Daphnia* de las muestras Carraixet E, Carcaixent E, Gandia E, Gandia SS, Paterna Ind, Paterna Urb, Pinedo E, Pinedo SS, Torrent E y Torrent SS, para la dilución 1:1; para esta misma dilución, las muestras Carraixet SS, Carcaixent SS y Paterna SS no tienen efecto significativo sobre las daphnias (Figura 9). Para la dilución 1:2 (Figura 10), sólo las muestras Carraixet E, Paterna Ind y Paterna Urb siguen teniendo un efecto significativamente mayor, mientras que el resto ya no tiene efecto. Para las diluciones 1:4 a 1:32 (Figuras 11-14) se observa un grupo significativamente diferente formado por las muestras Paterna Urb y Paterna Ind. Para la dilución 1:64, no se observan diferencias significativas entre las muestras (Figura 15).



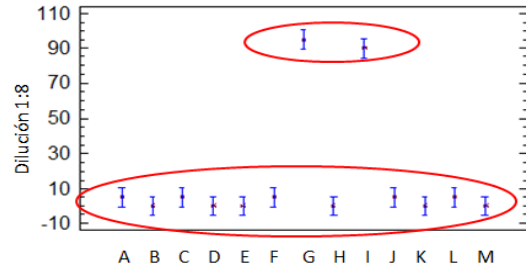
**Figura 9.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



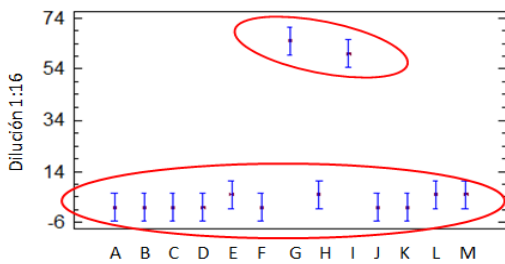
**Figura 10.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:2 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



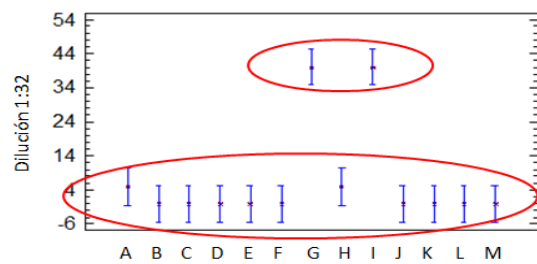
**Figura 11.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:4 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



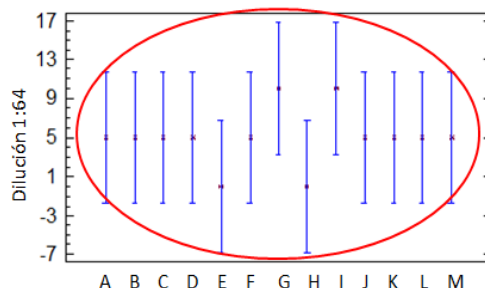
**Figura 12.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:8 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



**Figura 13.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



**Figura 14.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:32 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).

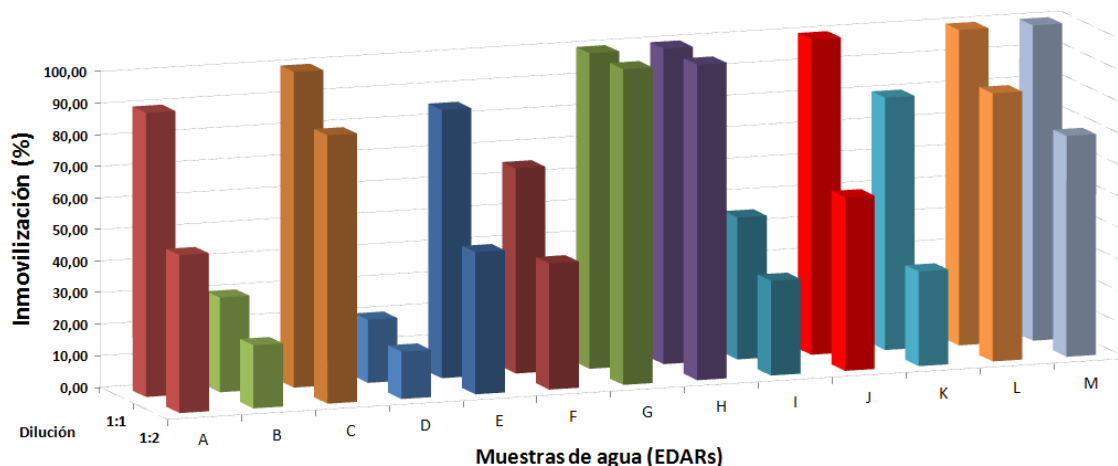


**Figura 15.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:64 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).

\*A: Carraixet; B: Carraixet SS; C: Carcaixent E; D: Carcaixent SS; E: Gandia E; F: Gandia SS; G: Paterna Ind; H: Paterna SS; I: Paterna Urb; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS.

#### 4.1.2 Ensayo de inmovilización a las 48 horas

En la Figura 16 se presentan los valores medios de los datos obtenidos a las 48 horas en el ensayo de toxicidad aguda, expresados como porcentajes de inhibición de la movilidad del microcrustáceo, para los niveles de dilución 1:1 y 1:2. Destaca el mayor efecto sobre la movilidad del microcrustáceo de las muestras de entrada a las EDARs y a la salida del tratamiento secundario de Pinedo y Torrent, para el nivel de dilución 1:1. En esta figura, se puede hacer una primera valoración de la toxicidad de las muestras, destacando aquellas en las cuales el porcentaje de inmovilización es alto y tras disminuir la concentración a la mitad, sigue teniendo un elevado efecto sobre la movilidad; este es el caso de las muestras de entrada a las EDARs de Paterna (Paterna Urb y Paterna Ind), Carraixet, Pinedo y Torrent y de la muestra de salida de Torrent. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a las 24 horas, aunque a las 48 horas el efecto sobre la movilidad de *D.magna* es mayor al aumentar el tiempo de contacto del microcrustáceo con la muestra.



**Figura 16.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad de *D. magna* de las muestras de agua para las diluciones 1:1 y 1:2, a las 48 horas de ensayo. (A: Carraixent E; B: Carraixent SS; C: Carraixet E; D: Carraixet SS; E: Gandia E; F: Gandia SS; G: Paterna Ind; H: Paterna Urb; I: Paterna SS; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS).

En la Tabla 7 se presentan los valores medios de los datos obtenidos a las 48 horas en el ensayo de toxicidad aguda, expresados como porcentajes de inhibición de la movilidad del microcrustáceo, para cada nivel de dilución de las distintas muestras de agua. También se presentan los valores RSD (Desviación Estándar Relativa), para expresar la variabilidad entre las diferentes réplicas.

El análisis ANOVA de la variable dependiente *% de inhibición de la movilidad* con respecto al factor *dilución* reflejado en la Tabla 7, muestra que existen diferencias significativas en la respuesta del microcrustáceo ( $p < 0,05$ ). Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras se ha realizado, para cada muestra de agua, un Test de Rango Múltiple.

En general, se observa una disminución del porcentaje de inmovilidad en las daphnias expuestas a las muestras de agua, a medida que aumenta la dilución, si bien esta disminución es más gradual a las 48 que a las 24 horas. Las diluciones 1:8 a 1:64 de las muestras recogidas a la salida del tratamiento secundario de las EDARs no tienen efecto sobre la movilidad de las daphnias. En cambio, las muestras de entrada a la planta depuradora de Paterna (Ind y Urb), tienen un efecto significativo; serían necesarias más diluciones para reducir totalmente dicho efecto.

**Tabla 7.** Porcentajes de inhibición de la movilidad de *D.magna* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua, a las 48 horas de ensayo.

