

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



VALORACIÓN ECOTOXICOLÓGICA Y ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DE CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE O DE RIESGO SIGNIFICATIVO CONTENIDOS EN LA DIRECTIVA 2013/39/CE.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: **Carlos Calomarde Juárez**

TUTOR/A: **M^a Ángeles Castillo López**

COTUTOR/A: **Consuelo Sabater Marco**

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, JULIO 2017

Datos personales

Alumno/a: Carlos Calomarde Juárez

Datos del Trabajo Fin de Grado

Título del TFG:	Valoración ecotoxicológica y actividad estrogénica de contaminantes de preocupación emergente o de riesgo significativo contenidos en la Directiva 2013/39/CE.	
Lugar de realización:	Departamento de Biotecnología	Fecha de lectura: Julio 2017
Titulación:	Grado en Biotecnología	
Especialidad:	Toxicología ambiental	
Director/a:	M ^a Ángeles Castillo López	
Codirector/a:	Consuelo Sabater Marco	

Resumen

El agua es un recurso esencial para la vida en este planeta, pero no es un bien ilimitado. Debido al calentamiento global, hoy en día existen situaciones de escasez en zonas donde antes era abundante. A esto hay que sumarle el continuo desarrollo de la sociedad, el cual va acompañado de un aumento de las actividades urbanas, industriales y agrícolas, junto a los residuos que estos generan. Así pues, nos damos cuenta de lo importante que resulta realizar una buena gestión de estos desechos para evitar la contaminación de un bien tan preciado.

Por ello, se ha instaurado una legislación con el fin de proteger los ambientes acuáticos, destacando en Europa la Directiva Marco del Agua (DMA), aprobada por el Parlamento Europeo en el año 2000. Desde entonces ha ido recibiendo revisiones con el objetivo de actualizar las sustancias prioritarias y los ensayos realizados en estas para establecer unas normas de calidad ambiental que las empresas y los ayuntamientos han de seguir a la hora de deshacerse de sus residuos.

No obstante, siguen saliendo al mercado nuevos compuestos químicos cada año y hay otros que, pese a estar presentes desde hace mucho tiempo, hemos detectado recientemente su presencia en el medio por la evolución de las técnicas analíticas. Estos son los llamados contaminantes emergentes, que debido a su falta de regulación en la legislación actual y al desconocimiento de sus efectos a corto y largo plazo sobre el ambiente y los organismos que lo pueblan, se han convertido en una prioridad para los investigadores.

En este trabajo se ha estudiado la toxicidad de cinco contaminantes emergentes presentes en la Directiva 2013/39/CE [clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, sulfanato de perfluorooctano (PFO) y terbutrina] mediante la realización de una batería de bioensayos que representen varios niveles tróficos del medio, como son el invertebrado *Daphnia magna* y la planta *Lemna minor*, organismos modelo del medio acuático, y la lombriz de tierra *Eisenia fetida*, organismo modelo para la toxicidad del suelo. Además, también se ha realizado un ensayo RYA (*Recombinant Yeast Assay*) con una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa el receptor alfa de estrógenos humano para comprobar si estas sustancias presentan actividad estrogénica, resultando positiva en clorfenvinfos, PFO y terbutrina, pero no

pudiéndose determinar en diclofenaco y pentaclorofenol debido a la toxicidad ejercida sobre la levadura.

Con los resultados obtenidos se ha realizado una evaluación ambiental del riesgo de estos compuestos químicos, comparando el efecto producido sobre los organismos acuáticos ensayados con las concentraciones que las directivas europeas exigen para sus aguas, mediante el cálculo del cociente PEC/PNEC. Viendo los valores resultantes, se concluye que el diclofenaco y el PFO representan un riesgo bajo, pero que el clorfenvinfos, la terbutrina y, sobretodo, el pentaclorofenol, suponen un riesgo alto para la vida acuática, ya que los umbrales de concentración exigidos por la legislación vigente son suficientes para provocar efectos nocivos sobre algunos organismos.

Palabras clave

Contaminantes emergentes, bioensayos, toxicidad, *D. magna*, *E. fetida*, *L. minor*, RYA, PEC/PNEC.

Resum

L'aigua és un recurs essencial per a la vida al planeta, però no és un bé il·limitat. El canvi climàtic global ha provocat situacions d'escassetat en zones en les quals abans era abundant, i si a açò l'afegim el continu desenvolupament de la societat, el qual va acompanyat d'un augment de les activitats urbanes, industrials i agrícoles (junt als residus que aquestes generen), ens adonem de la importància de realitzar una bona gestió d'aquestes deixalles per a evitar la contaminació d'un bé tan preuat.

Amb aquest fi, s'ha instaurat una legislació per a protegir els ambients aquàtics, destacant a Europa la Directiva Marc de l'Aigua (DMA), aprovada pel Parlament Europeu l'any 2000. Aquesta ha anat rebent revisions amb el fi d'actualitzar les substàncies prioritàries i els assajos realitzats en aquestes per a establir unes normes de qualitat ambiental que les empreses i els ajuntaments han de seguir a l'hora de desfer-se del seus residus.

No obstant, continuen eixint al mercat nous compostos químics cada any i n'hi han altres que, encara que estiguen presents des de fa molt, ha sigut ara quan em destacat la seua presència en el medi per l'evolució de les tècniques analítiques. Aquestos s'anomenen contaminants emergents, que degut a la seua falta de regulació en la legislació actual i al desconeixement dels seus efectes a curt i llarg termini sobre l'ambient i els organismes que l'habiten, s'han convertit en una prioritat per als investigadors.

En aquest treball s'ha estudiat la toxicitat de cinc contaminants emergents presents a la Directiva 2013/39/CE [clorfenvinfos, diclofenac, pentaclorofenol, sulfonat de perfluorooctà (PFO) i terbutrina] mitjançant la realització d'una bateria de bioassajos que representen diversos nivells tròfics del medi, com son l'invertebrat *Daphnia magna* i la planta *Lemna minor*, organismes model del medi aquàtic, i el cuc de terra *Eisenia fetida*, organisme model per a la toxicitat del sòl. A més d'això, també s'ha realitzat un assaig RYA (*Recombinant Yeast Assay*) amb un cep recombinant de *Saccharomyces cerevisiae* que expressa el receptor alfa d'estrògens humà per a comprovar si aquestes substàncies presenten activitat estrogènica, resultant positiva en clorfenvinfos, PFO i terbutrina, però no podent-se determinar en diclofenac i pentaclorofenol degut a la toxicitat exercida sobre el llevat.

Amb els resultats obtinguts s'ha realitzat una avaluació ambiental del risc d'aquestos compostos químics, comparant l'efecte produït sobre els organismes aquàtics assajats amb les concentracions que les directives europees exigeixen per a les seues aigües, mitjançant el càlcul del quocient PEC/PNEC. Veient els valors resultats, es conclou que el diclofenac i el PFO representen un risc baix, però que el clorfenvinfos, la terbutrina i, sobretot, el pentaclorofenol, suposen un risc alt per a la vida aquàtica, ja que els límits de concentració exigits per la legislació vigent són suficients per a provocar efectes nocius sobre alguns organismes.

Paraules clau

Contaminants emergents, bioassajos, toxicitat, *D. magna*, *E. fetida*, *L. minor*, RYA, PEC/PNEC.

Abstract

Water is an essential resource for the life in our planet, but it is not unlimited. Global warming has provoked lack of water situations in zones where it was abundant, and together with the fact that the continuous development of society suppose an increase in urban, industrial and agricultural activities (with the residues that they produce), we realize the importance of performing a good management of these wastes to avoid the contamination of this valuated good.

There are laws that aim to protect the aquatic environment, as the Water Framework Directive (WFD), approved by the European Parliament in the year 2000. It has been revised and updated in order to add the priority substances and their performed assays to establish environmental quality standards that companies and town halls have to follow when they dispose their wastes.

However, new chemical compounds are released each year and there are others than, although they have been in the environment since a lot of time, its presence has been noticed recently due to the evolution of the analytical techniques. They are named emergent contaminants, which, because of their lack of regulation in the current law and the ignorance of their possible effects in short and long terms to the environment, they have become a priority for the researchers.

In this work, five emergent contaminants that appear in the Directive 2013/39/EC [chlorfenvinphos, diclofenac, pentachlorophenol, perfluorooctane sulfonate (PFO) and terbutryn] has been studied by the performance of a battery of bioassays that represent different trophic levels: the invertebrate *Daphnia magna* and the plant *Lemna minor* as model organisms of the aquatic environment and the earthworm *Eisenia fetida* as a model organism of the soils. Apart from this, a RYA assay with a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that express the human estrogen receptor alfa has been performed in order to check the estrogenic activity of these substances, which was detected in the chlorfenvinphos, PFO and terbutryn, but could not be determined for diclofenac and pentachlorophenol, as they were toxic to the yeast.

With the results obtained, an environmental evaluation of the risk of these substances was made, comparing their effect in the studied aquatic organisms with the concentrations that the European directives demands for their water sources, by obtaining the PEC/PNEC ratio. We conclude that diclofenac and PFO represent a low risk, but chlorfenvinphos, terbutryn and, especially, pentachlorophenol, represent a high risk to the aquatic life, as the thresholds demanded by the current legislation are enough to provoke harmful effects to some organisms.

Keywords

Emergent contaminants, bioassays, toxicity, *D. magna*, *E. fetida*, *L. minor*, RYA, PEC/PNEC.

AGRADECIMIENTOS

Bueno, pues ya estamos aquí. Parece que no, pero ya han pasado cuatro años desde que empecé la carrera y ahora estoy escribiendo las últimas palabras del último trabajo para que pueda ser considerado biotecnólogo con todas las de la ley.

Como no, tengo que dar las gracias a las personas que me han ayudado a llegar hasta aquí. En primer lugar a mi familia, obviamente, que me han apoyado siempre y me han dado ánimos cuando más agobiado estaba. También a mis amigos, tanto a los de toda la vida de mi querido pueblo natal Puerto de Sagunto, como a los que he podido hacer aquí durante este tiempo, que aunque no hayan tenido que soportar de forma directa mis quejas, han estado ahí cuando los he necesitado, como han de hacer los buenos amigos. Por último, especial mención a mis tutoras M^a Ángeles Castillo y Consuelo Sabater, que me han prestado gran apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo.

Aparte de estos agradecimientos, que son los más esperables en este tipo de secciones, quiero agradecer a los organismos que han dado su vidas durante los ensayos que he practicado, los cuales se han sacrificado no solo por el bien del avance científico, sino para permitir en un futuro que los miembros de su especie, y de sus especies vecinas en el medio en que conviven, puedan tener una vida en que gocen de unas aguas limpias y de calidad sin tener que estar expuestos a los contaminantes que sus compatriotas han tenido que sufrir en su lugar para salvar a los suyos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El problema de la contaminación del agua.....	1
1.2. Contaminantes emergentes.....	2
1.3. Bioensayos de toxicidad como herramienta para la evaluación de efectos	2
1.4. Compuestos ensayados.....	4
1.4.1. Clorfenvinfos	4
1.4.2. Diclofenaco.....	4
1.4.3. Pentaclorofenol.....	5
1.4.4. PFO.....	6
1.4.5. Terbutrina.....	7
1.5. Evaluación medioambiental.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Compuestos de ensayo	10
3.2. Ensayos de toxicidad	10
3.2.1. Ensayo de inhibición de crecimiento en <i>Lemna minor</i>	10
3.2.1.1. Metodología.....	10
3.2.1.2. Análisis de resultados	12
3.2.2. Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	13
3.2.2.1. Metodología.....	13
3.2.2.2. Análisis de resultados	14
3.2.3. Ensayo de toxicidad crónica en <i>Eisenia fetida</i>	14
3.2.3.1. Metodología.....	14
3.2.3.2. Análisis de resultados	15
3.2.4. Ensayo de repulsión en <i>Eisenia fetida</i>	15
3.2.4.1. Metodología.....	15
3.2.4.2. Análisis de resultados	16
3.2.5. Ensayo RYA (<i>Recombinant Yeast Assay</i>) para la evaluación de la actividad estrogénica	17
3.2.5.1. Organismos de ensayo.....	17
3.2.5.2. Preparación de medios de cultivo	17
3.2.5.3. Preparación de reactivos	17
3.2.5.4. Procedimiento del ensayo	18

3.2.5.5. Análisis de resultados	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1. Ensayo de toxicidad con <i>Lemna minor</i>	22
4.2. Ensayo de toxicidad agudo con <i>Daphnia magna</i>	26
4.2.1. Ensayo a las 24 horas.....	26
4.2.2. Ensayo a las 48 horas.....	27
4.3. Ensayos de toxicidad con <i>Eisenia fetida</i>	29
4.3.1. Ensayo de toxicidad crónica	29
4.3.2. Ensayo de repulsión-atracción	31
4.4. Ensayo de actividad estrogénica (RYA).....	32
4.5. Evaluación medioambiental.....	34
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37
7. ANEXO.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades químicas del clorfenvinfos.....	4
Tabla 2. Propiedades químicas del diclofenaco	5
Tabla 3. Propiedades químicas del pentaclorofenol.....	6
Tabla 4. Propiedades químicas del PFO	6
Tabla 5. Propiedades químicas de la terbutrina	7
Tabla 6. Composición de las soluciones madre del medio Steinberg modificado.....	11
Tabla 7. Composición del medio de reconstitución usado durante el ensayo de <i>Daphnia magna</i>	13
Tabla 8. Toxicidad de los 5 contaminantes emergentes sobre <i>Lemna minor</i>	22
Tabla 9. Valores NOEC y EC ₅₀ para <i>L. minor</i>	24
Tabla 10. Toxicidad de los 5 contaminantes emergentes sobre <i>D. magna</i> tras 24 h de exposición	26
Tabla 11. Valores NOEC, EC ₅₀ , LID y MID para <i>D. magna</i> tras 24h de exposición.	27
Tabla 12. Toxicidad de los 5 contaminantes emergentes sobre <i>D. magna</i> tras 48 h de exposición	28
Tabla 13. Valores NOEC y EC ₅₀ para <i>D. magna</i> tras 48 h de exposición	28
Tabla 14. Variación del peso en el ensayo crónico con <i>E. fetida</i>	29
Tabla 15. Número de huevos puestos en el ensayo de toxicidad crónico con <i>E. fetida</i>	31
Tabla 16. Actividad estrogénica de los cinco contaminantes según el ensayo RYA.....	33
Tabla 17. Datos toxicológicos de los ensayos utilizados para calcular el PNEC.	34
Tabla 18. Cociente PEC/PNEC de los cinco contaminantes ensayados para su evaluación medioambiental.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de las placas multipocillo con las diluciones de uno de los compuestos para el ensayo de <i>Lemna minor</i> , donde CC corresponde a las columnas control con el medio Steinberg sin el contaminante	11
Figura 2. Fotos de uno de los pocillos control del ensayo de <i>Lemna minor</i> , a las 24, 48 y 96 horas, donde se pueden contar 6, 10 y 15 frondas, respectivamente	12
Figura 3. Huevo de <i>Eisenia fetida</i> encontrado en el recuento realizado a los 28 días	15
Figura 4. Esquema del ensayo de repulsión para <i>Eisenia fetida</i> , donde A es la mitad del sustrato que contiene el compuesto a ensayar y B es la mitad con el sustrato control con agua destilada	16
Figura 5. Organización del contenido de la placa multipocillo usada en el ensayo RYA, mostrando las diluciones del compuesto a ensayar y los diferentes controles.	19
Figura 6. Representación de la tasa de crecimiento de <i>Lemna minor</i> expuesta a clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina, a diferentes concentraciones y al control con respecto al tiempo	24
Figura 7. Representación de la tasa de crecimiento de <i>Lemna minor</i> calculada según el número de frondas frente al factor de dilución de cada uno de los cinco contaminantes ensayados. La línea negra discontinua indica el valor medio de las muestras control.....	25
Figura 8. Evolución de la variación del peso de las lombrices a lo largo del ensayo.	30
Figura 9. Ensayo repulsión-atracción con <i>E. fetida</i>	32

ÍNDICE DE SIGLAS

AhR: receptor de hidrocarburos de arilo.