Inhibición de la movilidad (%)*													
Dil**	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	IND	URB	SS	E	SS	E	SS
1:1	90,0±10,0 <sup>c</sup>	30,0±5,7 <sup>c</sup>	100,0±0,0 <sup>c</sup>	20,0±8,1 <sup>a</sup>	85,0±9,5 <sup>d</sup>	65,0±9,5 <sup>c</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	45,00±5,0 <sup>d</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	80,0±8,1 <sup>d</sup>	100,0±0,0 <sup>b</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>
1:2	50,0±12,9 <sup>b</sup>	20,0±8,1 <sup>bc</sup>	90,0±10,0 <sup>c</sup>	15,0±9,5 <sup>a</sup>	45,0±5,0 <sup>c</sup>	40,0±14,1 <sup>b</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	30,00±5,7 <sup>cd</sup>	55,0±5,7 <sup>c</sup>	30,0±5,7 <sup>c</sup>	85,0±9,5 <sup>b</sup>	70,0±5,7 <sup>c</sup>
1:4	20,0±8,1 <sup>a</sup>	20,0±8,1 <sup>bc</sup>	35,0±15,0 <sup>b</sup>	20,0±8,1 <sup>a</sup>	20,0±8,1 <sup>b</sup>	15,0±9,5 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	25,00±9,5 <sup>bc</sup>	30,0±12,9 <sup>b</sup>	20,0±8,1 <sup>bc</sup>	15,0±9,5 <sup>a</sup>	15,0±9,5 <sup>b</sup>
1:8	20,0±8,1 <sup>a</sup>	10,0±5,7 <sup>ab</sup>	20,0±8,1 <sup>ab</sup>	15,0±9,5 <sup>a</sup>	15,0±9,5 <sup>ab</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>d</sup>	95,00±5,0 <sup>cd</sup>	10,0±5,7 <sup>ab</sup>	20,0±8,1 <sup>ab</sup>	10,0±5,7 <sup>ab</sup>	10,0±5,7 <sup>a</sup>	10,0±5,7 <sup>ab</sup>
1:16	15,0±9,5 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>ab</sup>	15,0±9,5 <sup>ab</sup>	10,0±5,7 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>ab</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	85,00±5,0 <sup>c</sup>	85,00±5,0 <sup>c</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	10,0±5,7 <sup>ab</sup>	5,0±5,0 <sup>ab</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>ab</sup>
1:32	10,0±5,7 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	10,0±5,7 <sup>a</sup>	10,0±5,7 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>ab</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	60,00±8,1 <sup>b</sup>	55,00±5,0 <sup>b</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>ab</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>
1:64	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,00±0,0 <sup>a</sup>	40,00±8,1 <sup>a</sup>	35,00±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	5,0±5,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>

\*: Media de cuatro réplicas ± RSD. Los superíndices en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*\* : Dil: Dilución.

Con el fin de calcular los valores LID (Tabla 8), a las 48 horas de ensayo, de las diferentes muestras procedentes de las EDARs, para *D. magna* se ha realizado un análisis ANOVA.

**Tabla 8.** Valores LID para *D. magna* de las muestras de agua, a las 48 horas de ensayo.

VALORES LID													
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	URB	IND	SS	E	SS	E	SS
<b>LID</b>	1:4	1:2	1:8	<1:1	1:4	1:4	>1:64	>1:64	1:8	1:8	1:4	1:4	1:8

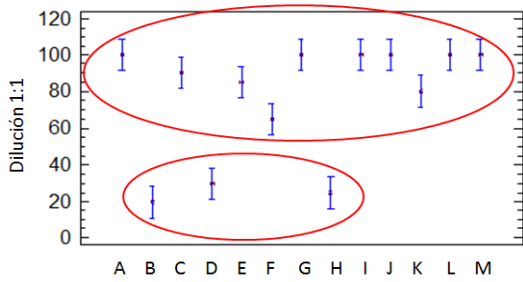
Los valores LID revelan una disminución de la toxicidad de las muestras de agua recogidas a la salida del tratamiento secundario de las distintas EDARs, siendo las muestras de entrada de Paterna Ind y Paterna Urb las de mayor toxicidad. Estos resultados reflejan la efectividad del tratamiento secundario de las plantas depuradoras, si bien a las 48 horas Torrent SS tuvo un valor LID mayor.

Se han calculado los valores MID (Tabla 9), con sus intervalos de confianza al 95%, mediante análisis Probit, para aquellas muestras con porcentajes de inhibición de la movilidad, superiores al 50%. Destaca la toxicidad de las muestras Paterna Ind y Paterna Urb con valores de 1:45 y 1:40, respectivamente. A las 48 horas, estas muestras son más tóxicas que a las 24 horas.

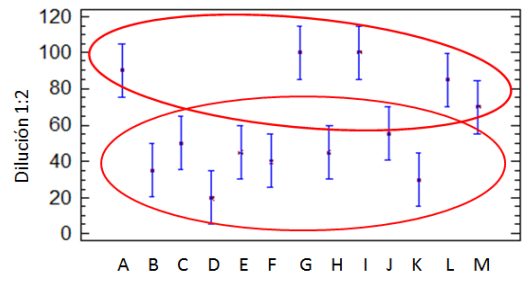
**Tabla 9.** Valores MID para *D. magna* de las muestras de agua, a las 48 horas de ensayo.

MUESTRA	VALORES MID
CARCAIXENT E	1:3 (1:4 – 1:1)
CARCAIXENT SS	–
CARRAIXET E	1:5 (1:7 – 1:3)
CARRAIXET SS	–
GANDÍA E	1:2 (1:3 – 1:1)
GANDÍA SS	1:1 (1:2 – 1:1)
PATERNA IND	1:45 (1:56 – 1:38)
PATERNA URB	1:40 (1:50 – 1:34)
PATERNA SS	–
PINEDO E	1:3 (1:4 – 1:2)
PINEDO SS	1:2 (1:3 – 1:1)
TORRENT E	1:3 (1:4 – 1:2)
TORRENT SS	1:3 (1:4 – 1:2)

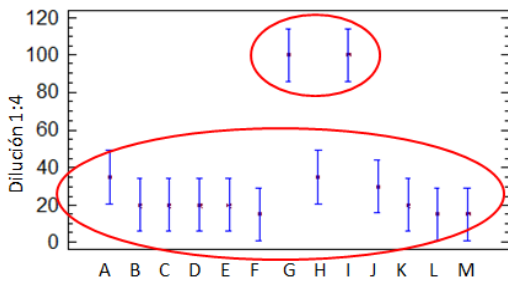
Se ha realizado también un análisis ANOVA de la variable dependiente % de inhibición de la movilidad con respecto al factor muestra de agua, para cada nivel de dilución (Figuras 17-23). Dicho análisis indica diferencias estadísticamente significativas en la respuesta del microcrustáceo ( $p < 0,05$ ) expuesto a las diferentes muestras de agua. De forma similar a lo que ocurre a las 24 horas, a las 48 horas los resultados indican un efecto significativamente menor de las muestras recogidas a la salida del tratamiento secundario de Carraixet SS, Carcaixent SS y Paterna SS, para la dilución 1:1 (Figura 17). Para la dilución 1:2 (Figura 18) disminuye el efecto sobre la movilidad de daphnia de las muestras que fueron más tóxicas para la dilución 1:1, excepto las muestras de Carraixet E, Paterna Ind y Paterna Urb con un efecto significativamente mayor. Para las diluciones 1:4 a 1:64 se observa un grupo significativamente diferente formado por las muestras Paterna Urb y Paterna Ind (Figuras 19-23).



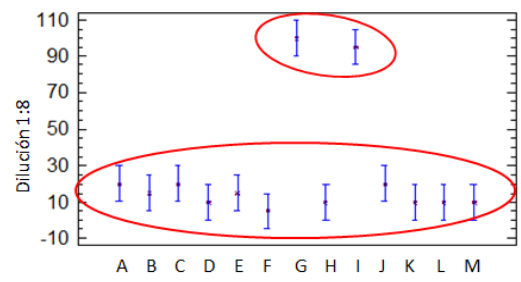
**Figura 17.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



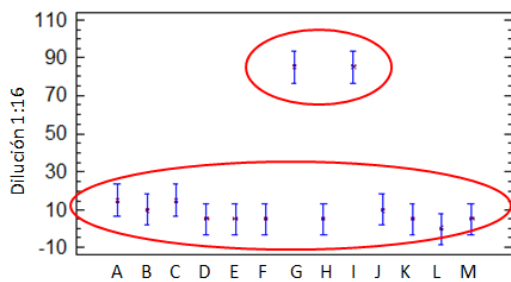
**Figura 18.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:2 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



**Figura 19.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:4 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



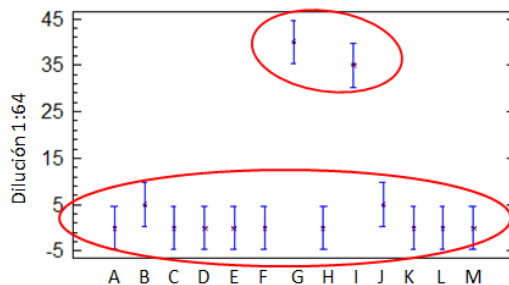
**Figura 20.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:8 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



**Figura 21.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



**Figura 22.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:32 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).