AINE: medicamento antiinflamatorio no esteroideo.

ANOVA: análisis de la varianza.

A_{rel}: actividad relativa.

ASTM: *American Society for Testing and Materials*.

CVF: clorfenvinfos.

DCF: diclofenaco.

DMA: Directiva Marco del Agua.

DO: densidad óptica.

E1: estrona.

E2: 17 β -estradiol

EC₅₀: concentración que da lugar a un 50% de efecto.

EEQ: equivalentes de E2

E-PRTR: Registro Europeo de Emisiones y Transferencia de Contaminantes.

ER: Receptor alfa de estrógenos humano.

ETSIAMN: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.

IARC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Kd: constante de disociación,

Kd_{app}: Kd aparente.

LC₅₀: concentración que da lugar a un 50% de mortalidad.

LID: mínima dilución sin efecto.

MCF-7: células de cáncer de mama humano que proliferan en presencia de estrógenos.

MID: dilución que da lugar a un 50% de efecto.

NCA-MA: valor medio anual de las normas de calidad ambiental.

NIH: Instituto Nacional de la Salud.

NOEC: concentración máxima de las ensayadas a la que no se produce ningún efecto observable o sus efectos no son significativamente diferentes a los observados en el control.

NR: porcentaje de respuesta neta.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCF: pentaclorofenol.

PEC: concentración esperada ambiental.

PFO: sulfonato de perfluorooctano.

PFOA: ácido perfluorooctanoico.

PNEC: concentración prevista sin efecto.

r: tasa de crecimiento.

REACH: Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas.

RL: complejo ligando - receptor.

Rt: cantidad de receptor total.

RYA: *Recombinant Yeast Assay*.

SD: desviación estándar.

TBT: terbutrina.

US EPA: Agencia de Protección del Medio Ambiente (Estados Unidos).

YPD: *Yeast Peptone Dextrose*.

YPER: *Yeast Protein Extraction Reagent*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El problema de la contaminación del agua

El agua es un recurso esencial para la vida, pero no es un recurso ilimitado, de hecho hay una gran parte de la población mundial que carece de acceso a agua potable, un 9 % según el Programa de Monitoreo Conjunto entre la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Unicef presentado en 2015 (OMS, 2015). Además, hay que tener en cuenta que la escasez de agua se puede ver acentuada por efectos climáticos, como puede ser la sequía que hubo en España entre 2003 y 2005 donde las precipitaciones fueron inferiores a la media de los diez años anteriores, afectando a las reservas de agua de los embalses, siendo un tipo de situación que se podría volver frecuente, entre otras cosas, por el calentamiento global que sufre el planeta. Si a estos factores le sumamos el continuo desarrollo de la civilización, caracterizado por un uso creciente de los productos químicos en actividades urbanas, industriales y agrícolas, llegamos a la conclusión de que el problema de la contaminación de las aguas es un tema de preocupación mundial que ha de ser abordado.

La contaminación química de las aguas derivada de la acción del hombre provoca efectos de toxicidad crónica y aguda en organismos acuáticos, pérdida de hábitats y de diversidad y compromete la salud humana. En la Unión Europea hay más de 100.000 productos químicos registrados y, alrededor de 300 millones de toneladas de compuestos sintéticos son usados tanto por la industria como por los consumidores particulares, parte de ellos acabando en nichos acuáticos. La mayor fuente de contaminación proviene de las aguas residuales vertidas sin haber eliminado completamente los contaminantes orgánicos, pese a que generalmente son tratadas en estaciones de depuración de aguas residuales, ya que la complejidad estructural de ciertos compuestos no permite su degradación por los métodos convencionales y acaban apareciendo en sus efluentes. Otra fuente de contaminación sería la proveniente de la actividad agrícola, donde más de 140 millones de toneladas de fertilizantes y muchos millones de toneladas de plaguicidas son usados al año, y parte de ellos acaban en las aguas por filtraciones y escorrentías (Schriks *et al.*, 2010).

Para combatir la emisión de contaminantes y el empobrecimiento de la calidad de los recursos hídricos, se ha ido construyendo una legislación para protegerlos. Un ejemplo sería el reglamento REACH en la Unión Europea que entró en vigor en 2006, que regula la fabricación y comercialización de sustancias y mezclas químicas, de forma que las empresas deben identificar y gestionar los riesgos que suponen para usarlas de manera segura. En el mismo año también se creó el Registro Europeo de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (E-PRTR), que como su nombre indica, establece ese tipo de registro a nivel comunitario en bases electrónicas facilitadas (Banjac *et al.*, 2015).

Si hablamos exclusivamente de la contaminación de los ambientes acuáticos, destaca la Directiva Marco del Agua (DMA), aprobada por el Parlamento Europeo en el año 2000, la cual ha ido experimentando revisiones para un mejor funcionamiento. En la primera directiva, Directiva 2000/60/CE, se propone la identificación de sustancias prioritarias que suponen un riesgo significativo para la Unión, en la Directiva 2008/105/CE se establecen normas de calidad ambiental para las 33 sustancias prioritarias identificadas, y en la Directiva 2013/39/UE se amplía esta lista a 45 (Banjac *et al.*, 2015). Fuera de la Unión Europea también hay organizaciones que abogan por la protección de los recursos hídricos, como serían la OMS y la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (US EPA), con más de 125 valores reglamentarios para contaminantes en agua potable, por ejemplo (Schriks *et al.*, 2010).

Toda esta legislación requiere del continuo estudio de las emisiones, la concentración ambiental y la detección de contaminantes ya identificados y por identificar, que puedan suponer un riesgo para los animales, personas y medio ambiente.

1.2. Contaminantes emergentes

Dentro de los contaminantes químicos hay un grupo que suscita especial interés, los conocidos como contaminantes emergentes. Estos se caracterizan porque su importancia ambiental ha sido recientemente tenida en cuenta, ya sea porque son compuestos químicos sintetizados recientemente, porque derivan de cambios en el uso y/o la distribución de contaminantes ya existentes o porque, aunque lleven tiempo presentes en el medio ambiente, no podían ser detectados con las técnicas analíticas disponibles en ese momento (Stuart *et al.*, 2012).

Todas las familias de compuestos que forman este grupo tienen en común su incursión generalizada en el medio ambiente, la falta de información disponible sobre sus efectos a medio y largo plazo, tanto sobre la salud humana como sobre los ecosistemas, y la pobre cobertura de los mismos en la regulación y legislación actual (Banjac *et al.*, 2015). Debido a esto, el estudio de estos compuestos, así como su distribución en el medio, es una prioridad en la investigación científica.

Encontramos muchos tipos diferentes de compuestos químicos dentro de los contaminantes emergentes. Un primer grupo son los plaguicidas, que pese a haber sido prohibidos algunos de los que suponían un mayor riesgo medioambiental, los nuevos que los han sustituido también se vio que dan problemas una vez las técnicas analíticas mejoraron. Otro tipo son los productos farmacéuticos, ya sea con o sin prescripción, de uso humano o veterinario, o drogas de abuso, que llegan a las aguas a través de la excreción de las personas y animales que los consumen. También entrarían productos de la vida, como la cafeína, y productos de cuidado personal como la pasta de dientes o la crema solar, que llegan al agua a través de las aguas residuales urbanas. De gran importancia son los compuestos orgánicos industriales, que aunque muchos ya sean contaminantes prioritarios bien estudiados, muchos de sus subproductos o productos de degradación pueden ser considerados emergentes, como serían los derivados del benzotriazol, que aparecen en medicamentos antifúngicos y antibacterianos, entre otros. Otro grupo importante serían los agentes tensioactivos, que han sido usados durante décadas en varias aplicaciones, como el sulfonato de perfluorooctano (PFO) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Por último, también nombrar las hormonas sintéticas como la estrona (E1) o el 17 β -estradiol (E2), que son los mayores contribuidores a la actividad estrogénica y cambios en efectos fisiológicos en los organismos a través de las aguas residuales (Stuart *et al.*, 2012).

En estudios publicados sobre la presencia de estos contaminantes en los ríos (Banjac *et al.*, 2015), se ha visto que los compuestos industriales son los dominantes en cuanto a emisiones se refiere, en un nivel aproximado de 10³ mg por habitante y día, estando los productos farmacéuticos o de cuidado personal una magnitud por debajo. Estos compuestos se mueven entre concentraciones de ng/L y μ g/L, por lo que también son conocidos como microcontaminantes, lo cual no quita que muchos de ellos puedan seguir mostrando efectos nocivos sobre la salud humana y sobre la fauna y flora que habite en las zonas contaminadas.

1.3. Bioensayos de toxicidad como herramienta para la evaluación de efectos

La evaluación de la contaminación de los ambientes acuáticos ha sido durante mucho tiempo realizada a través de análisis químicos específicos, pero con los años se ha visto que éste no resulta el método más adecuado, y es que con estas técnicas analíticas no se puede abordar la toxicidad de mezclas complejas y no se tiene en cuenta la biodisponibilidad de los contaminantes ensayados. Estas complicaciones son superadas al utilizar los bioensayos, que sirven como medida de la toxicidad biodisponible en las combinaciones de contaminantes presentes en el medio (Bierkens *et al.*, 1998).

No obstante, con los bioensayos estamos midiendo una respuesta biológica, con lo que un solo organismo no puede actuar como modelo para determinar la toxicidad en un medio, se han de realizar una batería de bioensayos con diferentes organismos representativos de los niveles tróficos presentes en el entorno para reducir la variabilidad y la incertidumbre y llegar a una correcta evaluación, tanto a largo (ensayos crónicos) como a corto plazo (ensayos agudos) (Oller *et al.*, 2011).

Los organismos acuáticos empleados en los bioensayos se pueden dividir en microorganismos, plantas y algas, invertebrados y peces (Rizzo, 2011) El organismo más utilizado para la evaluación de aguas y efluentes de aguas residuales es el invertebrado *Daphnia magna*, un consumidor primario, con ensayos tanto agudos como crónicos, gracias a características como una amplia sensibilidad a tóxicos, un ciclo reproductivo corto y una reproducción partenogenética. Otros organismos ampliamente usados son los productores primarios, algas y plantas, encontrando un ejemplo en la planta acuática *Lemna minor*, distribuida mundialmente en medios de agua dulce y siendo de crecimiento rápido, pequeño y manejable tamaño y fácil cultivo (Singh y Singh, 2006). Diferentes especies de peces, los consumidores secundarios, también han sido empleadas repetidamente, como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), para evaluar el riesgo en especies similares del medio, pese a mostrar problemas como un mayor tiempo de trabajo y disponer del equipamiento necesario. Por último, en cuanto a los microorganismos, existe una gran variedad de ensayos realizados, como por ejemplo usando microorganismos luminiscentes, entre los cuales destaca la bacteria marina *Vibrio fischerii*, cuya luminiscencia varía dependiendo de la toxicidad a la que es expuesta (Rizzo, 2011).

Hemos hablado de los bioensayos para determinar la contaminación de ambientes acuáticos, pero hay otros organismos diferentes que se emplean para determinar el grado de toxicidad de otros medios como los suelos. Un ejemplo de estos es la lombriz de tierra, siendo *Eisenia fetida* la especie más usada. Las lombrices representan entre el 60-80% de toda la biomasa animal en los suelos, y la ausencia de una gruesa cutícula exterior las hace susceptibles a las sustancias químicas presentes, resultando un buen bioindicador (Wang *et al.*, 2012).

Otro bioensayo que sería interesante comentar es el ensayo de levadura recombinante (RYA), en el cual una levadura genéticamente modificada, como *Saccharomyces cerevisiae*, es utilizada como bioindicador de la actividad disruptora endocrina de un compuesto o mezcla de ellos. Los disruptores endocrinos son compuestos que mimetizan o antagonizan las acciones de las hormonas, afectando a la salud de humanos y otras especies mediante la alteración de su función endocrina, influyendo sobre la homeostasis, crecimiento, reproducción y comportamiento de los organismos (Céspedes *et al.*, 2004). Hay una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos que funcionan como disruptores endocrinos, muchos de ellos contaminantes emergentes, que debido a sus efectos, distribución global y potencial para la bioacumulación, han captado el interés de la comunidad científica.

Este ensayo se realiza con una levadura modificada que tiene la expresión de un gen reportero, como el que codifica la enzima β -galactosidasa, condicionada a la activación de un receptor humano de estrógenos que se le ha hecho expresar, de manera que cuando una sustancia que muestra actividad estrogénica se une al receptor, se expresa el enzima y éste da una reacción cuantificable, por ejemplo mediante un sustrato quimioluminiscente, colorimétrico o fluorescente (Roda *et al.*, 2006). El RYA también se puede realizar con otras cepas que contengan un receptor diferente, como las que contienen el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), encargadas de detectar compuestos denominados *dioxin-like*, los cuáles son los iniciadores de vías de señalización tóxicas que dan lugar a disfunciones inmunes, disrupciones endocrinas y carcinogénesis, entre otros efectos (Miller, 1999).

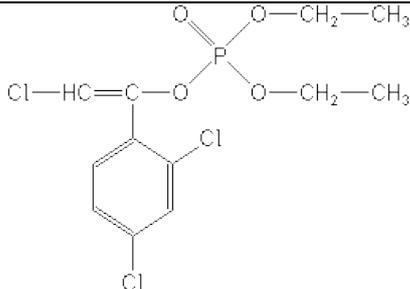
1.4. Compuestos ensayados

Destacamos a continuación las principales características de los compuestos considerados en el presente trabajo de investigación.

1.4.1. Clorfenvinfos

Es un insecticida organofosforado, usado en agricultura, en veterinaria para tratar enfermedades ectoparasitarias, como repelentes y para uso doméstico (Hartnik y Styrihave, 2008). Su modo de acción se basa en la inhibición del enzima acetilcolinesterasa, el cual juega un papel fundamental en la transmisión del impulso nervioso, dando lugar a una hiperactivación muscular (Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007). La Tabla 1 recoge alguna característica química de este compuesto.

Tabla 1. Propiedades químicas del clorfenvinfos.

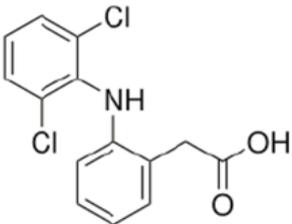
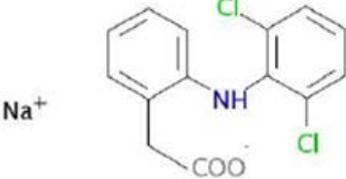
Nomenclatura IUPAC	(EZ)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil) vinil dietil fosfato
Clase química	Compuesto organofosforado
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P
Peso molecular	359,56 g/mol
Estructura molecular	

No solo resultan contaminados los suelos agrícolas en los que se aplica, ya que por filtración y escorrentías puede llegar a contaminar el agua, llegando a detectarse, por ejemplo, en cuencas hidrológicas cercanas a zonas agrícolas portuguesas, donde se halló en concentraciones de entre 0,02 y 31,6 µg/L. El clorfenvinfos muestra toxicidad contra organismos como invertebrados acuáticos o peces, así como también supone un riesgo para la salud humana, y ha llegado a ser clasificado como una sustancia de prioridad por la Unión Europea en su política de aguas en 2001 y como ingrediente activo altamente peligroso por la Organización Mundial de la Salud en 2004 (Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007).

1.4.2. Diclofenaco

El diclofenaco es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ampliamente usado para el tratamiento de la inflamación y el dolor, siendo ingrediente activo de muchos fármacos bajo diferentes nombres comerciales, pudiendo consumirse vía oral o en uso tópico, entre otras formas. Es posible acceder a éste con o sin receta, usándose tanto en humanos como en animales, resultando en un consumo global aproximado de más de 1.000 toneladas al año (Memmert *et al.*, 2013). Algunas de sus características químicas son mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades químicas del diclofenaco.

Nomenclatura IUPAC	Ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acético
Clase química	Derivado fenilacético
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₁ NC ₂ O ₂
Peso molecular	296,148 g/mol
Estructura molecular	
Estructura molecular de la sal que forma con el sodio	

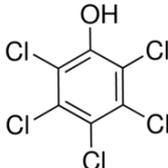
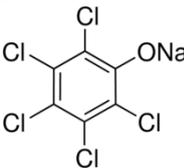
Medicamentos como este pueden acabar contaminando diferentes ambientes acuáticos, como en el caso del diclofenaco, que ha sido detectado tanto en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales como en ríos y lagos de diferentes países, como Alemania o China, en una escala desde ng/L a unos pocos µg/L (Memmert *et al.*, 2013). Diferentes estudios han demostrado su efecto tóxico en algas, peces e invertebrados marinos, demostrándose además que su uso veterinario fue el causante de una gran bajada de la población de buitres en el sudeste asiático (Liu *et al.*, 2017).

1.4.3. Pentaclorofenol

El pentaclorofenol (PCF) es un tipo de clorofenol, los cuales se encuentran distribuidos globalmente tanto en aguas superficiales, agua potable y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales debido a su uso industrial y agrícola como plaguicida y conservante de madera, entre otros. Teniendo en cuenta su resistencia a la degradación, su toxicidad para la vida acuática, su riesgo para la salud humana y su potencial de bioacumulación, son considerados contaminantes persistentes prioritarios en Europa, China y Estados Unidos (Xing *et al.*, 2012). Algunas de sus características químicas aparecen en la Tabla 3.

El PCF ha sido clasificado como un carcinógeno del grupo 2B por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC). Debido a todo esto, hubo una restricción global en su producción y uso, bajando los niveles de contaminación. No obstante, en China los niveles han aumentado debido a la reaparición de epidemias de esquistosomiasis, ya que el PCF es el principal agente usado para combatirla, junto a la sal que forma con el sodio, acabando con los caracoles portadores del parásito. En este país se han detectado niveles medios de 50 ng/L en sus aguas superficiales, siendo el mayor punto de poco más de 100 µg/L; en suelos se han detectado niveles de entre decenas de ng/kg y decenas de µg/kg (Zheng *et al.*, 2012).

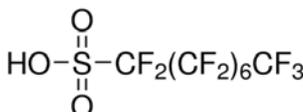
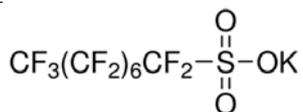
Tabla 3. Propiedades químicas del pentaclorofenol.

Nomenclatura IUPAC	2,3,4,5,6-Pentaclorofenol
Clase química	Clorofenol
Fórmula molecular	C ₆ Cl ₅ OH
Peso molecular	266,34 g/mol
Estructura molecular	
Estructura molecular de la sal que forma con el sodio	

1.4.4. PFO

El sulfanato de perfluorooctano (PFO) es un tensioactivo perfluorado que ha sido fabricado desde los años 50 y cuenta con diversos usos, como productos de limpieza, industria textil, cosméticos o espuma para la extinción de incendios, entre otros (Jin *et al.*, 2009). Este compuesto tiene características hidrofóbicas y lipofóbicas y una gran estabilidad térmica, biológica y química, en parte gracias a la fuerza de sus enlaces carbono-flúor, debido a lo cual resiste la degradación biótica y abiótica, acumulándose en el ambiente y en los organismos vivos (Boudreau *et al.*, 2003a). En la Tabla 4 aparecen sus características químicas.

Tabla 4. Propiedades químicas del PFO.

Nomenclatura IUPAC	Ácido 1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-heptadecafluoro-1-octanosulfónico
Clase química	Ácido perfluoroalquilo
Fórmula molecular	CF ₃ (CF ₂) ₇ SO ₃ H
Peso molecular	500,13 g/mol
Estructura molecular	
Estructura molecular de la sal que forma con el potasio	

Todas estas particularidades han hecho que suba la preocupación entre la gente y se tomasen medidas. La empresa 3M Co., el mayor productor global de productos derivados del PFO, cesó la producción de éstos en 2002. Además, su uso ha sido regulado a unos pocos usos en la directiva europea 2006/122/EC y en el Anexo B de la Convención de Estocolmo de Contaminantes Orgánicos Persistentes.

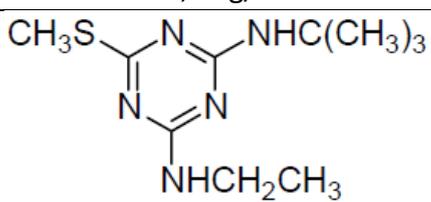
De hecho, se han detectado niveles de PFO tanto en aguas, tierras como seres vivos. En efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales se ha detectado a cientos de ng/L, en

aguas superficiales de zonas de alta población e industrializadas a unos pocos ng/L e incluso en fuentes de agua potable municipal al mismo nivel (Rosal *et al.*, 2010). También ha sido detectado en tierras donde se aplican lodos para la agricultura en unos 500 g/kg y en zonas de entrenamiento para incendios hasta 16 mg/kg. Se ha llegado a encontrar en el suero sanguíneo humano, también en el de la fauna silvestre y en el hígado, donde se acumula principalmente, y en organismos acuáticos (Lankadurai *et al.*, 2013).

1.4.5. Terbutrina

Pertenece al grupo de herbicidas de triazina, los cuáles actúan sobre la cadena de transporte de electrones para impedir la fotosíntesis, y son usados en la agricultura para el control de la maleza en una variedad de cultivos, como maíz, guisante o cereal (Quednow y Püttmann, 2007). No obstante, debido a la detección de la terbutrina en diferentes aguas y su potencial para la bioacumulación, en Europa se prohibió en 2003 su uso agrícola (Velisek, 2012). En la Tabla 5 aparece alguna de sus características químicas.

Tabla 5. Propiedades químicas de la terbutrina.

Nomenclatura IUPAC	N ² -tert-butil-N ⁴ -etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina
Clase química	Triazina
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S
Peso molecular	241,36 g/mol
Estructura molecular	

Pese a esto, su uso está permitido en otros ámbitos, como sería el control de algas en estanques de jardín o acuarios y como alguicida en pinturas, de forma que puede llegar a las plantas de tratamiento de aguas municipales a través de la filtración y el arrastre del agua, llegando a niveles medios de hasta 0,58 µg/L en algunos ríos alemanes. La terbutrina es ligeramente tóxico para la salud humana, pero muestra una toxicidad moderada para organismos acuáticos como peces, algas o zooplancton (Quednow y Püttmann, 2007).

1.5. Evaluación medioambiental

Para abordar la evaluación medioambiental de las sustancias químicas, la Unión Europea ha elaborado una serie de directivas basadas en la identificación del peligro y la valoración del riesgo. En la identificación del peligro se establece la clasificación y etiquetado de las sustancias en base a la toxicidad que muestran sobre los organismos ensayados y su capacidad para la degradación y para la bioacumulación. En la valoración del riesgo se estima la probabilidad de que la sustancia supere una cierta concentración en el medio de forma que resulte perjudicial para los organismos que lo habitan, para ello se calcula un cociente, entre la concentración esperada ambiental de la sustancia en estudio (PEC) y la concentración prevista sin efecto (PNEC). Los pasos a seguir para esta valoración están recogidos en la Directiva 93/67/EEC, constando de las siguientes fases (De la Torre *et al.*, 2005):

- **Evaluación de los efectos: estimación de la dosis-respuesta.** El objetivo de esta fase es hallar el valor PNEC (Concentración Prevista Sin Efecto), el cual pretende poner un límite a partir

del cual la concentración supone un riesgo para los organismos presentes en el medio. Para ello, se realizarán una serie de bioensayos en diferentes organismos, tanto agudos como crónicos. En los primeros, el efecto producido por la sustancia se cuantificará mediante el EC_{50} , es decir, la concentración a la cual el 50% de los individuos del ensayo mueren o ven inhibida alguna de sus funciones vitales, la cual se calcula interpolando en una curva concentración/efecto producido. En los ensayos crónicos se utiliza el NOEC, es decir, la concentración máxima ensayada en la que no se observa ningún efecto, o el EC_{10} .

El siguiente paso es calcular el valor PNEC, el cual se calcula para diferentes grupos de organismos, como organismos acuáticos u organismos del suelo, por ejemplo. Se selecciona el dato de toxicidad más sensible dentro del grupo de organismos elegido y se divide entre un factor de valoración tabulado, el cual será más pequeño conforme más información hayamos recopilado en forma de más bioensayos, teniendo así un margen de seguridad ante los posibles efectos no cubiertos en nuestros experimentos.

- **Estimación de la exposición.** El siguiente paso es calcular el PEC (Concentración Prevista en el Medio), es decir, la estimación de la concentración de la sustancia a evaluar en el medio. Para ello se siguen unos modelos que tienen en cuenta la producción y el uso de la sustancia, sus propiedades físico-químicas como su resistencia a diferentes tipos de degradaciones y los datos disponibles de su presencia en el medio. Este se calcula por separado para diferentes niveles, como el PEC del agua o el PEC del suelo.

- **Cuantificación del riesgo.** Por último, se calcula el cociente PEC/PNEC para evaluar el riesgo que supone la sustancia. Si el cociente es igual o menor que 1, la sustancia supone un riesgo bajo, pero si es mayor, supondrá un riesgo más alto conforme más grande sea el resultado.

2. OBJETIVOS

Durante la introducción se ha expuesto el problema que supone la contaminación de las aguas para el medio ambiente y para las especies que lo habitan, habiendo destacado el papel de los contaminantes emergentes debido a la falta de información disponible sobre sus efectos a medio y largo plazo. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo son:

1. Determinar la toxicidad de cinco contaminantes emergentes contenidos en la Directiva 2013/39/CE mediante la realización de una batería de bioensayos que incluyen a los organismos *Daphnia magna*, *Lemna minor* y *Eisenia fetida*.
2. Determinar la toxicidad de la mezcla de los cinco contaminantes para detectar si se producen efectos sinérgicos mediante la realización de una batería de bioensayos que incluyen a los organismos *Daphnia magna* y *Eisenia fetida*.
3. Determinar la actividad estrogénica de los cinco contaminantes mediante la realización del ensayo RYA (*Recombinant Yeast Assay*) con una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BY4741).
4. Realizar una evaluación de riesgos ambientales de los cinco contaminantes mediante el cálculo del cociente PEC/PNEC, según la Directiva 93/67/EEC.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se detallan los materiales y metodología empleados en este trabajo, el cual ha sido realizado en su totalidad en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN), situado en la Universidad Politécnica de Valencia.

3.1. Compuestos de ensayo

Los diferentes ensayos de toxicidad se han llevado a cabo con 5 compuestos químicos, catalogados como contaminantes emergentes y que se encuentran en la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de política de aguas según la Directiva 2013/39/UE de la Unión Europea, con excepción del diclofenaco, que se encuentra en la lista de observación en espera a que se realicen las mediciones necesarias. Estos son: Clorfenvinfos (CVF, 97,1%), Diclofenaco (DCF, en forma de sal de sodio), Pentaclorofenol (PCF, 97%), Sulfonato de perfluorooctano (PFO, 98% en forma de sal de potasio) y Terbutrina (TBT, 99,1%), todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid). A partir de ellos se han preparado disoluciones en agua o en su caso, en el medio de ensayo.

3.2. Ensayos de toxicidad

3.2.1. Ensayo de inhibición de crecimiento en *Lemna minor*

El ensayo se ha llevado a cabo en base al protocolo normalizado UNE-EN-ISO 200079.

3.2.1.1. Metodología

El objetivo de este ensayo es cuantificar los efectos de los compuestos mencionados sobre el crecimiento de la planta acuática de la especie *Lemna minor* durante 7 días de exposición mediante la medida de dos parámetros: superficie de las frondas (estructura en forma de hoja de las colonias de *Lemna*) y, número de frondas, a partir de los cuáles se calcula la tasa de crecimiento (r). Comparando las tasas de crecimiento de las distintas concentraciones de ensayo con las obtenidas por el control, se obtienen los porcentajes de inhibición del crecimiento para cada concentración y compuesto ensayado

El medio de cultivo usado para mantener las plantas en el laboratorio a temperatura ambiente, así como el ensayo y la preparación de las distintas concentraciones de los compuestos se denomina medio Steinberg modificado, el cual se prepara realizando 8 soluciones madre distintas (Tabla 6) las cuáles han de ser esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, de forma que el medio final se prepara añadiendo 20 mL de las soluciones 1, 2 y 3, y 1 mL de las soluciones 4, 5, 6, 7 y 8, rellenando hasta 1000 mL con agua destilada estéril y ajustando el pH a $5,5 \pm 0,2$.

Se preparan diluciones seriadas de los cinco compuestos a ensayar, clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina, siendo la de mayor concentración de 100 mg/L, 0,5 mg/L, 5 mg/L, 500 mg/L, y 100 mg/L respectivamente, dando lugar a la 1:1, a partir de la cual se obtienen la dilución 1:2, 1:4, y así sucesivamente hasta la dilución 1:256. Estas diluciones son realizadas en el medio de Steinberg nombrado.