**Figura 23.** Media de los porcentajes de inhibición de la movilidad para la dilución 1:64 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD).

\*A: Carraixet; B: Carraixet SS; C: Carcaixent E; D: Carcaixent SS; E: Gandia E; F: Gandia SS; G: Paterna Ind; H: Paterna SS; I: Paterna Urb; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS.

## 4.2. Ensayo de toxicidad crónica con *Daphnia magna*

El ensayo de toxicidad crónica se ha realizado con la dilución 1:4 de las muestras. Esta dilución se ha seleccionado en base a los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda, ya que no produjo un efecto significativo (dilución subletal) sobre la movilidad de *D. magna* en la mayoría de las muestras. A lo largo del ensayo se analizan diversos parámetros que nos ayudan a identificar el efecto tóxico, a largo plazo, de las muestras de agua. Los siguientes apartados recogen las observaciones y resultados según los distintos parámetros estudiados.

### 4.2.1. Mortalidad

La mortalidad registrada durante el ensayo oscila entre el 0% y el 20%. Por lo tanto, el ensayo se considera válido ya que el porcentaje de mortalidad observado en los recipientes control ha sido  $\leq 20\%$  (OCDE 211, 2012). Las muestras que han llegado a una mortalidad del 20% han sido las muestras tomadas en las EDARs de Gandía y Carcaixent.

### 4.2.2. Reproducción

El efecto tóxico sobre la reproducción de las daphnias se ha evaluado mediante el análisis de la fecundidad de las hembras, registrando los tiempos de las puestas y el número de neonatos por hembra. Si en cualquier réplica el parental muere durante el ensayo o resulta ser macho, entonces la repetición se excluye del análisis (OCDE 211, 2012).

La Tabla 10 muestra el número medio total de crías/muestra, a los 21 días de ensayo. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, se ha realizado un Test de Rango Múltiple. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en el número de crías/muestra entre el control y las muestras recogidas a la salida del tratamiento secundario de las EDARs, excepto para Torrent SS con unos resultados similares a Torrent E.

**Tabla 10.** Número medio de crías acumuladas/muestra, al finalizar el ensayo (día 21).

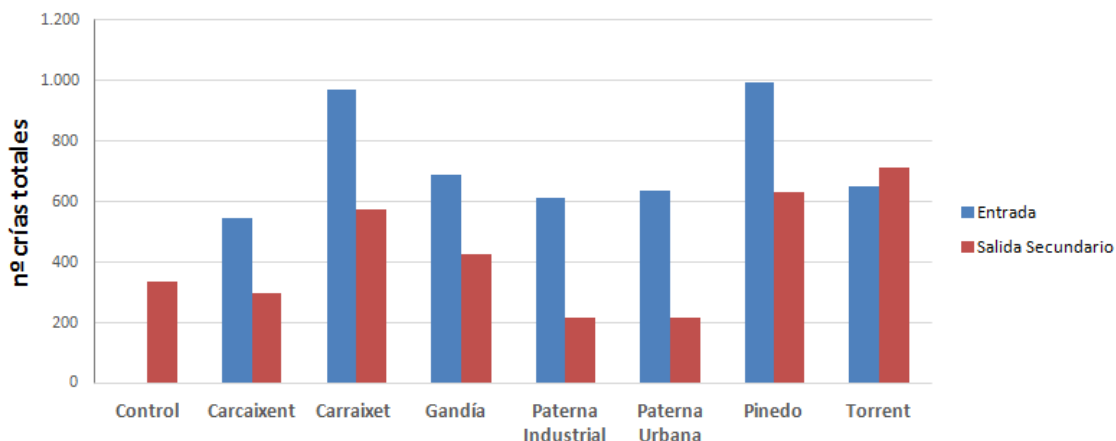
MUESTRA	*Nº medio de crías/hembra (día 21)
CONTROL	34,5 ± 5,8 <sup>ab</sup>
CARCAIXENT E	54,4 ± 6,7 <sup>abc</sup>
CARCAIXENT SS	32,9 ± 7,2 <sup>a</sup>
CARRAIXET E	107,7 ± 20,2 <sup>e</sup>
CARRAIXET SS	57,7 ± 8,2 <sup>abc</sup>
GANDÍA E	98,3 ± 32,4 <sup>ce</sup>
GANDÍA SS	47,5 ± 5,1 <sup>abc</sup>
PATERNA IND	68,2 ± 20,1 <sup>bcd</sup>
PATERNA URB	70,5 ± 16,8 <sup>bcd</sup>
PATERNA SS	31,1 ± 4,6 <sup>a</sup>
PINEDO E	110,6 ± 33,7 <sup>e</sup>
PINEDO SS	70,0 ± 14,0 <sup>bcd</sup>
TORRENT E	72,2 ± 16,1 <sup>cd</sup>
TORRENT SS	71,3 ± 5,3 <sup>cd</sup>

\*: media de diez réplicas ± RSD (Desviación Estándar Relativa).

Los superíndices en la columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



En la figura 24 se representa el número total de crías obtenidas en cada una de las muestras de agua. En general, se observa un mayor número de crías/hembra en las muestras recogidas a la entrada de las EDARs que en las muestras recogidas a la salida del tratamiento secundario. Además, el número de crías acumuladas por hembra es mayor en todas las muestras estudiadas que en el control, excepto las muestras de Paterna SS y Carcaixent SS.



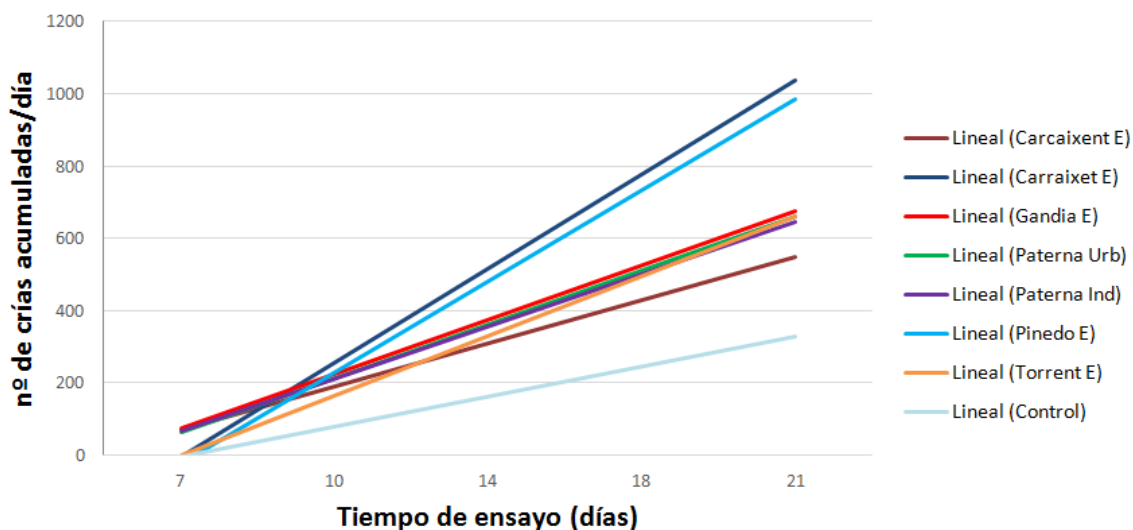
**Figura 24.** Número total de crías/muestra de *D. magna*, a los 21 días de ensayo.

En la Tabla 11 se presentan las ecuaciones de regresión correspondientes a la evolución del número de crías a lo largo de los 21 días de ensayo, para el control y para cada una de las muestras de agua estudiadas.