Tabla 6. Composición de las soluciones madre del medio Steinberg modificado.

Macroelementos	g/L
<i>Solución madre 1</i>	
KNO ₃	17,5
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<i>Solución madre 2</i>	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,0
<i>Solución madre 3</i>	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75
Microelementos	mg/L
<i>Solución madre 4</i>	
H ₃ BO ₃	120,0
<i>Solución madre 5</i>	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,0
<i>Solución madre 6</i>	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,0
<i>Solución madre 7</i>	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0
<i>Solución madre 8</i>	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,0
AEDT disódico dihidrato	1500,0

El ensayo se lleva a cabo en una placa de 12 pocillos (Nunclon™ Delta), que se rellenan con 3 mL de las distintas diluciones del compuesto a ensayar por triplicado. A cada pocillo se le añade tres pares de frondas. Al mismo tiempo se realizan pocillos control conteniendo la planta y el medio de ensayo (Figura 1).

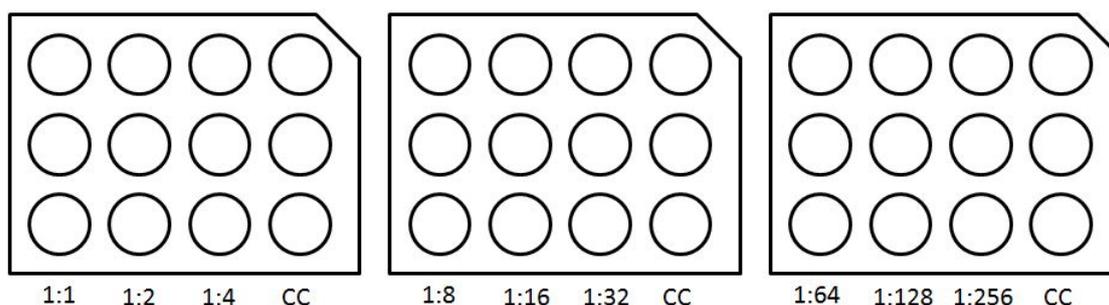


Figura 1. Esquema representativo de las placas multipocillo con las diluciones de uno de los compuestos para el ensayo de *L. minor*, donde CC corresponde a las columnas control con el medio Steinberg sin el contaminante.

Una vez depositadas las frondas, las placas se incuban en una cámara climatizada modelo LMS (Sanyo Versatile Environmental Test Chamber modelo MLR-350) a una temperatura de 24 ± 2 °C y bajo una iluminación constante gracias a la acción de 4 tubos fluorescentes de 8 W, a 20-25 cm de distancia, 3000-4000 lux. El ensayo dura 96h.

Para cuantificar el efecto sobre el crecimiento de la planta se toman fotografías al inicio del ensayo y cada 24 horas, mediante una cámara fotográfica (MOTICAM 1000, con una

resolución de 1,3 MP) acoplada al objetivo de un microscopio estereoscópico (MOTIC). Las fotografías se toman sobre un fondo blanco, con una iluminación uniforme y manteniendo la misma distancia con la cámara, para después poder realizar la medida de la superficie de las frondas con un analizador de imagen (ImageJ, de dominio público, desarrollado por Wayne Rasband del Instituto Nacional de la Salud, NIH). Además el número de frondas ha sido contado manualmente a partir de dichas fotos cada 48 horas (Figura 2).



Figura 2. Fotos de uno de los pocillos control del ensayo de *L. minor*, a las 24, 48 y 96 horas, donde se pueden contar 6, 10 y 15 frondas, respectivamente.

3.2.1.2. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos de los parámetros estudiados han de ser transformados en porcentaje de inhibición para poder analizarlos, para lo cual usaremos distintas ecuaciones. En primer lugar se calcula la **tasa de crecimiento (r)** a partir de la ecuación (1)

$$r = \frac{\ln x_{t_2} - \ln x_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Donde:

r es la tasa de crecimiento diaria;

x_{t_1} es el valor del parámetro de observación en el día t_1 ;

$t_2 - t_1$ es el período de tiempo entre x_{t_1} y x_{t_2} en días.

Una vez obtenidas las tasas de crecimiento, se elaboran las curvas de crecimiento de tasa vs tiempo y se calcula el área bajo ellas con la ecuación (2).

$$A = \frac{Nr_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{(n-1)} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{(n-1)}) \quad (2)$$

Donde:

A es el área bajo la curva de crecimiento;

N_0 es la tasa de crecimiento a un tiempo t_0 ;

N_1 es la tasa de crecimiento a un tiempo t_1 ;

N_n es la tasa de crecimiento medidas a un tiempo t_n (en horas);

t_1 es el tiempo de la primera medida tras el comienzo del ensayo (en horas);

t_n es el tiempo de la medida enésima tras el comienzo del ensayo.

Finalmente, se obtiene el porcentaje de inhibición ecuación (3):

$$I_A = \frac{A_C - A_t}{A_C} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

I_A es el porcentaje de inhibición de una dilución determinada;

A_C es el área bajo la curva de crecimiento del control;

A_t es el área bajo la curva de crecimiento de la dilución.

Con los datos de los porcentajes de inhibición se realiza un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico Statgraphics Plus (versión 5.1) con el fin de determinar las diferencias significativas entre las distintas diluciones ensayadas y el control para cada compuesto y calcular el valor NOEC (concentración máxima de las ensayadas a la que no se produce ningún efecto observable o sus efectos no son significativamente diferentes a los observados en el control). También se obtendrán los valores EC_{50} (la concentración del compuesto que da lugar a un 50% del efecto, en este caso inhibición de crecimiento) a partir de un análisis Probit realizado con el programa estadístico SPSS (versión 16.0).

3.2.2. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

3.2.2.1. Metodología

El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de los 5 compuestos y la mezcla de éstos sobre la movilidad del cladócer *Daphnia magna* Strauss, siguiendo el protocolo normalizado expuesto en UNE-EN ISO 6341.

Para ello, se utilizan individuos de menos de 24 horas obtenidos a partir de la eclosión de efipias (huevos latentes o huevos enquistados), suministradas por EcoTest S.L. (Valencia), lo cual se realiza siguiendo las instrucciones del ensayo para ecotoxicidad DaphToxKit F TM, según la Directiva 84/449 de la CE.

Las efipias son suministradas en viales; cuatro días antes del ensayo las efipias son vaciadas sobre un tamiz, lavándolas con agua corriente para posteriormente transferirlas a una placa Petri de unos 10 cm de diámetro con unos 10 mL de medio de reconstitución (Tabla 7). Después se colocan en la cámara climatizada modelo LMS (Sanyo Versatile Environmental Test Chamber modelo MLR-350) a una temperatura de 22 °C, bajo iluminación constante, 3000-4000 lux, 3 a 4 tubos fluorescentes de 8 W a unos 20-25 cm de distancia, durante 3-4 días.

Tabla 7. Composición del medio de reconstitución usado durante el ensayo de *D. magna*.

Componentes	g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,76
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,93
NaHCO ₃	2,59
KCl	0,23

Las diferentes concentraciones de los compuestos se realizan en este mismo medio, el cuál ha de cumplir las siguientes características: pH $7,8 \pm 0,2$, dureza total de 250 ± 25 mg/L (expresados en CaCO₃), concentración de oxígeno disuelto mayor de 7 mg/L y temperatura de 22 ± 1 °C.

El ensayo tiene lugar en placas Petri de plástico de 5 cm de diámetro conteniendo 10 mL de la sustancia en estudio preparada a diferentes concentraciones, por triplicado. Así mismo se preparan placas control conteniendo el medio de ensayo.

A cada placa se transfieren 5 dafnias que provienen de las denominadas “placas de lavado” que contienen la sustancia a ensayar a diferentes concentraciones, evitando de esta manera errores por dilución en las placas donde se hace el ensayo definitivo.

Las placas se incuban a 22 °C, en oscuridad y sin alimento, comprobando a las 24 y a las 48 horas el número de individuos inmóviles (individuos que no se mueven durante 15 segundos después de una breve agitación de la placa).

Para cada uno de los compuestos se probaron diluciones desde la 1:1 hasta la 1:64, siendo la concentración más alta de las ensayadas de 10 µg/L, 50 mg/L, 10 mg/L, 500 mg/L y 40 mg/L, para el clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina, respectivamente. La mezcla, de la cual se ensayan cuatro réplicas, contiene los 5 compuestos a 1 mg/L cada uno y el control está formado únicamente por el medio de reconstitución.

3.2.2.2. Análisis de resultados

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición de movimiento, éstos son utilizados para calcular los valores EC₅₀ realizando un análisis Probit con el programa estadístico SPSS (versión 16.0).

Estos datos también son utilizados para calcular el NOEC, realizando esta vez un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico Statgraphics Plus (versión 5.1).

3.2.3. Ensayo de toxicidad crónica en *Eisenia fetida*

3.2.3.1. Metodología

El objetivo de este ensayo es comprobar el efecto de los compuestos puros y su mezcla sobre la reproducción, mortalidad y crecimiento de la lombriz de tierra al estar presentes en su sustrato durante 28 días. El ensayo se realiza de acuerdo a la normativa UNE-ISO 11268-2.

La composición del sustrato es la misma que la utilizada en el ensayo de repulsión, la recomendada en el protocolo E1676-95 ASTM. Las lombrices usadas han de tener al menos dos meses de edad, presencia de clitelo y un peso de entre 200 y 600 mg.

El sustrato se coloca en los mismos recipientes cilíndricos de cristal, conteniendo esta vez 500 g del sustrato que ha sido humedecido con 200 mL de la disolución que contiene el compuesto a ensayar.

Primero se realizó un ensayo preliminar en el que se preparó un recipiente por compuesto (40 mg/kg, 30 mg/kg, 15 mg/kg, 100 mg/kg y 60 mg/kg para el clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina, respectivamente) y un recipiente control solo con agua destilada. En base a los resultados obtenidos en éste se decidieron las concentraciones del ensayo definitivo, en que cada compuesto tenía 3 réplicas, se prepararon 3 controles y 3 réplicas de la mezcla de los compuestos, utilizados a la misma concentración que en el pre-ensayo menos el PFO y la terbutrina que se ensayaron a 75 y a 30 mg/kg, respectivamente.

Las lombrices, previamente purgadas durante 24 horas en un papel de filtro humidificado con agua destilada en placa Petri, se pesan antes de comenzar el ensayo. Se colocan 10 lombrices por recipiente y se tiene en cuenta el tiempo que tardan en entrar en el sustrato como un indicador más de la toxicidad del medio. Las lombrices son alimentadas durante el ensayo con estiércol de conejo. Los recipientes son cubiertos con film transparente, agujereado con pequeños orificios (<1 mm), y se sella con una goma elástica. Los recipientes de ensayo se mantienen a 22 ± 1 °C y bajo iluminación continua de 400-800 lux en un ciclo 12 horas - 12

horas. Cada 7 días, las lombrices son extraídas del recipiente para ser pesadas y, en su caso, anotar si hay mortalidad. Las lombrices supervivientes se vuelven a colocar en su correspondiente recipiente y se les alimenta de nuevo antes de cubrir con el film. El último día de ensayo se cuenta el número de huevos puestos en cada recipiente (Figura 3).



Figura 3. Huevo de *E. fetida* encontrado en el recuento realizado a los 28 días.

3.2.3.2. Análisis de resultados

Los resultados se expresan como tasa de crecimiento (r) de cada semana respecto al día inicial, calculada a partir del peso de las lombrices según la ecuación 4:

$$r = \frac{\text{Peso}_{\text{semana } x} - \text{Peso}_{\text{inicial}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (4)$$

También se utilizan los datos del número de huevos puestos al final del ensayo, de forma que con ambos tipos de resultados se hacen dos análisis de varianza (ANOVA), con el programa estadístico Statgraphics Plus (versión 5.1), para comprobar si existe una diferencia significativa entre los contaminantes y los controles.

3.2.4. Ensayo de repulsión en *Eisenia fetida*

3.2.4.1. Metodología

El objetivo de este ensayo es determinar la repulsión que siente la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) hacia una tierra contaminada con los compuestos seleccionados por separado y su mezcla, gracias a su capacidad para poder huir de ésta desplazándose a un terreno sin contaminar o control, realizándolo en base a la norma ISO 17512-1 2008.

Se utilizan lombrices adultas con presencia de clitelo de al menos dos meses de edad y de un peso entre 200 y 300 mg, proporcionadas por la Universidad Politécnica de Valencia provenientes de los criaderos a cargo del Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. La composición del sustrato usado es la recomendada en el protocolo E1676-95 ASTM (American Society for Testing and Materials) que consiste en:

- 10% de turba rubia de un pH de 5,5-6, fina y sin restos visibles de plantas,
- 20% de arcilla de caolinita, con no menos de un 30% de caolinita,
- 69% de arena de cuarzo industrial con predominancia de arena fina y
- 1% de carbonato cálcico.

El ensayo se realiza en recipientes cilíndricos de cristal de 14 cm de diámetro y 6 cm de altura, los cuáles contendrán 500 g del sustrato, 250 de ellos con el compuesto a ensayar, separando ambas mitades con una lámina de plástico. El sustrato utilizado se humidifica con 100 mL de la preparación del compuesto o agua destilada, en el caso del control, para conseguir un 40% de humedad, amasando hasta conseguir una pasta uniforme.

Con el sustrato preparado y separado por la lámina de plástico, se añaden 10 lombrices en el centro del recipiente, las cuales han sido purgadas durante 24 horas sobre papel de filtro humidificado con agua destilada en placa Petri. Tras esperar a que las lombrices se introduzcan en el sustrato, los recipientes son tapados con film transparente y una goma elástica para impedir que escapen, realizando pequeños agujeros (<1 mm) que permitan el intercambio gaseoso. Tras 48 horas a una temperatura de 22 ± 1 °C e iluminación constante, se coloca de nuevo el separador en el mismo sitio y se realiza el recuento de las lombrices que se encuentran a cada lado. Se muestra un esquema del procedimiento en la Figura 4.

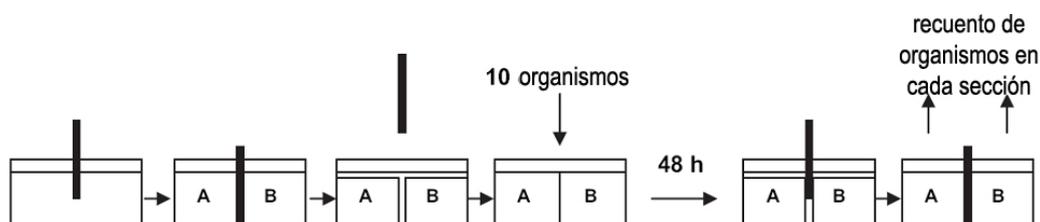


Figura 4. Esquema del ensayo de repulsión para *Eisenia fetida*, donde A es la mitad del sustrato que contiene el compuesto a ensayar y B es la mitad con el sustrato control con agua destilada.

Se preparan 3 recipientes por compuesto, otros 3 con su mezcla y 3 más en que ambas mitades sean control. La concentración utilizada es de 40 mg/kg, 30 mg/kg, 15 mg/kg, 75 mg/kg y 30 mg/kg para el clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina, respectivamente, usando también estos valores en la mezcla de compuestos.

3.2.4.2. Análisis de resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de respuesta neta, el cual se obtiene a partir de la ecuación (3):

$$NR = \left(\frac{C-T}{N} \right) \times 100 \quad (3)$$

Donde:

NR es el porcentaje de respuesta neta;

C es el número de lombrices en el lado control;

T es el número de lombrices en el lado tratado;

N es el número total de lombrices.

Si el valor de NR es positivo indica repulsión, si es negativo es que hay atracción por el compuesto y si es 0 es que no hay respuesta. Se realiza un análisis ANOVA para comprobar si los contaminantes ensayados son significativamente diferentes del control.

3.2.5. Ensayo RYA (*Recombinant Yeast Assay*) para la evaluación de la actividad estrogénica

El objetivo de este ensayo es comprobar la posible actividad estrogénica de los compuestos en estudio y de la mezcla. Para ello, se siguen los pasos detallados por García-Reyero *et al.* (2001).

3.2.5.1. Organismos de ensayo

Se utiliza una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, cepa BY4741 (cepa ER).

3.2.5.2. Preparación de medios de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo específico se han de preparar previamente una serie de suplementos. Se preparan disoluciones de glucosa (Sigma-Aldrich) al 40%, histidina (Sigma-Aldrich, riqueza $\geq 98\%$) al 1% y metionina (Sigma-Aldrich, riqueza $\geq 98\%$) al 1%, las cuáles son esterilizadas en autoclave (121°C, 15 min) y conservadas a 5-6 °C; la histidina además en oscuridad.

Otros medios de cultivo que se utilizan son medio enriquecido YPD y medio selectivo SD. Para el primero se disuelven 50 g de YPD (Yeast Peptone Dextrose, Difco) en 1 L de agua MilliQ, se reparte en tubos de ensayo a 1-2 mL por tubo y se esteriliza en autoclave (121 °C, 15 min). Si se quiere sólido se añade 20 g/L de Bacto Agar (Difco) antes de esterilizar y luego se reparte en placas Petri.

El medio selectivo SD (Synthetic Dextrose) se obtiene disolviendo 1,7 g de YNBAA/AS (Yeast Nitrogen Base, Difco) y 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 1 L de agua MilliQ. Se esteriliza en autoclave (121 °C, 15 min). Para adaptarlo a la cepa hay que añadir los suplementos, siempre en condiciones de asepsia, con lo que se añade 20 g/L de glucosa, 0,01 g/L de histidina y 0,01 g/L de metionina. Para hacerlo sólido se añade 20 g/L de Bacto Agar antes de esterilizar y luego se reparte en placas Petri.

3.2.5.3. Preparación de reactivos

- Tampón Z: está compuesto por 60 mM de Na_2HPO_4 (Scharlau), 40 mM de NaH_2PO_4 (Scharlau), 10 mM de KCl (Scharlau) y 1mM de MgSO_4 (Panreac), disueltos en agua MilliQ, debiendo ajustar el pH a 7.

- Sustrato MU-Gal: se prepara con 100 mL de Tampón Z, 1 mL de tritón x-100 (Fisher Chemical) al 10%, 1 mL de SDS (Fisher Chemical) al 10% y 21 mg de MU-gal (4-metilumbeliferil β -D-galactosidasa, Sigma-Aldrich) y se deja durante la noche en agitación a 35-38 °C en oscuridad. Al día siguiente se reparte a razón de 8 mL en tubos Falcon y se le añade β -mercaptoetanol a razón de 70 μL cada 100 mL de sustrato. Se conserva en oscuridad a -20 °C.

- Patrones: para la actividad estrogénica se usa una concentración 10 μM de la hormona 17 β -estradiol (E2), Sigma-Aldrich

Una vez preparados los medios y reactivos, se procede al cultivo de la levadura. Se parte de criocultivos a -80 °C que se siembran en placas con medio YPD, se incuban a 30 °C durante 24-48 horas para conseguir cultivos stock. Se parte de estos para sembrar placas con medio selectivo sólido que se incuban a 30 °C durante 24 horas.

Después de esto, se toma una colonia de cada placa y se incula en un tubo con medio YPD líquido, se incuba a 30 °C durante 17 horas en agitación suave. A continuación, se incula la cantidad necesaria en un matraz Erlenmeyer con 50 mL del medio selectivo de manera que tras su crecimiento a 30 °C durante otras 17 horas (agitación orbital a 150 rpm), se obtenga un cultivo

exponencial con una densidad óptica (DO) de 0,08-0,15 (medida a 600 nm). Si la DO se encuentra por debajo de este intervalo se puede dejar más tiempo en incubación y si se encuentra por encima se pueden realizar diluciones.

3.2.5.4. Procedimiento del ensayo

El ensayo se lleva a cabo en una placa multipocillo de polipropileno (NUNCTM, Thermo Scientific). La disposición de las columnas es la siguiente, mostrada también en la Figura 5:

- Columna 1: cultivo con el compuesto a ensayar.
- Columna 2-9: cultivo con 5% de metanol y diluciones seriadas del compuesto.
- Columna 10: control de toxicidad, con el cultivo, el patrón y el compuesto, para comprobar si la falta de actividad se puede deber a la toxicidad del compuesto.
- Columna 11: control positivo, con el cultivo y el patrón.
- Columna 12: control negativo, solo el cultivo.

Para cargar la placa se preparan dos soluciones: Solución A constituida por cultivo más metanol al 5%; Solución B con una proporción de 1 μ L de E2 en 1 mL de cultivo.

Las concentraciones de partida de los compuestos son: 1 mg/L para clorfenvinfos, pentaclorofenol y PFO; 2 mg/L para terbutrina y 50 mg/L para diclofenaco.

La placa se prepara de la siguiente manera:

- Se carga la columna 1 con 190 μ L de cultivo y 10 μ L del compuesto a ensayar por pocillo (dilución 1/20).
- Se cargan las columnas 2-9 y la 12 (control negativo) con 50 μ L de Solución A.
- Se cargan las columnas 10 (control de toxicidad) y 11 (control positivo) con 50 μ L de Solución B.
- Se mezcla por pipeteo el contenido de la columna 1 y se pasan 50 μ L a la columna 2, que se mezcla de nuevo, y se pasan otros 50 μ L a la columna 3, realizando diluciones seriadas 1:2 hasta obtener una dilución de 1/5120 respecto a la muestra inicial en la columna 9.
- Se pasan 50 μ L de la columna 1 a la columna 10 y, para que todos los pocillos tengan la misma cantidad, se descartan 50 μ L de las columnas 1, 9 y 10.

Las placas, se incuban 6 horas a 30 °C en agitación orbital a 120 rpm. Después se añade 50 μ L del tampón de lisis, YPER (Yeast Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) a cada pocillo para permeabilizar la pared de la levadura y extraer las proteínas solubles.

Si las placas se van a leer el mismo día se incuban a 30 °C durante 30 minutos, pero si no se puede efectuar la lectura, se congelan inmediatamente. Antes de leer, descongelar e incubar a 30 °C, 60 minutos.

A continuación, se añaden 75 μ L de MU-Gal a cada pocillo, sustrato que da lugar a la reacción enzimática, con lo que no hay que tardar en rellenarla para que no se sature la reacción. Se deja reposar 5 minutos para que precipiten los restos celulares y se lee la fluorescencia de la placa, con una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 460 nm, leyendo cada 42 segundos durante 20 minutos. El aparato utilizado es un lector de placas multifuncional TECAN Infinite M200.

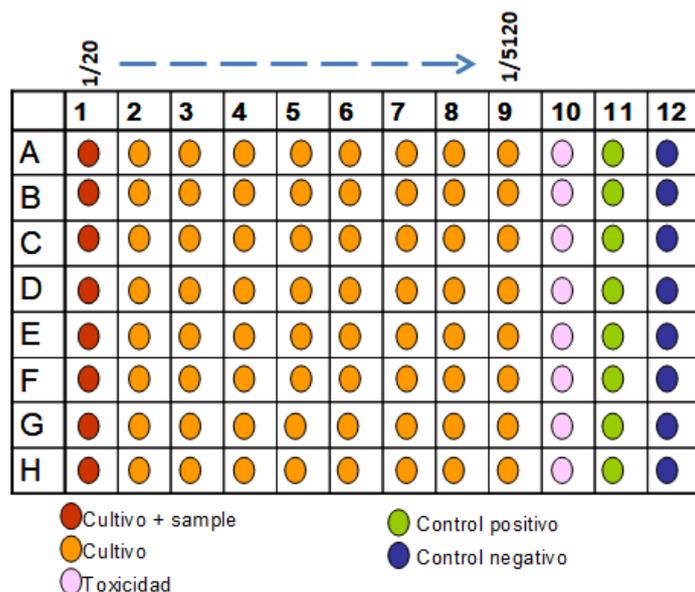


Figura 5. Organización del contenido de la placa multipocillo usada en el ensayo RYA, mostrando las diluciones del compuesto a ensayar y los diferentes controles.

3.2.5.5. Análisis de resultados

El nivel de fluorescencia medido depende de la actividad del enzima, que es proporcional a la cantidad en que se encuentra, la cual depende de la cantidad del complejo ligando-receptor (L-R) formado que active la transcripción del gen LacZ. La actividad de esta β -galactosidasa se calcula a partir de las pendientes de la recta de los valores de fluorescencia frente a tiempo.

Para ello se ha de asumir que en la formación del complejo L-R, el receptor nunca es limitante y depende de la disponibilidad de ligando; que todo el complejo L-R se une al DNA activando la transcripción; y que en la reacción enzimática el sustrato nunca es limitante, siendo su concentración mucho mayor que la constante de disociación K_d .

Utilizando los valores de actividad de los controles positivo y negativo, se puede escalar la actividad del enzima entre valores de 0 (sin actividad) y 1 (actividad máxima), obteniendo una actividad relativa (A_{rel}) como se muestra en la ecuación (5):

$$A_{rel} = \frac{A - A_{min}}{A_{max} - A_{min}} \quad (5)$$

Se puede obtener la EC_{50} a partir de la curva dosis-respuesta en que se representa la A_{rel} frente a las concentraciones del compuesto, es decir, la dilución a la que se consigue un A_{rel} del 50% respecto al máximo.

La K_d se puede determinar con la ecuación (6):



$$R_t = [R] + [RL]$$

$$K_d = \frac{[L][R]}{[RL]} \quad (6)$$

Partiendo de que la respuesta del sistema (A_{rel}) es proporcional a la cantidad de [RL] (complejo L-R) que se forma respecto de R_t (cantidad de receptor total), se puede relacionar la A_{rel} con la K_d en la ecuación (7):

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{R_t}$$

$$R_t = [R] + [RL]$$

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} = \frac{[RL]/[RL]}{[R]/[RL] + [RL]/[RL]} = \frac{1}{1 + [R]/[RL]} = \frac{1}{1 + K_d/[L]} \quad (7)$$

De esta manera se puede calcular la K_d a partir de la curva dosis-respuesta a partir de la ecuación (8):

$$K_d = \left(\frac{1}{A_{rel}} - 1 \right) \times [L] \quad (8)$$

Si la mitad de la cantidad de receptor total se encuentra formando parte del complejo L-R, la respuesta del sistema es la mitad de la máxima:

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{R_t} = 0,5$$

$$0,5 = \frac{1}{1 + K_d/[L]} \rightarrow K_d = [L]$$

Sabiendo que la EC_{50} es la concentración del ligando o compuesto a la que se consigue una A_{rel} del 50%, y teniendo en cuenta lo conseguido arriba llegamos a la ecuación (9):

$$K_d = CE_{50} \quad (9)$$

Como desconocemos la concentración de ligando en las muestras, y estamos trabajando con factores de dilución, se calcula una K_d aparente ($K_d app$), según la ecuación (10):

$$K_d = [L]_{CE_{50}}$$

$$K_d app = \frac{1}{[L]_{CE_{50}}} = \frac{1}{K_d}$$

$$[L] = \frac{1}{[factor\ de\ dilución]} = \frac{1}{f_d}$$

$$K_{dapp} = \frac{1}{1/f_d \times (1/A_{rel} - 1)} \quad (10)$$

En la mayoría de las muestras se desconoce el o los compuestos con actividad estrogénica, con lo que para comparar la actividad hallada en las diferentes muestras analizadas entre sí y con las que estén presentes en la bibliografía, los resultados se expresan en equivalentes (EEQ) de E2. Los equivalentes representan la concentración de ligando de referencia, en este caso E2, con la que se obtendría la misma respuesta que presenta la muestra analizada.

Estos equivalentes se calculan teniendo en cuenta la EC_{50} del patrón E2, 72,7308 ng/L, y la dilución en la que se obtiene la EC_{50} de la muestra, según la ecuación (11):

$$EEQ = CE_{50\text{ patrón}} \times K_{dapp} \quad (11)$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad llevados a cabo con los compuestos químicos seleccionados.

4.1. Ensayo de toxicidad con *Lemna minor*

En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos del ensayo de toxicidad sobre *L. minor* expuesta a diferentes diluciones de los cinco contaminantes. Los resultados se han obtenido mediante la medida de la superficie de crecimiento de la planta, la cual se ha llevado a cabo mediante el analizador de imágenes, y aplicando el análisis detallado en el apartado de Material y Métodos.

El análisis ANOVA de la variable dependiente % de inhibición del crecimiento con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta de la planta ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada compuesto (Anexo 7.1), expresadas en la tabla con superíndices diferentes.

Tabla 8. Toxicidad de los 5 contaminantes emergentes sobre *L. minor*.