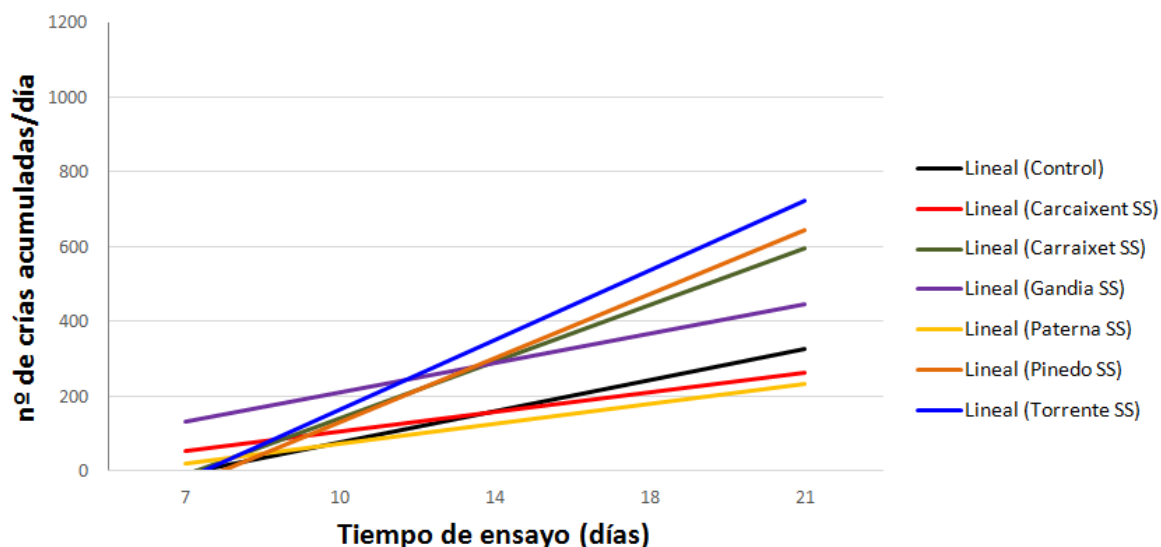
**Tabla 11.** Análisis de regresión de la evolución del número total de crías acumuladas/día de *D. magna* para cada muestra en el ensayo de toxicidad crónica.

Muestra	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>
Control	$y = 83,1x - 88,1$	0,981
Carraixet E	$y = 260,1x - 264,3$	0,969
Pinedo E	$y = 252,0x - 273,8$	0,996
Torrent E	$y = 165,2x - 167,2$	0,976
Gandía E	$y = 149,9x - 75,7$	0,994
Paterna Urb	$y = 149,2x - 86,0$	0,989
Paterna Ind	$y = 144,5x - 77,7$	0,983
Carcaixent E	$y = 119,4x - 48,4$	0,999
Torrente SS	$y = 185,5x - 206,3$	0,982
Pinedo SS	$y = 171,5x - 211,7$	0,962
Carraixet SS	$y = 151,1x - 160,7$	0,991
Carcaixent SS	$y = 105,0x - 53,3$	0,952
Gandía SS	$y = 78,7x + 52,7$	0,941
Paterna SS	$y = 53,9x - 34,9$	0,957

En las Figuras 25 y 26 se presenta la evolución del número de crías a lo largo de los 21 días de ensayo para las muestras recogidas a la entrada y a la salida de las EDARs, respectivamente. Como se puede observar en la Tabla X y en las Figuras 25 y 26, las muestras de entrada presentan, en general, una mayor pendiente que las aguas recogidas tras la salida del tratamiento secundario, lo que refleja la mayor puesta por parte de las hembras expuestas a las aguas de entrada, destacando Carraixet E y Pinedo E. Gandía SS y Paterna SS presentan pendientes inferiores al control.



**Figura 25.** Evolución del número de crías de *D. magna* de la muestra control y de las muestras tomadas a la entrada de las EDARs, a lo largo de los 21 días de ensayo.



**Figura 26.** Evolución del número de crías de *D. magna* de la muestra control y de las muestras tomadas a la salida del tratamiento secundario de las EDARs, a lo largo de los 21 días de ensayo.

Algunos autores como Villarroel *et al.* (2000) mostraron en sus estudios una disminución de la reproducción respecto al control conforme se aumentaba la concentración de un compuesto orgánico denominado tetradifon. Otros autores como Rossetto *et al.* (2014) observaron el efecto totalmente contrario al trabajar con nanopartículas de CuO, lo que podría indicar que el microcrustáceo intenta preservar la especie bajo condiciones de estrés. En este bioensayo, los resultados se parecen más a los obtenidos por estos últimos autores, ya que son aquellas muestras que aun no han entrado en la planta de depuración, es decir, están más contaminadas que tras el tratamiento secundario o terciario, las que producen una estimulación de la reproducción del microcrustáceo. Así, se demostraría la eficacia en el

tratamiento de las aguas en las diferentes estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de Valencia estudiadas.

En un estudio realizado en paralelo por Enguix (datos no publicados, 2016) se ha comprobado que las muestras correspondientes a la entrada de las EDARs presentan mayor efecto estrogénico, lo que justifica la estimulación de la puesta por parte de las hembras expuestas. En la mayoría de las muestras la actividad estrogénica es eliminada con el tratamiento secundario.

### 4.3. Ensayo de toxicidad aguda con levaduras

En las Tablas 12, 13 y 14 se presentan los valores medios de los datos obtenidos tras el ensayo, expresados como porcentajes de viabilidad, para cada nivel de dilución de las muestras de agua estudiadas. Además, se presentan los valores RSD (Desviación Estándar Relativa), para expresar la variabilidad entre las diferentes réplicas.

El análisis ANOVA de la variable dependiente % *viabilidad* con respecto al factor *dilución* reflejado en las Tablas 12, 13 y 14, muestra que existen diferencias significativas en la respuesta de cada una de las levaduras ( $p < 0,05$ ). Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras se ha realizado, para cada muestra de agua, un Test de Rango Múltiple.

Al igual que en el ensayo de toxicidad aguda con *D. magna*, en este ensayo destaca un efecto, significativamente mayor, de las muestras de entrada a las EDARs sobre la viabilidad de las levaduras, para el nivel de dilución 1:1, con unos porcentajes inferiores a los porcentajes de viabilidad de las levaduras expuestas a las muestras de los tratamientos secundarios.

En las Figuras 27, 28 y 29 se presentan los valores medios de los datos obtenidos tras el ensayo, expresados como porcentajes de viabilidad, para los niveles de dilución 1:1 y 1:2 de las muestras. En general, destaca la viabilidad celular significativamente mayor de las levaduras expuestas a la dilución 1:2 de las muestras.

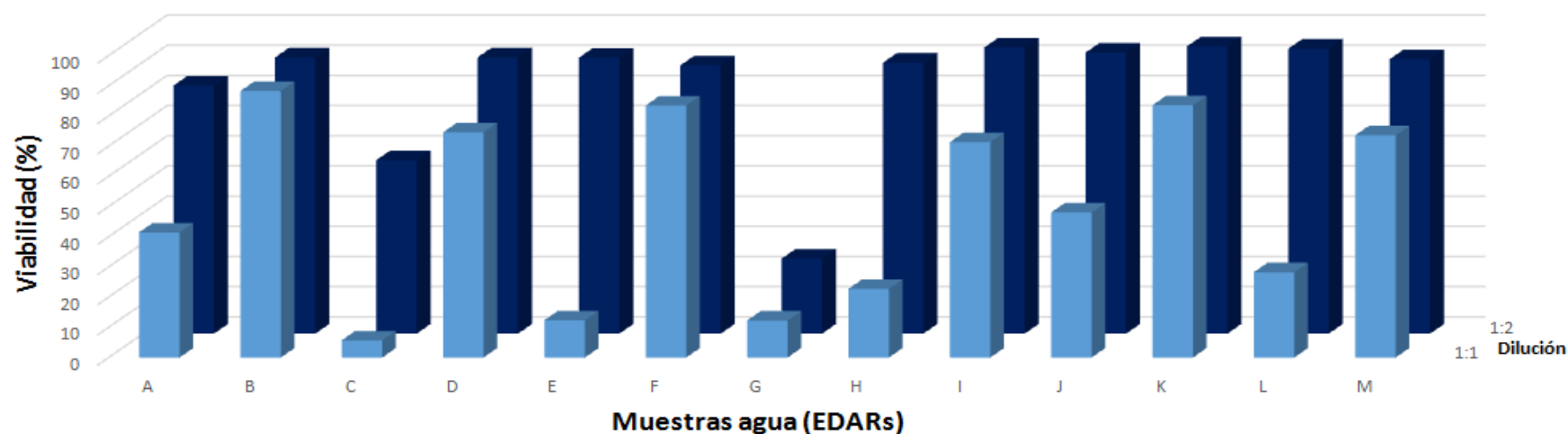
**Tabla 12.** Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura *Hanseniaspora* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua.

Dil**	Viabilidad (%)*												
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	IND	URB	SS	E	SS	E	SS
1:1	41,4±1,9 <sup>a</sup>	88,3±1,0 <sup>a</sup>	5,7±0,6 <sup>a</sup>	74,6±1,2 <sup>a</sup>	12,4±1,7 <sup>a</sup>	83,5±1,0 <sup>a</sup>	12,2±3,5 <sup>a</sup>	22,7±1,6 <sup>a</sup>	71,3±1,5 <sup>a</sup>	48,1±1,3 <sup>a</sup>	83,6±1,7 <sup>a</sup>	28,3±1,7 <sup>a</sup>	73,6±1,7 <sup>a</sup>
1:2	82,2±1,2 <sup>bc</sup>	91,4±1,5 <sup>ab</sup>	57,4±0,8 <sup>b</sup>	91,5±4,3 <sup>bc</sup>	91,4±0,9 <sup>b</sup>	88,8±0,4 <sup>a</sup>	24,8±6,7 <sup>b</sup>	89,7±1,3 <sup>bc</sup>	94,8±1,4 <sup>b</sup>	93,1±1,2 <sup>b</sup>	95,1±0,7 <sup>b</sup>	94,4±1,4 <sup>b</sup>	90,9±1,3 <sup>b</sup>
1:4	76,4±1,6 <sup>b</sup>	96,5±1,9 <sup>ab</sup>	85,4±1,8 <sup>c</sup>	88,1±1,5 <sup>b</sup>	94,7±0,7 <sup>b</sup>	98,9±1,5 <sup>b</sup>	42,3±1,4 <sup>c</sup>	86,9±3,6 <sup>b</sup>	100,2±0,7 <sup>b</sup>	96,8±1,1 <sup>b</sup>	98,0±1,1 <sup>b</sup>	95,7±1,5 <sup>b</sup>	96,8±1,0 <sup>bc</sup>
1:8	89,6±1,6 <sup>cd</sup>	98,9±1,2 <sup>b</sup>	98,8±0,9 <sup>d</sup>	98,2±21,7 <sup>bc</sup>	95,0±1,8 <sup>b</sup>	98,7±1,3 <sup>b</sup>	72,0±1,4 <sup>d</sup>	98,5±4,6 <sup>c</sup>	99,5±1,0 <sup>b</sup>	93,1±2,3 <sup>b</sup>	99,1±2,7 <sup>b</sup>	98,1±0,7 <sup>b</sup>	98,3±2,9 <sup>bc</sup>
1:16	87,0±2,2 <sup>bc</sup>	90,0±1,3 <sup>ab</sup>	95,8±1,0 <sup>d</sup>	97,2±1,8 <sup>bc</sup>	98,1±1,4 <sup>b</sup>	99,5±0,4 <sup>b</sup>	83,6±2,4 <sup>e</sup>	99,7±1,3 <sup>c</sup>	101,6±0,8 <sup>b</sup>	98,1±2,1 <sup>b</sup>	101,5±0,4 <sup>b</sup>	100,0±0,5 <sup>b</sup>	101,6±0,6 <sup>c</sup>

\*: Media de cuatro réplicas ± RSD.

Los superíndices en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*\*Dil: Dilución



**Figura 27.** Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura *Hanseniaspora* para las diluciones 1:1 y 1:2 de las muestras de agua. A: Carcaixent E; B: Carcaixent SS; C: Carraixet E; D: Carraixet SS; E: Gandia E; F: Gandia SS; G: Paterna Ind; H: Paterna Urb; I: Paterna SS; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS.

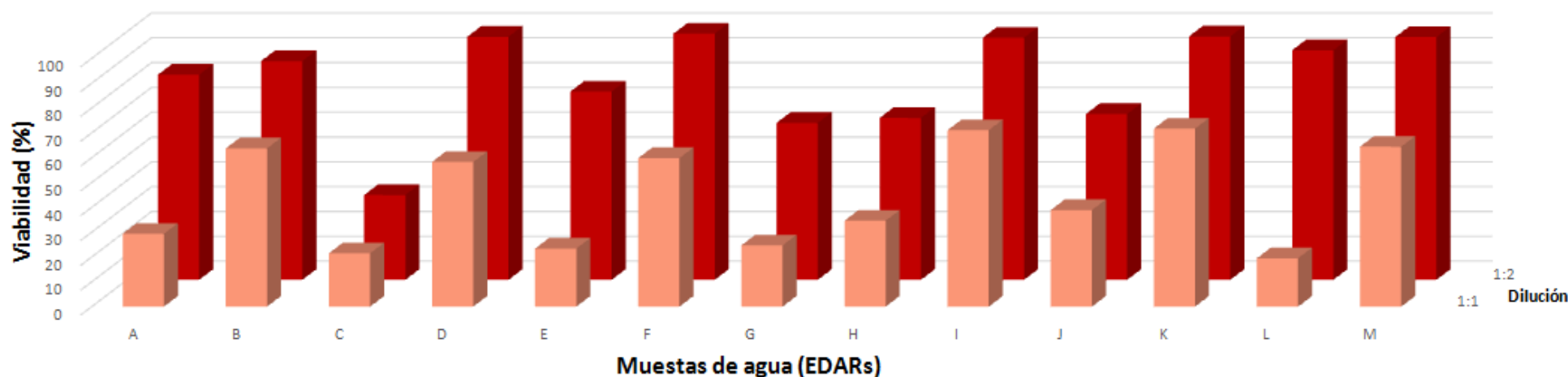
**Tabla 13.** Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura *Rhodotorula* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua.

Dil**	Viabilidad (%)*												
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	IND	URB	SS	E	SS	E	SS
1:1	29,3±1,4 <sup>a</sup>	63,7±4,5 <sup>a</sup>	21,5±2,7 <sup>a</sup>	58,3±2,3 <sup>a</sup>	23,4±3,1 <sup>a</sup>	59,8±0,2 <sup>a</sup>	24,7±2,0 <sup>a</sup>	34,6±1,8 <sup>a</sup>	71,1±1,4 <sup>a</sup>	38,9±2,0 <sup>a</sup>	71,7±2,3 <sup>a</sup>	19,5±1,7 <sup>a</sup>	64,4±0,9 <sup>a</sup>
1:2	82,6±4,0 <sup>b</sup>	88,1±1,8 <sup>b</sup>	34,2±1,4 <sup>b</sup>	97,9±0,7 <sup>b</sup>	75,8±1,0 <sup>b</sup>	99,2±0,5 <sup>b</sup>	63,3±2,2 <sup>b</sup>	65,2±2,0 <sup>b</sup>	97,6±3,5 <sup>b</sup>	66,8±1,5 <sup>b</sup>	98,1±8,3 <sup>b</sup>	92,5±0,7 <sup>b</sup>	97,8±1,4 <sup>bc</sup>
1:4	92,1±1,1 <sup>bc</sup>	82,8±0,8 <sup>b</sup>	51,5±1,9 <sup>c</sup>	98,2±1,0 <sup>b</sup>	96,0±0,1 <sup>c</sup>	101,3±1,2 <sup>b</sup>	96,7±4,5 <sup>c</sup>	83,0±3,0 <sup>c</sup>	97,8±2,8 <sup>b</sup>	79,6±2,0 <sup>c</sup>	97,7±3,4 <sup>b</sup>	101,7±0,3 <sup>bc</sup>	105,3±2,9 <sup>bc</sup>
1:8	96,9±1,0 <sup>c</sup>	84,6±2,4 <sup>b</sup>	78,6±1,9 <sup>d</sup>	100,9±0,6 <sup>b</sup>	99,8±1,5 <sup>c</sup>	91,5±0,3 <sup>b</sup>	107,4±8,2 <sup>c</sup>	97,2±2,0 <sup>d</sup>	96,7±2,0 <sup>b</sup>	96,5±0,7 <sup>d</sup>	96,7±1,4 <sup>b</sup>	104,1±1,1 <sup>c</sup>	105,2±4,2 <sup>bc</sup>
1:16	97,3±1,7 <sup>c</sup>	84,8±2,1 <sup>b</sup>	96,9±1,4 <sup>e</sup>	97,5±1,2 <sup>b</sup>	99,0±2,1 <sup>c</sup>	93,7±1,4 <sup>b</sup>	103,6±6,4 <sup>c</sup>	101,1±0,6 <sup>d</sup>	96,8±1,0 <sup>b</sup>	103,6±0,3 <sup>d</sup>	95,8±2,5 <sup>b</sup>	104,4±1,0 <sup>c</sup>	108,6±2,0 <sup>c</sup>

\*: Media de cuatro réplicas ± RSD.