% Inhibición del crecimiento* \pm SD					
	CVF	DCF	PCF	PFO	TBT
Concentración Inicial (mg/L)	100	0,5	5	500	0,1
1:1	47,1 \pm 4,6 ^d	62,2 \pm 7,9 ^d	84,4 \pm 12,6 ^e	84,1 \pm 6,3 ^B	111,6 \pm 105,0 ^f
1:2	39,1 \pm 3,8 ^d	52,8 \pm 14,5 ^d	83,5 \pm 10,2 ^e	64,2 \pm 1,5 ^f	66,3 \pm 4,2 ^e
1:4	33,8 \pm 5,3 ^{cd}	29,8 \pm 11,6 ^c	39,6 \pm 6,1 ^d	43,5 \pm 1,9 ^e	62,6 \pm 8,7 ^{de}
1:8	29,0 \pm 5,1 ^{bcd}	23,9 \pm 4,5 ^{bc}	37,7 \pm 7,2 ^{cd}	36,3 \pm 4,4 ^{de}	49,8 \pm 5,6 ^{cd}
1:16	17,4 \pm 4,2 ^{abc}	13,9 \pm 14,2 ^{abc}	37,885 \pm 3,3 ^{cd}	28,7 \pm 4,9 ^{cd}	44,0 \pm 4,1 ^{bc}
1:32	15,6 \pm 3,4 ^{abc}	12,1 \pm 8,8 ^{abc}	32,8 \pm 20,2 ^{bcd}	23,8 \pm 1,3 ^c	41,9 \pm 7,4 ^{bc}
1:64	14,9 \pm 1,2 ^{abc}	9,4 \pm 11,4 ^{ab}	22,9 \pm 13,1 ^{abcd}	20,4 \pm 8,6 ^{bc}	31,1 \pm 12,2 ^{ab}
1:128	12,6 \pm 1,0 ^{ab}	5,3 \pm 12,0 ^{ab}	20,4 \pm 2,8 ^{abc}	13,6 \pm 7,5 ^{ab}	23,6 \pm 12,7 ^a
1:256	-1,1 \pm 4,0 ^a	2,5 \pm 9,4 ^a	19,2 \pm 7,9 ^{ab}	9,4 \pm 4,1 ^a	17,4 \pm 10,1 ^a

*: media de 3 réplicas

Superíndices diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina

El clorfenvinfos muestra una respuesta significativa de la planta a concentraciones entre 100 y 12,5 mg/L (diluciones 1:1-1:8), con unos valores de inhibición medios entre 47 y 29 % (Anexo 7.1.1).

Para el diclofenaco, se puede observar que sólo las concentraciones más altas ensayadas (0,5 y 0,25 mg/L, diluciones 1:1 y 1:2, respectivamente) producen una respuesta por encima del

50% la cual se reduce de forma significativa a partir de 0,125 mg/L (1:4), no afectando significativamente a la tasa de crecimiento de la planta desde la dilución 1:8 (Anexo 7.1.2).

El pentaclorofenol, provoca una inhibición del crecimiento mayor que los anteriores compuestos, alcanzando valores alrededor del 80%. Esta respuesta baja significativamente a partir de la dilución 1:4 (1,25 mg/L), reduciéndose hasta 39,65 %. A partir de la dilución 1:64 (entre 0,08 y 0,02 mg/L) no se provoca un efecto significativamente diferente al control (Anexo 7.1.3).

En el PFO, se distingue una inhibición media del 84% para una concentración de 500 mg/L (1:1), la cual se reduce de forma significativa a los 250 mg/L (1:2), con una respuesta del 64%. Las concentraciones de ensayo más bajas (3,91 y a 1,95 mg/L, diluciones 1:128 y 1:256, respectivamente) no producen un efecto significativamente diferente al del control (Anexo 7.1.4).

Por último, el crecimiento de *Lemna* está totalmente inhibido cuando se expone a 100 µg/L (1:1) de terbutrina, esta respuesta se ve reducida significativamente a 50 µg/L (1:2) con un 66,3 %, el cual a su vez vuelve a experimentar otra bajada significativa a los 12,5 µg/L (1:8), con una inhibición media de 49,8 %. El efecto producido sobre la inhibición no es significativo a partir de la dilución 1:64 (Anexo 7.1.5).

Se puede observar claramente como el clorfenvinfos y el PFO tienen un efecto mucho menor sobre el crecimiento de la planta que el resto de compuestos, sobre todo este último, viendo por ejemplo como para conseguir una inhibición similar de entre 60 y 65 %, se necesitan 250 mg/L de PFO frente a 0,5 mg/L de diclofenaco. El pentaclorofenol y el diclofenaco presentan una mayor toxicidad, siendo mayor el diclofenaco, viendo como a una concentración de 0,5 mg/L este da sobre 62 % y el pentaclorofenol da casi el 40 %. El más tóxico de todos es la terbutrina, la cual provoca una inhibición de más del 100 % a 0,1 mg/L, concentración a la cual los dos compuestos químicos anteriores no llegan ni a un 30 %.

En la Figura 6 se representan las curvas de crecimiento (tasa crecimiento vs tiempo) según concentración y compuesto ensayados.

Como podemos observar en la Figura 6, la mayor tasa de crecimiento se da en los controles, encontrándose muy alejada la expuesta a mayor concentración. A medida que disminuye la concentración, las curvas están más cercanas a las curvas control, como en el caso de la terbutrina, en el que la curva de la dilución 1:256 se superpone a la curva control.

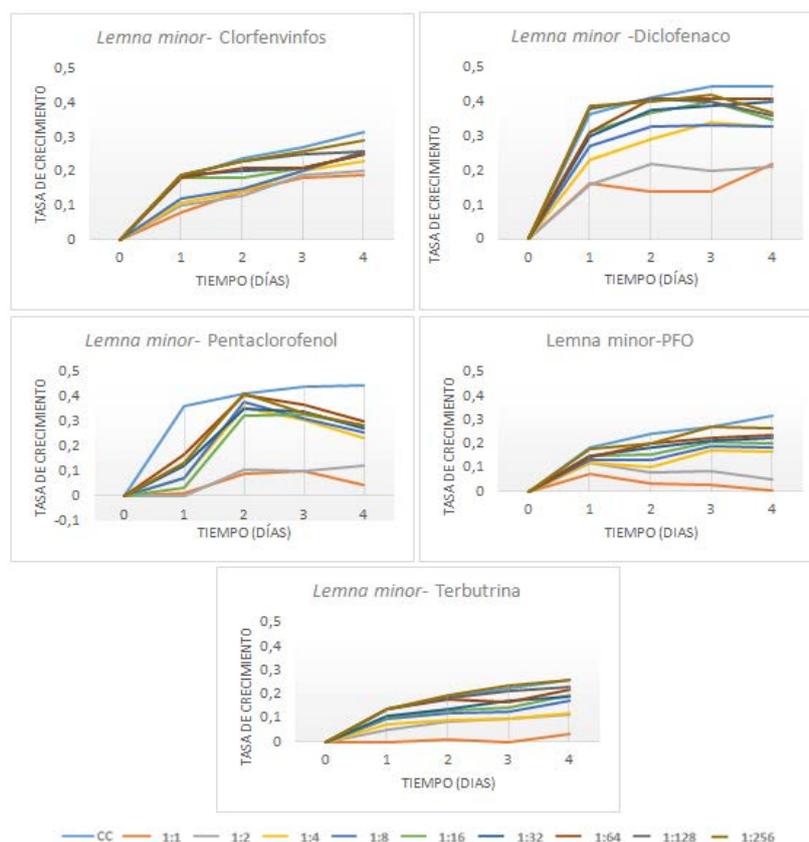


Figura 6. Representación de la tasa de crecimiento de *Lemna minor* expuesta a clorfeninfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina, a diferentes concentraciones y al control con respecto al tiempo.

El análisis ANOVA nos permite determinar el valor NOEC (Concentración máxima ensayada que no se diferencia significativamente del control) para cada uno de los contaminantes. Asimismo, mediante análisis Probit se calcula la EC_{50} (concentración que inhibe el crecimiento de la planta en un 50%), con sus intervalos de confianza al 95% (Anexo 7.1.1-7.1.5). Valores mostrados en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores NOEC y EC_{50} para *L. minor*.

	NOEC (mg/L)	EC_{50} (mg/L) (intervalo de confianza, 95%)
Clorfeninfos	6,25	147,5 (100,6 - 240,0)
Diclofenaco	0,063	0,3 (0,2 - 0,7)
Pentaclorofenol	0,08	0,6 (0,4 - 1,1)
PFO	3,91	99,9 (75,1- 139,4)
Terbutrina	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$9,8 \cdot 10^{-3}$ ($6,8 \cdot 10^{-3}$ - $15,0 \cdot 10^{-3}$)

CVF: clorfeninfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina

Según los valores NOEC y EC_{50} el orden de grado de toxicidad de los contaminantes es el siguiente: terbutrina > diclofenaco > pentaclorofenol > PFO > clorfeninfos.

Además de la medida de la superficie de las planta, se contó el número de frondas, calculando una nueva tasa de crecimiento teniendo en cuenta el número inicial y el número final de frondas. En la Figura 7 se representa la tasa de crecimiento frente a la dilución ensayada para cada compuesto.

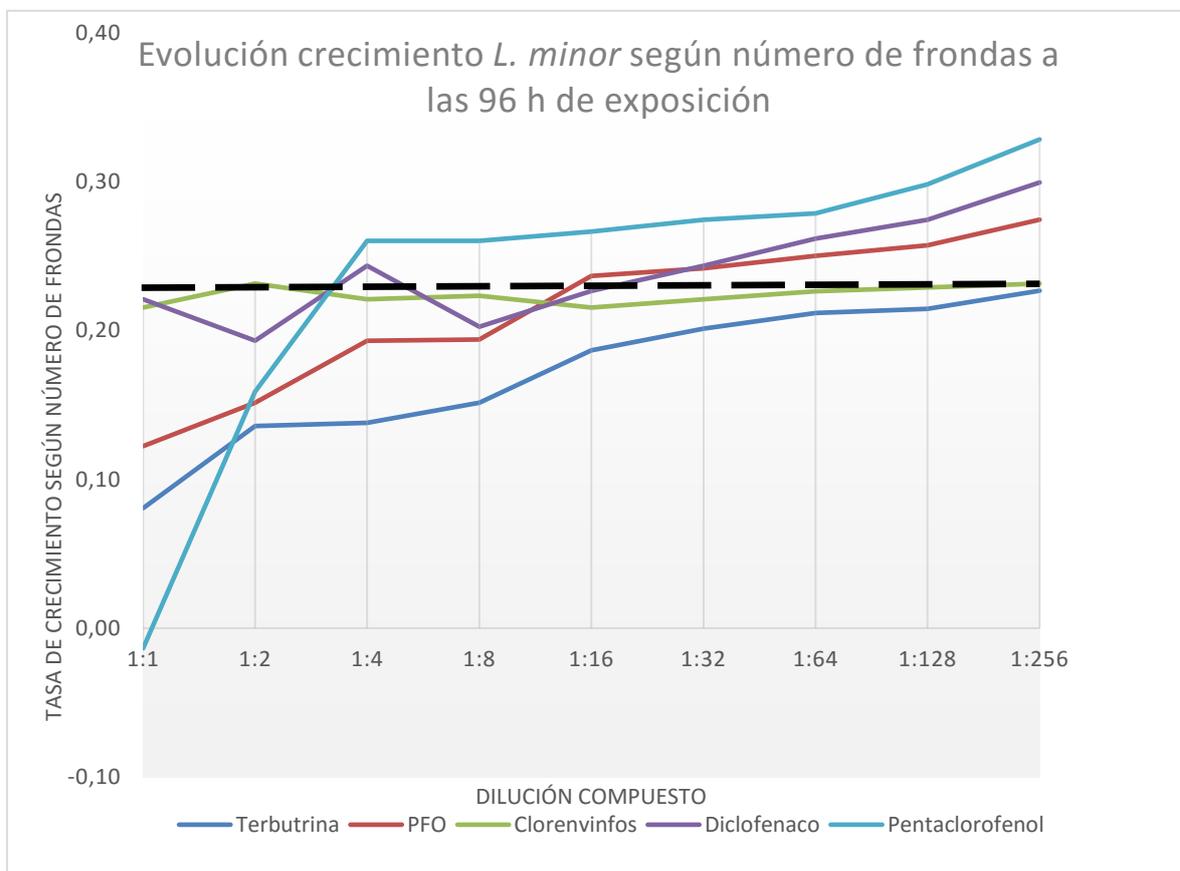


Figura 7. Representación de la tasa de crecimiento de *Lemna minor* calculada según el número de frondas frente al factor de dilución de cada uno de los cinco contaminantes ensayados. La línea negra discontinua indica el valor medio de las muestras control.

A partir de la Figura 7 podemos deducir, de nuevo, el nivel de toxicidad de los contaminantes a partir de la concentración necesaria de cada compuesto para alcanzar la tasa de crecimiento media dada por el control. Las tasas de crecimiento del clorfenvinfos y diclofenaco oscilan al mismo nivel que el control desde la dilución 1:1 (100 y 0,5 mg/L, respectivamente); el pentaclorofenol lo alcanza aproximadamente en la dilución 1:4 (1,25 mg/L); el PFO en la dilución 1:16 (62,5 mg/L), y por último, la terbutrina en la máxima dilución ensayada ($3,9 \cdot 10^{-4}$ mg/L), con lo que se corrobora el orden de toxicidad deducido a partir de la superficie de las frondas.

En la bibliografía podemos encontrar otros trabajos que ensayan los compuestos sobre *Lemna* sp.. Cleuvers (2003) y Quinn *et al.* (2011) hallaron para el diclofenaco valores de EC_{50} de 7,5 mg/L y de 47,6 mg/L, respectivamente, midiendo la inhibición del crecimiento durante 7 días, valores más altos que los obtenidos en el presente trabajo. Sobre el pentaclorofenol, sin embargo, se halló una EC_{50} de 0,61 mg/L en un ensayo de 96 horas, obteniendo un resultado similar al nuestro (Merlin *et al.*, 1993). Con respecto al PFO se llevó a cabo un ensayo de 7 días con *Lemna gibba*, obteniendo una EC_{50} de 31,1 mg/L, mayor que la obtenida en el presente trabajo, lo cual puede ser debido a la mayor duración del ensayo.

4.2. Ensayo de toxicidad agudo con *Daphnia magna*

4.2.1. Ensayo a las 24 horas

En la Tabla 10 se presentan los valores medios del porcentaje de inmovilización de *D. magna* provocado por la exposición a las diferentes concentraciones de los cinco contaminantes emergentes. El análisis ANOVA de la variable dependiente % de inmovilización con respecto al factor dilución, muestra que hay diferencias significativas en la respuesta del cladóceros ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo 7.2), expresadas en la tabla con superíndices diferentes.

Tabla 10. Toxicidad de los 5 contaminantes emergentes sobre *D. magna* tras 24 h de exposición.

% Inmovilidad* \pm SD						
	CVF	DCF	PCF	PFO	TBT	Mezcla
Concentración inicial (mg/L)	0,01	10	10	250	40	**
1:1	93,3 \pm 11,5 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^d	100,0 \pm 0,0 ^d	100,0 \pm 0,0 ^d	100,0 \pm 0,0 ^c
1:2	93,3 \pm 11,5 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^d	100,0 \pm 0,0 ^d	63,9 \pm 12,7 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c
1:4	73,3 \pm 23,1 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	91,7 \pm 14,4 ^{cd}	80,0 \pm 20,0 ^c	40,0 \pm 20,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^c
1:8	46,7 \pm 30,6 ^b	100,0 \pm 0,0 ^c	80,0 \pm 0,0 ^c	46,7 \pm 11,6 ^b	20,0 \pm 20,0 ^{ab}	100,0 \pm 0,0 ^c
1:16	13,3 \pm 11,5 ^a	86,7 \pm 23,1 ^{bc}	26,7 \pm 11,5 ^b	40,0 \pm 20,0 ^b	20,0 \pm 20,0 ^{ab}	55,0 \pm 10,0 ^b
1:32	6,7 \pm 11,5 ^a	80,0 \pm 20,0 ^{ab}	6,7 \pm 11,5 ^a	40,0 \pm 0,0 ^b	6,7 \pm 11,5 ^a	45 \pm 10,0 ^{ab}
1:64	0,0 \pm 0,0 ^a	66,7 \pm 11,6 ^a	0,00 \pm 0,0 ^a	13,3 \pm 11,6 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	35 \pm 10,0 ^{ab}
1:128	-***	-	-	-	-	25 \pm 10,0 ^a

*: media de 3 réplicas

** : la mezcla se hizo a 1mg/L de cada compuesto, media de 4 réplicas

***: dilución no ensayada para todos los compuestos

Superíndices diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfanato de perfluorooctano; TBT: terbutrina.