Los superíndices en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*\*Dil: Dilución



**Figura 28.** Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura *Rhodotorula* para las diluciones 1:1 y 1:2 de las muestras de agua. A: Carcaixent E; B: Carcaixent SS; C: Carraixet E; D: Carraixet SS; E: Gandía E; F: Gandía SS; G: Paterna Ind; H: Paterna Urb; I: Paterna SS; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS.

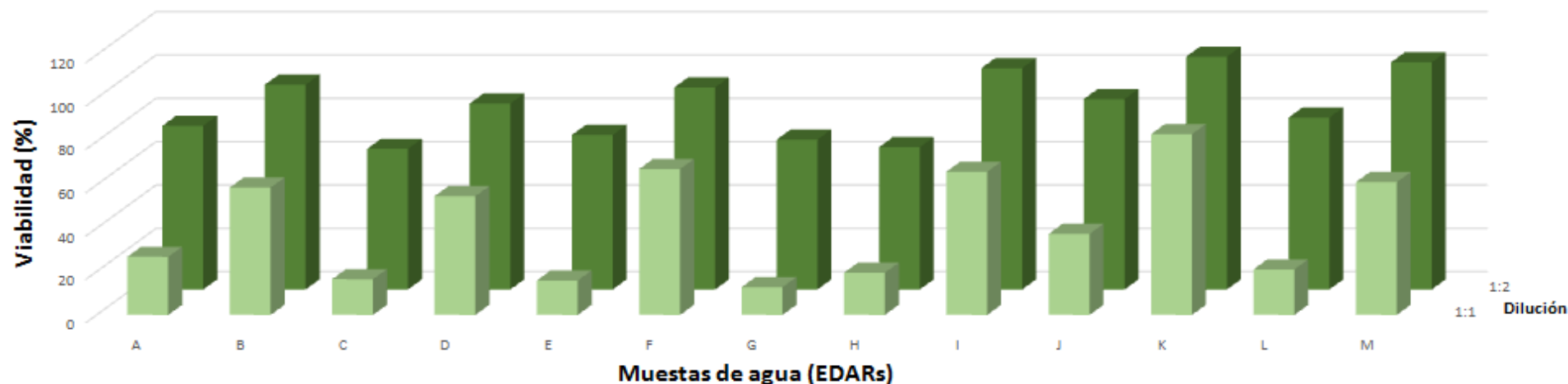
**Tabla 14.** Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura *Saccharomyces* expuesta a diferentes diluciones de las muestras de agua.

Dil**	Viabilidad (%)*												
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	IND	URB	SS	E	SS	E	SS
1:1	26,8±1,0 <sup>a</sup>	58,7±3,4 <sup>d</sup>	16,5±0,6 <sup>d</sup>	54,8±1,6 <sup>d</sup>	15,9±1,8 <sup>a</sup>	67,3±2,3 <sup>d</sup>	12,8±0,8 <sup>a</sup>	19,4±1,5 <sup>d</sup>	66,1±1,7 <sup>d</sup>	37,4±1,4 <sup>a</sup>	83,4±2,1 <sup>a</sup>	21,0±1,9 <sup>d</sup>	61,2±1,3 <sup>a</sup>
1:2	75,5±1,6 <sup>b</sup>	94,4±6,1 <sup>b</sup>	64,9±0,9 <sup>b</sup>	85,7±1,4 <sup>b</sup>	71,3±1,6 <sup>b</sup>	93,2±1,0 <sup>b</sup>	69,1±2,3 <sup>b</sup>	65,6±2,4 <sup>b</sup>	102,1±2,0 <sup>bc</sup>	87,8±0,5 <sup>b</sup>	107,4±4,4 <sup>c</sup>	79,3±2,0 <sup>b</sup>	104,8±5,3 <sup>bc</sup>
1:4	100,5±3,1 <sup>c</sup>	106,5±3,0 <sup>b</sup>	89,8±2,2 <sup>c</sup>	99,7±2,6 <sup>c</sup>	96,3±3,9 <sup>c</sup>	106,4±3,5 <sup>c</sup>	98,7±2,2 <sup>c</sup>	101,6±2,7 <sup>c</sup>	98,8±2,2 <sup>bc</sup>	99,7±1,6 <sup>c</sup>	104,3±2,7 <sup>bc</sup>	102,7±4,3 <sup>c</sup>	109,8±2,1 <sup>c</sup>
1:8	103,4±3,9 <sup>c</sup>	97,5±3,2 <sup>b</sup>	103,2±0,3 <sup>d</sup>	95,2±4,5 <sup>c</sup>	100,3±2,8 <sup>c</sup>	98,3±0,8 <sup>bc</sup>	100,2±4,2 <sup>c</sup>	105,2±5,6 <sup>c</sup>	110,2±12,2 <sup>c</sup>	94,3±1,3 <sup>bc</sup>	100,6±1,8 <sup>bc</sup>	104,4±3,2 <sup>c</sup>	106,5±3,3 <sup>c</sup>
1:16	103,5±0,5 <sup>c</sup>	100,5±2,7 <sup>b</sup>	104,1±2,4 <sup>d</sup>	98,7±4,7 <sup>bc</sup>	93,6±1,3 <sup>c</sup>	101,6±0,8 <sup>bc</sup>	99,0±7,3 <sup>c</sup>	104,6±3,2 <sup>c</sup>	98,5±2,8 <sup>bc</sup>	95,7±2,9 <sup>bc</sup>	98,2±4,2 <sup>bc</sup>	105,4±2,3 <sup>c</sup>	102,0±4,3 <sup>bc</sup>

\*: Media de cuatro réplicas ± RSD.

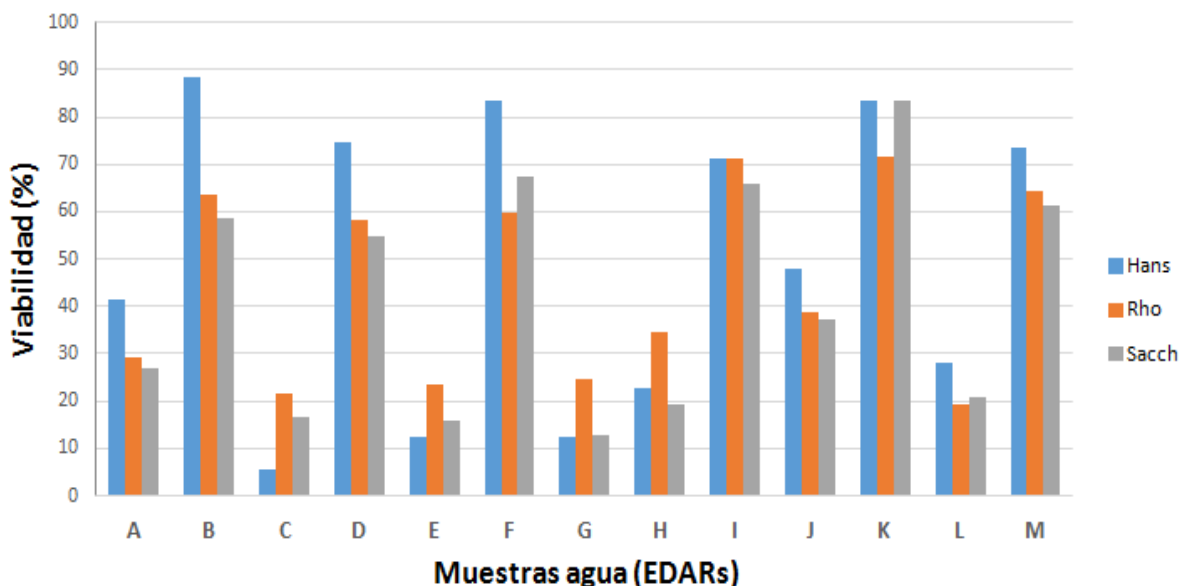
Los superíndices en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*\*Dil: Dilución



**Figura 29.** Media de los porcentajes de viabilidad de la levadura *Saccharomyces* para las diluciones 1:1 y 1:2 de las muestras de agua. A: Carcaixent E; B: Carcaixent SS; C: Carraixet E; D: Carraixet SS; E: Gandia E; F: Gandia SS; G: Paterna Ind; H: Paterna Urb; I: Paterna SS; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS.

Las tres especies de levaduras han mostrado una sensibilidad similar cuando se exponen a la misma muestra de agua, tal y como se aprecia en la Figura 30. Este hecho es interesante ya que, en este tipo de estudio para valorar la toxicidad de aguas residuales se podría reducir el número de levaduras a una, disminuyendo costes y tiempo, cuando queremos realizar un *screening* rápido de la toxicidad de las aguas.



**Figura 30.** Porcentaje de viabilidad celular/muestra de *Hanseniaspora*, *Rhodotorula* y *Saccharomyces*. (A: Carcaixent E; B: Carcaixent SS; C: Carraixet E; D: Carraixet SS; E: Gandía E; F: Gandía SS; G: Paterna Ind; H: Paterna Urb; I: Paterna SS; J: Pinedo E; K: Pinedo SS; L: Torrent E; M: Torrent SS. Hans: *Hanseniaspora*; Rho: *Rhodotorula*; Sacch: *Saccharomyces*).

Con el fin de calcular los valores LID (Tabla 15) de las diferentes muestras procedentes de las EDARs, para cada especie de levadura, se ha realizado un análisis ANOVA.

Los valores LID revelan una disminución de la toxicidad de las muestras de agua recogidas a la salida del tratamiento secundario de las distintas EDARs, con respecto a las muestras de entrada, para las tres especies de levaduras.

**Tabla 15.** Valores LID para las tres especies de levaduras.

Levadura*	Muestras EDARs												
	CARCAIXENT		CARRAIXET		GANDÍA		PATERNA			PINEDO		TORRENT	
	E	SS	E	SS	E	SS	IND	URB	SS	E	SS	E	SS
Hans	1:8	1:2	1:8	1:2	1:2	1:2	>1:16	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
Rho	1:4	1:2	1:16	1:2	1:4	1:2	1:4	1:8	1:2	1:8	1:2	1:4	1:2
Sacch	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:4	1:2	1:2	1:2	1:4	1:2

\*Hans: *Hanseniaspora*; Rho: *Rhodotorula*; Sacch: *Saccharomyces*.

Se han calculado los valores MID (Tabla 16), con sus intervalos de confianza al 95%, mediante análisis Probit, para aquellas muestras con porcentajes de viabilidad celular superiores al 50%. Destaca la toxicidad de las muestras Paterna Ind y Carraixet E con valores MID de 1:45 y 1:30, respectivamente.

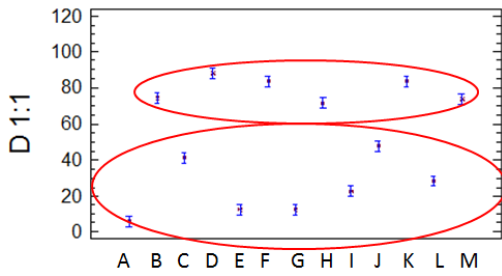
**Tabla 16.** Valores MID para las tres especies de levaduras, con los intervalos de confianza al 95%.

MUESTRA	Levaduras		
	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Saccharomyces</i>
CARCAIXENT E	1:8 (1:14 - 1:2)	1:12 (1:17 - 1:8)	1:14 (1:15 - 1:13)
CARCAIXENT SS	-	-	-
CARRAIXET E	1:21 (1:29 - 1:14)	1:30 (1:34 - 1:27)	1:17 (1:19 - 1:15)
CARRAIXET SS	-	-	-
GANDÍA E	1:14 (1:21 - 1:7)	1:14 (1:26 - 1:2)	1:17 (1:23 - 1:11)
GANDÍA SS	-	-	-
PATERNA IND	1:45 (1:47 - 1:43)	1:17 (1:23 - 1:11)	1:17 (1:27 - 1:10)
PATERNA URB	1:13 (1:18 - 1:7)	1:14 (1:16 - 1:12)	1:17 (1:22 - 1:12)
PATERNA SS	-	-	-
PINEDO E	1:7 (1:11 - 1:2)	1:14 (1:15 - 1:12)	1:9 (1:14 - 1:4)
PINEDO SS	-	-	-
TORRENT E	1:12 (1:18 - 1:4)	1:13 (1:14 - 1:12)	1:14 (0,058-0,085)
TORRENT SS	-	-	-

En este trabajo, los valores MID calculados para *D. magna* oscilan entre 1:1 y 1:3 para todas las muestras estudiadas excepto las muestras de entrada de Paterna urbana e industrial. En cambio, el ensayo con las levaduras muestra mayor variabilidad en los valores MID obtenidos, oscilando entre 1:7 y 1:45 para *Hanseniaspora*, entre 1:12 y 1:30 para *Rhodotorula* y entre 1:9 y 1:17 para *Saccharomyces*. En general, estos valores son mayores que los obtenidos en el ensayo con daphnia, lo que demuestra la mayor sensibilidad de las levaduras.

Se ha realizado también un análisis ANOVA de la variable dependiente % de viabilidad celular con respecto al factor *muestra de agua*, para cada nivel de dilución. Dicho análisis indica diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de las levaduras ( $p < 0,05$ ) expuestas a las diferentes muestras de agua. Los resultados indican diferencias significativas entre las muestras sobre la viabilidad celular de las levaduras para la dilución 1:1 (Figuras 31, 33 y 35), destacando dos grupos: las muestras de entrada a las EDARs estudiadas y las muestras de salida del tratamiento secundario de las mismas. Estas diferencias disminuyen a medida que aumenta la dilución, no existiendo diferencias significativas entre las muestras para la dilución 1:16 (Figuras 32, 34 y 36) y para las tres especies de levaduras.

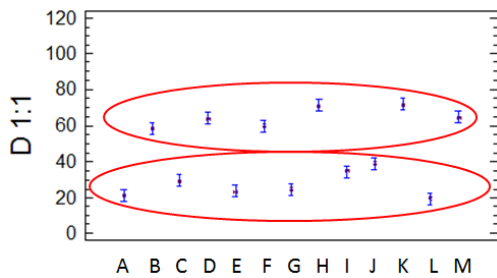




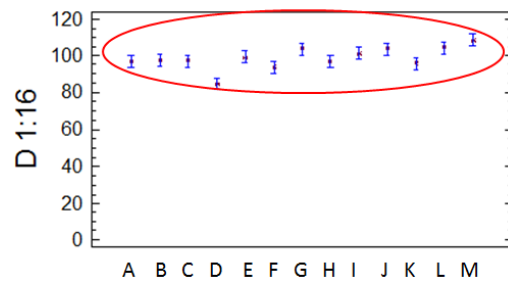
**Figura 31.** Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para Hanseniaspora.



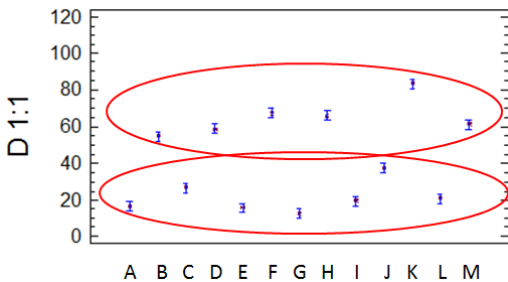
**Figura 32.** Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para Hanseniaspora.



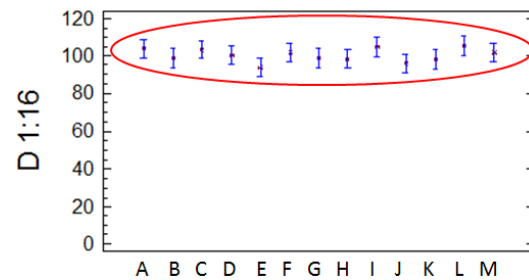
**Figura 33.** Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para Rhodotorula.



**Figura 34.** Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para Rhodotorula.



**Figura 35.** Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:1 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para Saccharomyces.



**Figura 36.** Media de los porcentajes de viabilidad para la dilución 1:16 y para cada nivel de muestra, con el error estándar de cada media (LSD), para Saccharomyces.