Todos los compuestos ensayados así como la mezcla poseen una elevada toxicidad a las concentraciones más altas de las ensayadas. Clorfenvinfos mantiene una elevada toxicidad hasta la dilución 1:4 (2,5 μ g/L). En el caso del diclofenaco, se observa un 100 % de inmovilidad hasta la dilución 1:8 (de 10 a 1,25 mg/L) manteniéndose muy tóxico, incluso a las más bajas concentraciones. Pentaclorofenol y PFO mantienen una elevada toxicidad hasta las diluciones 1:8 y 1:4, respectivamente. Por su parte, la terbutrina es el menos tóxico de los compuestos frente a *D. magna* para las concentraciones ensayadas, ya que a partir de la dilución 1:2 disminuye su toxicidad hasta por debajo del 50%.

La mezcla, en la cual se han empleado los cinco contaminantes a 1 mg/L cada uno, muestra una elevada toxicidad (inhibición del 100%) hasta la dilución 1:8, cuando ésta baja significativamente, aunque todavía mantiene diferencias significativas con el control.

A partir de este ANOVA se ha determinado el valor NOEC de los contaminantes y el valor LID (mínima dilución sin efecto) de la mezcla. También se han calculado mediante análisis Probit (Anexo 7.2.1-7.2.6) los valores EC_{50} para los contaminantes y el valor MID (dilución requerida para que se produzca el 50% del efecto) de la mezcla. Valores mostrados en la Tabla 11.

Tabla 11. Valores NOEC, EC_{50} , LID y MID para *D. magna* tras 24h de exposición.

	NOEC (mg/L)	EC_{50} (mg/L) (intervalo de confianza, 95%)
CVF	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$ ($1,1 \cdot 10^{-3} - 2,1 \cdot 10^{-3}$)
DCF	<0,16	0,65 (0,15-1,05)
PCF	0,31	0,83 (0,71-1,14)
PFO	3,9	37,03 (26,04-51,5)
TBT	5,0	10,3 (7,02-16,0)
	LID	MID (intervalo de confianza, 95%)
Mezcla	<1:128	1:37 (1:48-1:30)

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina.

Según los valores de los parámetros de toxicidad calculados, el orden de toxicidad de los contaminantes emergentes sobre *D. magna* a las 24 horas de ensayo es el siguiente : PFO < terbutrina < pentaclorofenol < diclofenaco < clorfenvinfos.

En la bibliografía podemos encontrar información sobre la toxicidad de estos compuestos sobre el cladócer *D. magna*. Para el diclofenaco se han encontrado valores EC_{50} (24h) de 3,18 mg/L (Czech *et al.*, 2014), sin embargo, estos valores son más altos (aprox. 75 mg/L) cuando el parámetro de medida es la mortalidad (Haap *et al.*, 2008).

En el caso del pentaclorofenol y la terbutrina, los valores de toxicidad encontrados en la bibliografía son del mismo orden que los obtenidos por nosotros: de 0,3 a 0,6 mg/L (Kühn *et al.*, 1989; Hickey, 1989) para el primero y de 17,2 mg/L para el segundo (Marchini *et al.*, 1988), mientras que para el PFO son más altos, 76,82 mg/L (Ji *et al.*, 2008).

4.2.2. Ensayo a las 48 horas

El mismo tipo de ANOVA (Anexo 7.2) que se realizó para los datos tras 24 horas también se ha realizado para los datos tras 48 horas, mostrando los valores medios de inhibición y los grupos que presentan diferencias significativas en la Tabla 12.

En la Tabla 12 observamos como la inhibición de la movilidad producida por los compuestos ha aumentado respecto a la mostrada a las 24 horas. Destaca el diclofenaco y la mezcla que alcanzan una inhibición del 100% en todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 12. Toxicidad de los 5 contaminantes emergentes sobre *D. magna* tras 48 h de exposición.

	% Inmovilidad* ± SD					
	CVF	DCF	PCF	PFO	TBT	Mezcla
Concentración inicial (mg/L)	0,010	10	10	250	40	**
1:1	100,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^d	100,0 ± 0,0 ^a
1:2	100,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^b	93,3 ± 0,0 ^d	100,0 ± 0,0 ^a
1:4	93,3 ± 11,6 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	93,3 ± 11,5 ^{bc}	93,3 ± 11,6 ^b	93,3 ± 11,6 ^d	100,0 ± 0,0 ^a
1:8	86,7 ± 11,6 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	86,7 ± 11,6 ^{bc}	86,7 ± 23,1 ^b	73,3 ± 23,1 ^c	100,0 ± 0,0 ^a
1:16	80,0 ± 20,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	80,0 ± 20,0 ^b	80,0 ± 20,0 ^b	22,7 ± 20,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a
1:32	34,4 ± 15,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^a	34,4 ± 15,0 ^a	33,3 ± 11,6 ^a	46,7 ± 11,6 ^b	100,0 ± 0,0 ^a
1:64	26,7 ± 11,6 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	26,7 ± 11,6 ^a	33,3 ± 11,6 ^a	20,0 ± 11,6 ^a	100,0 ± 0,0 ^a
1:128	-	-	-	-	-	100,0 ± 0,0 ^a

*: media de 3 réplicas

** : la mezcla se hizo a 1mg/L de cada compuesto, media de 4 réplicas

***: dilución no ensayada para todos los compuestos

Superíndices diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfanato de perfluorooctano; TBT: terbutrina

A partir del análisis ANOVA y Probit se calculan los parámetros NOEC y LID, EC₅₀ y MID, respectivamente, cuyos valores se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores NOEC y EC₅₀ para *D. magna* tras 48 h de exposición.

	NOEC 48 h (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L) (intervalo de confianza, 95%)
CVF	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$0,32 \cdot 10^{-3}$ ($0,28 \cdot 10^{-3}$ - $0,36 \cdot 10^{-3}$)
DCF	<0,78	-
PCF	<0,16	0,38 (0,27-0,5)
PFO	< 7,8	17,5 (11,5-24,5)
TBT	0,625	1,72 (1,12-2,44)
	LID	MID (intervalo de confianza, 95%)
Mezcla	<1:128	-

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfanato de perfluorooctano; TBT: terbutrina

No se ha podido calcular los los valores de toxicidad media para el diclofenaco (EC₅₀) y la mezcla (MID), ya que en ambos casos la mortalidad ha sido del 100% para todas las concentraciones. Suponiendo que la toxicidad del diclofenaco seguirá siendo menor que la del

clorfenvinfos pese a no tener datos que lo corroboren, comprobamos que la escala de toxicidad de los contaminantes sigue siendo la misma que a las 24 horas.

Respecto a la bibliografía consultada, destaca la similitud entre los valores obtenidos en el presente trabajo con los publicados para el clorfenvinfos ($0,3 \cdot 10^{-3}$ mg/L y $0,69 \cdot 10^{-3}$ mg/L; Robinson, 1999; Mesquita, 2005). A pesar de no haber podido calcular un valor de EC_{50} para el diclofenaco, la elevada toxicidad mostrada por este compuesto a las 48 h está de acuerdo con la encontrada por Ferrari *et al.* (2003) que fue de $2,2 \cdot 10^{-4}$ mg/L; más recientemente, Czech *et al.* (2014) encontraron un valor de EC_{50} mayor (2,69 mg/L). Tal y como se ha mencionado con anterioridad, cuando los estudios se dirigen a observar la mortalidad de las dafnias, los valores de EC_{50} son mayores, como los obtenidos por Haap *et al.* (2008), entre 22,4 y 80,1 mg/L. En el caso del pentaclorofenol y la terbutrina, los valores de toxicidad encontrados en la bibliografía son del mismo orden que los obtenidos por nosotros: 0,55 mg/L (Kühn *et al.*, 1989) y 0,6 mg/L (Adema, 1978) para el primero y 2,66 mg/L (Silva *et al.*, 2011) y 7,1 mg/L (Marchini *et al.*, 1988) para la terbutrina, mientras que para el PFO son más altos, 37,36 mg/L (Ji *et al.*, 2008), 67,2 mg/mL (Boudreau *et al.*, 2003b) y de 59 a 67 mg/kg (Yang *et al.*, 2014).

4.3. Ensayos de toxicidad con *Eisenia fetida*

4.3.1. Ensayo de toxicidad crónica

En la Tabla 14 se muestran los resultados del ensayo crónico con la lombriz *E. fetida*, expresados como porcentaje de la variación de peso medio de las lombrices a los 7, 14, 21 y 28 días del comienzo del ensayo, para los cinco compuestos químicos, su mezcla y el control.

El análisis ANOVA muestra que hay diferencias significativas en la respuesta de las lombrices ($p < 0,05$). Para determinar las medias que tienen diferencias significativas, se ha realizado un Test de Rango Múltiple para cada tiempo de tratamiento (Anexo 7.3), expresadas en la tabla con superíndices diferentes.

Tabla 14. Variación del peso en el ensayo crónico con *E. fetida*

% variación peso* \pm SD					
	Concentración (mg/kg)	7 días	14 días	21 días	28 días
CVF	40	23,56 \pm 8,0 ^{ab}	43,96 \pm 3,6 ^c	44,05 \pm 6,5 ^{cd}	42,58 \pm 6,6 ^{bc}
DCF	30	10,47 \pm 2,8 ^a	10,25 \pm 4,4 ^a	31,46 \pm 5,1 ^{bc}	33,26 \pm 8,4 ^{ab}
PCF	15	39,00 \pm 8,8 ^c	39,91 \pm 7,5 ^c	48,89 \pm 7,4 ^d	56,29 \pm 10,1 ^{cd}
PFO	75	44,97 \pm 2,2 ^c	39,91 \pm 7,5 ^{bc}	41,93 \pm 2,2 ^{bcd}	40,86 \pm 5,1 ^{bc}
TBT	30	16,28 \pm 3,0 ^a	6,38 \pm 7,5 ^a	25,77 \pm 3,6 ^{ab}	49,48 \pm 6,8 ^{bcd}
Mezcla	**	34,46 \pm 10,2 ^{bc}	21,13 \pm 9,6 ^{ab}	9,20 \pm 11,2 ^a	12,44 \pm 11,3 ^a
Control	-	45,74 \pm 12,9 ^c	62,57 \pm 19,2 ^d	58,82 \pm 20,4 ^d	70,19 \pm 25,5 ^d

*: media de 3 réplicas

** : la mezcla se hizo a las mismas concentraciones de los compuestos por separado

Superíndices diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina

En la Figura 8 se muestran los datos gráficamente. Aquellas variaciones de peso que son significativamente diferentes al control se han señalado con un asterisco (Anexo 7.3.1).

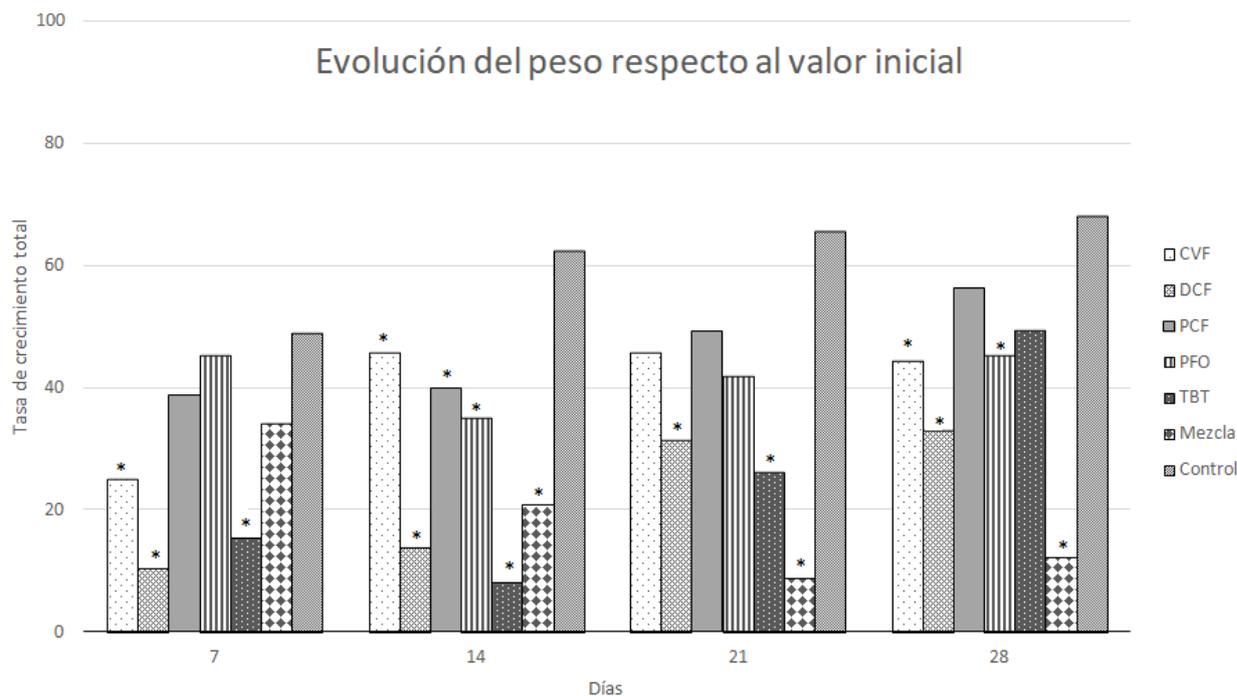


Figura 8. Evolución de la variación del peso de las lombrices a lo largo del ensayo. (*: significativamente diferente del control; CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfanato de perfluorooctano; TBT: terbutrina).

Como podemos apreciar tanto en la Tabla 14 como en la Figura 8, los organismos control son los que presentan un mayor aumento en el peso a lo largo de todo el ensayo.

A los 7 días, clorfenvinfos, diclofenaco y terbutrina produjeron variaciones de peso significativamente menores al control. Pentaclorofenol y PFO provocaron un aumento del peso similar al del control. A los 14, 21 y 28 días se observa un patrón de comportamiento similar.

El diclofenaco y la terbutrina son los contaminantes que muestran un mayor efecto sobre el peso durante los primeros 21 días; sin embargo el herbicida pierde actividad, provocando un aumento de peso que no presenta diferencias con el control al finalizar el ensayo.