## **5. CONCLUSIONES**

---

## 5. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de toxicidad realizados con *D.magna* y con las tres especies de levaduras muestran, en general, que los tratamientos de depuración llevados a cabo en las diferentes depuradoras son efectivos desde el punto de vista toxicológico.
2. De las seis EDARs estudiadas, las aguas procedentes de las entradas urbana e industrial de la EDAR Paterna han sido las más tóxicas, lo cual está relacionado con el tipo de actividades realizadas por la población servida.
3. En el ensayo de toxicidad crónico con *D.magna*, las muestras de entrada a las EDARs producen una mayor estimulación de la puesta de las hembras debido a la actividad estrogénica de las mismas.
4. En este estudio con aguas residuales las levaduras han mostrado tener mayor sensibilidad que el cladócono.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. AHEARN DG; ROTH FJ, JR.; MEYERS SP. (1.962). *A comparative study of marine and terrestrial strains of Rhodotorula*. Can. J. Microbiol., 8: 121-32.
2. ALONSO M. (1.996). *"Fauna Iberica" Vol 7 Crustacea Branchiopoda*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Eds. Ramos M.A. Madrid. 486 pp.
3. BELGIORNO, V.; RIZZO, L.; FATTA, D.; DELLA ROCCA, C.; LOFRANO, G.; NIKOLAOU, A.; MERIC, S. (2.007). *Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse*. Desalination, 215(1-3): 166–176.
4. BERNARDO, M.; SANTOS, A.; CANTINHO, P.; MINHALMA, M. (2.011). *Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: a biodegradation and valorisation study*. Water Res., 45(2): 904–912.
5. BISTAN, M.; PODGORELEC, M.; LOGAR, RM; TIŠLER T. (2.011). *Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity of waters*. Food Technol. Biotechnol., 50(4): 427-434.
6. BITTON G. (1.999). Toxicity testing in wastewater treatment plants using microorganisms. In Mitchell R, ed, *Wastewater Microbiology*, Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology. John Wiley, New York, NY, USA. 413–426 pp.
7. BLAISE C. (1.998). Microbiotesting. An expanding field in aquatic toxicology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40:115–119.
8. BOLONG, N.; ISMAIL, AF.; SALIM, MR.; MATSUURA, T. (2.009). *A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal*. Desalination, 239: 229-246.
9. BUIKEMA, A.L.; GEIGER, J.G.; LEE, D.R. (1.980). *Daphnia toxicity tests*. En: (Buikema A.L., Cairns J., eds), *Aquatic invertebrate bioassays ASTM STP 715*, American Society for Testing and Materials, Pennsylvania. 48-69 pp.
10. CAIRNS Jr. J.; PRATT J. R. (1.989). *The scientific basis of bioassays*. En: *Environmental Bioassay Techniques and their Application*, Munawar Dixon, Mayfield, Reynoldson, Sadar (Eds), *Hydrobiol.* 188/189: 5-20.
11. CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDÚA, D.; GINEBREDA, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. (2.005). *Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain)*. Chemosphere, 61: 1710-1719.
12. CHAPMAN P. (1.995). *Ecotoxicology and Pollution-Key Issues*. Mar. Poll. Bull. 31: 167-177.
13. CLEMÉNT B. (2.006). *Apports des essais en microcosmes aquatiques lenticques 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. Vauls-en-Veelin, 277 pp.
14. DAYEH, V.R.; CHOW, S.L.; SCHIRMER, K.; LYNN, D.H.; BOLS, N.C. (2.004). *Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability*. Ecotox Environ. Safe 57 (3): 375–382.
15. FERNÁNDEZ, M.P.; NOGUEROL, T.; LACORTE, S.; BUCHANAN, I.; PIÑA, B. (2.009). *Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay*. Anal. Bioanal. Chem., 393: 957–968.
16. GARCÍA, J.; MUJERIEGO, R.; OBIS, J.M.; BOU, J. (2.001). *Wastewater treatment for small communities in Catalonia (Mediterranean Region)*. Water Policy: Official Journal of the World Water, 3(4): 341-350.
17. GARCÍA, J.; MUJERIEGO, R.; OBIS, J.M.; BOU, J. (2.001). *Wastewater treatment for small communities in Catalonia (Mediterranean Region)*. Water Policy: Official journal of the World Water, 3(4): 341-350.
18. HEBERT P.D.N. (1.978). *The population biology of Daphnia (Crustacea, Daphnidae)*. Biol. Rev. 53: 387-426.
19. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, A.; HERNÁNDEZ-LEHMANN, A.; GALÁN, P. (1.995). *Manual de Depuración Uralita*. Editorial Paraninfo, S.A. Madrid. 472 pp.
20. JURADO, A.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; CARRERA, J.; LÓPEZ DE ALDA, M.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. (2.012). *Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context*. Sci. Total Environ., 440: 82–94.
21. KAMIZOULIS, G.; BAHRI, A.; BRISSAUD, F.; ANGELAKIS, A. N. (1.999). *Wastewater recycling and reuse practices in Mediterranean region*. Recommended Guidelines.
22. KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (1.998). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th Edition. Elsevier
23. LARSSON P.; DODSON S. (1.993). *Chemical communication in plankton animals*. Arch. Hydrobiol. 129: 129-155.
24. LEROUX, P. (2.003). *Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogenes des plantes: mode of action of agrochemicals towards plant pathogens*. C R Biol. 326: 9–21.

25. LIU, Z.-H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. (2.009). *Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review*. *Sci. Total Environ.*, 407(2): 731–748.
26. MA, T.; WA, X.; HUANG, Q.; WANG, Z.; LIU, J. (2.005). *Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)*. *Chemosphere*, 59: 281–288.
27. MARUGÁN, J.; BRU, D.; PABLOS, C.; CATALÁ, M. (2.012). *Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis*. *J. Hazard. Mater.*, 213-21: 117–122.
28. MAURÍCIO, R.; DINIZ, M.; PETROVIC, M.; AMARAL, L.; PERES, I.; BARCELÓ, D.; SANTANA, F. (2.006). *A characterization of selected endocrine disruptor compounds in a Portuguese wastewater treatment plant*. *Environ. Monitor. Assess.*, 118: 75–87.
29. NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. (2.006). *Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 1012–1019.
30. OCDE 211. (2.012). *Guidelines for testing of chemicals. Daphnia Magna Reproduction Test*.
31. PAPAETHIMIOU, C.; CABRAL, M.D.; MIXAILIDOU, C.; VIEGAS, C.A.; SA-CORREIA, I.; THEOPHILIDIS, G. (2.004). *Comparison of two screening bioassays, based on the frog sciatic nerve and yeast cells, for the assessment of herbicide toxicity*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1211–1218.
32. PATRICIA BI FAI; ALASTAIR GRANT (2.009). *A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides*. *Chemosphere* (74): 1165–1170.
33. PERES, J. A.; BELTRÁN DE HEREDIA, J.; DOMÍNGUEZ, J. R. (2.004). *Integrated Fenton's reagent-coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters*. *Journal of Hazardous Materials*, 107(3): 115–121.
34. RIVAS, A.; GRANADA, A.; JIMÉNEZ, M.; OLEA, F.; OLEA, N. (2.004). *Exposición humana a disruptores endocrinos*. *Ecosistemas*, 13(3): 7-12.
35. RIZZO, L. (2.011). *Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment*. *Water Res.*, 45: 4311-4340.
36. ROMANO-MOZO, D. (2.012). *Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos*. Ed. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS)
37. RONCO A.; DÍAZ BÁEZ M. C.; PICA GRANADOS Y. (2.004). *Conceptos generales*. En: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, Castillo Morales (Ed.)*, Centro Intern. Inv. Desarrollo, Canadá - IMTA, México, 17-22.
38. ROSSETTO, A. L.; PEDROSO, S.; OURIQUES, L; GERSON, W. (2.014). *Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri**. *Science of the Total Environment*, 490: 807 – 814.
39. SÁNCHEZ-PRADO, L.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. (2.010). *Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples*. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2390–2414.
40. SEGNEANU, A.E.; LAZAU, C.; SFIRLOAGA, P.; LAZAN, P.; BANDAS, C.; GROZESCU, I.; ORBECI, C. (2.013). *Waste Water Treatment Methods*, en: "Water Treatment". Ediciones Walid Elshorbagy and Rezaul Kabir Chowdhury.
41. SHERMAN, F. (2.002). *Getting started with yeast*. *Method Enzymol.* 350: 3–41.
42. SILVA, C.; OTERO, M.; ESTEVES, V. (2.012). *Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review*. *Environ. Pol.*, 165: 38-58.
43. SOLE, M.; PORTE, C.; BARDELO, D. (2.001). *Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker*. *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 20: 518–525.
44. VILLARROEL, M. J.; FERRANDO, M. D.; SANCHO, E; ANDREU, E. (2.000). *Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide*. *Aquat. Toxicol.*, 49: 39 – 47.
45. VOLATIER L. (2.004). *Réponse d'une communauté périphtyque 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. 303 pp.