En general, a lo largo del ensayo se observa un aumento del peso en las lombrices expuestas a los compuestos, lo que significa que éstos pierden actividad, ejerciendo menor efecto sobre el peso.

Respecto a la mezcla de los compuestos, aunque durante la primera semana no muestra un efecto significativo con respecto al control, a lo largo del ensayo aumenta su actividad, produciendo incluso pérdidas de peso en las lombrices.

Otro parámetro de medida de la toxicidad crónica se basa en el conteo de huevos puestos a los 28 días. El análisis ANOVA (Anexo 7.3.2), muestra que existen diferencias significativas en la respuesta (número de huevos puestos) de las lombrices expuestas a los diferentes compuestos y/o su mezcla ($p < 0,05$). Los resultados son mostrados en la Tabla 15.

Tabla 15. Número de huevos puestos en el ensayo de toxicidad crónico con *E. fetida*

	Concentración (mg/kg)	Número de huevos* \pm SD
CVF	40	6,67 \pm 2,5 ^b
DCF	30	4,00 \pm 0,0 ^b
PCF	15	19,00 \pm 2,0 ^d
PFO	75	9,67 \pm 2,1 ^c
TBT	30	4,00 \pm 0,0 ^b
Mezcla	**	0,00 \pm 0,0 ^a
Control	-	30,00 \pm 2,0 ^e

*: medio de 3 réplicas

** : la mezcla se hizo a las mismas concentraciones de los compuestos por separado
Superíndices diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina

Todos los tratamientos provocan un efecto significativo con respecto al control. El compuesto de menor efecto sobre la puesta es el pentaclorofenol. Los más tóxicos a la concentración ensayada son el diclofenaco y la terbutrina. De nuevo, la mezcla vuelve a mostrar una toxicidad superior, ya que ninguna de las lombrices expuestas puso huevos.

Las medidas del peso y del número de huevos en el ensayo crónico nos permiten deducir una escala de toxicidad para los tratamientos a las concentraciones ensayadas, viéndose afectadas las lombrices de una forma similar en ambos parámetros, la cual sería pentaclorofenol < PFO < clorfenvinfos < diclofenaco < terbutrina < mezcla. Si tenemos en cuenta la concentración de partida, el PFO es el que se encuentra a mayor concentración y el pentaclorofenol el que menos, con lo que el PFO podría resultar el contaminante de menor toxicidad y el pentaclorofenol es posible que mostrase una toxicidad similar al resto de compuestos en el caso de que se aumentase su concentración al mismo nivel, cambiando el orden de la escala.

4.3.2. Ensayo de repulsión-atracción

Los resultados del ensayo de repulsión-atracción con la lombriz de tierra se muestran en la Figura 9.

Los gusanos muestran repulsión hacia todos los compuestos y su mezcla. La mezcla sigue siendo más tóxica que los compuestos por separado, y es que en este ensayo todas las lombrices se han situado en la mitad control del sustrato. El diclofenaco y el pentaclorofenol, pese a mostrar repulsión, no provocan una respuesta significativamente diferente al control, como sí hacen el clorfenvinfos, el PFO y la terbutrina, la cual es el compuesto que más repulsión muestra.

Ensayo de repulsión-atracción

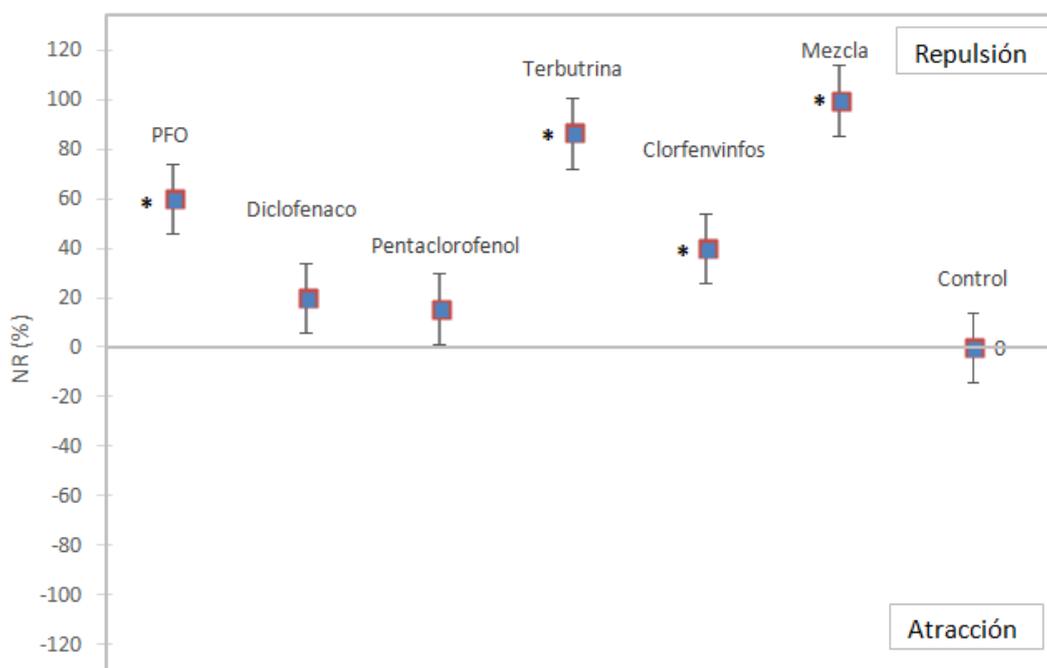


Figura 9. Ensayo repulsión-atracción con *E. fetida*, (Las barras de error indican la desviación estándar de 3 réplicas. *: significativamente diferente del control; CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfanato de perfluorooctano; TBT: terbutrina)

En la bibliografía podemos encontrar varios ensayos en que se utiliza *E. fetida* para la determinación de la toxicidad de estos cinco contaminantes. Hartnik y Styryshave (2008) realizaron un ensayo utilizando suelos naturales en que comprobaban la toxicidad del clorfenvinfos midiendo la puesta de huevos a los 28 días, dando una EC_{50} de 57 y 29 mg/kg y una NOEC de 100 y 20 mg/kg, lo que nos permite comprobar la importancia de usar un suelo artificial estándar para evitar estas desviaciones. Pino *et al.* (2015) obtuvieron una LC_{50} (concentración que da un 50% de mortalidad) de 90,49 mg/kg a los 14 días para el diclofenaco, y Wang *et al.* (2012) una LC_{50} de 177,9 y de 106,6 mg/kg a los 7 y 14 días para la terbutrina, respectivamente. Con el pentaclorofenol se han realizado diferentes tipos de ensayos con *E. fetida*: midiendo la mortalidad a los 14 días, dando una LC_{50} media de 75,1 mg/kg de los resultados de 18 laboratorios (Edwards, 1984); midiendo la puesta de huevos a los 21 días, dando una EC_{50} de 58 mg/kg (Van Gestel *et al.*, 1989); y midiendo la repulsión, con una EC_{50} de 30,9 mg/kg (Hu *et al.*, 2014). Por último, Lankadurai *et al.* (2013) recopilan los resultados de una serie de ensayos distintos con PFO: LC_{50} a los 7 días de 365 mg/kg; dos NOEC midiendo la mortalidad a los 14 días de 160 mg/kg y de 77 mg/kg, y una EC_{50} y una NOEC de 103 y 10 mg/kg a partir la puesta huevos, respectivamente.

4.4. Ensayo de actividad estrogénica (RYA)

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo RYA para cada uno de los contaminantes tras seguir los pasos detallados en el apartado Materiales y Métodos.

No se ha podido medir la actividad estrogénica del pentaclorofenol por resultar tóxico para la levadura, impidiendo su crecimiento.

Tabla 16. Actividad estrogénica de los cinco contaminantes según el ensayo RYA.

	Concentración inicial (mg/L)	EEQ (ng/L)	EC ₅₀ (mg/L)
CVF	1	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,029
DCF	50	-	-
PCF	1	-	-
PFO	1	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,12
TBT	2	$3,1 \cdot 10^{-3}$	0,047

EEQ: Equivalentes de 17 β -estradiol

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina.

Los equivalentes mostrados en la Tabla 9 nos indican qué concentración de 17 β -estradiol (E2) sería necesaria para provocar la misma actividad estrogénica que la causada por la concentración inicial de contaminante ensayado. Estos equivalentes se calculan, como ya se indicó en el apartado de Materiales y Métodos, haciendo uso de la EC₅₀ del E2 (72,7308 ng/L), la cual podemos comparar con la EC₅₀ de los compuestos obtenida en el ensayo, viendo así como el PFO es el compuesto con menor actividad estrogénica (1600 veces menor), seguido de la terbutrina (650 veces menor) y por último el clorfenvinfos, que es el que muestra una actividad mayor, 400 veces menor que el E2, aproximadamente. Por último, y como es de esperar, se comprueba la ausencia de actividad estrogénica en el diclofenaco.

En la bibliografía podemos encontrar diversos estudios que ensayan la respuesta de diferentes receptores ante estos contaminantes o que realizan otro tipo de ensayos para demostrar actividades disruptoras endocrinas, como serían las que imitan la acción de los estrógenos, estudiada mediante el RYA.

Se han hallado efectos disruptores endocrinos en diferentes estudios con el PFO: alteraciones en la actividad estrogénica en hepatocitos del pez tilapia, una sobreexpresión de genes relacionados con andrógenos, estrógenos y el desarrollo de la tiroides en el pez cebra; o alteraciones en la función tiroidea y el sistema neuroendocrino en ratas (Cheng *et al.*, 2010).

Vinggaard *et al.* (1999) estudiaron la actividad estrogénica del clorfenvinfos y del pentaclorofenol, entre otros plaguicidas, mediante RYA y un ensayo de proliferación de células MCF-7 (células de cáncer de mama humano que proliferan en presencia de estrógenos); los dos compuestos resultaron tóxicos para las levaduras, mientras que el pentaclorofenol no provocó proliferación en las MCF-7, y el clorfenvinfos no la suficiente para que fuese estadísticamente significativo. El pentaclorofenol, en otro ensayo de levadura recombinante (Orton *et al.*, 2009), no mostró actividad estrogénica, pero sí antiestrogénica y antiandrogénica. No obstante, Dorsey y Tchounwou (2004) demostraron que este compuesto estimula la producción de vitelogenina en los hepatocitos de peces bagre machos, que al ser una proteína precursora de los huevos, su inducción en machos es un indicador de exposición a estrógenos o compuestos que los imiten. Esta misma proteína también fue estudiada para ver los efectos del diclofenaco en el pez medaka, viendo como los genes de la vitelogenina eran sobreexpresados ante la presencia de este contaminante en concentraciones tan bajas como 1 μ g/L (Hong *et al.*, 2007). Sobre la terbutrina, Stevens *et al.* (1994) mostró su capacidad para aumentar la incidencia de tumores mamarios en ratas, demostrando alteraciones en el control neuroendocrino.

4.5. Evaluación medioambiental

Para finalizar este trabajo, se realiza la evaluación medioambiental de los contaminantes ensayados calculando el cociente entre la concentración esperada ambiental (PEC) en el medio acuático y la concentración prevista sin efecto (PNEC) para los organismos que en él habitan, según la ecuación (12):

$$PEC/PNEC = \frac{PEC}{\frac{\text{Dato de toxicidad más sensible}}{\text{Factor de Valoración}}} \quad (12)$$

Para el cálculo del PNEC se tienen en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda con *Lemna minor* y *Daphnia magna*. Con el fin de aumentar la precisión de la evaluación del riesgo, que englobe todos los niveles tróficos de un ambiente acuático, tendremos en cuenta resultados de toxicidad llevados a cabo sobre el alga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* y sobre embriones del pez *Oryzias latipes* realizados en nuestro laboratorio (Álvarez, 2017).

Los datos de toxicidad elegidos para la evaluación del riesgo corresponden a los valores más sensibles. Dado que los datos utilizados pertenecen a ensayos de toxicidad a corto plazo, el factor de valoración usado es de 1000. Los resultados de estos ensayos se resumen la Tabla 17.

Tabla 17. Datos toxicológicos de los ensayos utilizados para calcular el PNEC.

	EC ₅₀ (mg/L)			
	<i>L. minor</i>	<i>D. magna</i>	<i>P. subcapitata</i>	<i>O. latipes</i> (LC ₅₀)
CVF	147,5	1,5 · 10 ^{-3*}	8,9	8,1
DCF	0,3*	0,65	2,3	52,7
PCF	0,6	0,83	8,9 · 10 ^{-4*}	16,5
PFO	99,9	37,03	9,4*	54,7
TBT	9,8 · 10 ⁻³	10,3	2,1 · 10 ^{-3*}	54,7

*: Valores escogidos para la evaluación del riesgo

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano;

TBT: terbutrina.

Para los valores de la PEC se utilizará el valor medio anual de las normas de calidad ambiental (NCA-MA) para las sustancias prioritarias presente en la Directiva 2013/39/UE de la Unión Europea. Estos valores medios corresponden a las aguas superficiales, que incluyen los ríos, los lagos y las masas de agua artificiales conexas. Para el diclofenaco se utiliza el valor presente en la propuesta de directiva 2011/0429 (COD).

Los valores de la PEC, la PNEC y su cociente para cada uno de los contaminantes emergentes estudiados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Cociente PEC/PNEC de los cinco contaminantes ensayados para su evaluación medioambiental.

	PEC ($\mu\text{g/L}$)	PNEC (mg/L)	PEC/PNEC
CVF	0,1	$1,5 \cdot 10^{-3}$	66,67
DCF	0,1	0,3	0,33
PCF	0,4	$8,9 \cdot 10^{-4}$	449,44
PFO	$6,5 \cdot 10^{-4}$	9,4	$6,91 \cdot 10^{-5}$
TBT	0,065	$2,1 \cdot 10^{-3}$	30,95

CVF: clorfenvinfos; DCF: diclofenaco; PCF: pentaclorofenol; PFO: sulfonato de perfluorooctano; TBT: terbutrina.

Si el cociente es igual o menor que 1, la sustancia supone un riesgo bajo, pero si es mayor, supondrá un riesgo más alto conforme más grande sea el resultado. El PFO y el diclofenaco suponen un riesgo bajo según los datos que hemos recopilado en los diferentes bioensayos realizados, pero los otros tres contaminantes suponen un riesgo alto para los organismos acuáticos, sobretudo el pentaclorofenol, ya que, según nuestros resultados, la concentración establecida por la Unión Europea para garantizar la calidad de sus aguas superficiales es suficiente para causar un efecto tóxico sobre algunos de los seres vivos que habitan en ellas.

5. CONCLUSIONES

1. De los cinco contaminantes estudiados, terbutrina ha resultado ser el más tóxico para *Lemna minor* y clorfenvinfos el menos tóxico; mientras que, para *Daphnia magna*, clorfenvinfos ha sido el más tóxico y PFO el menos tóxico.
2. Los cinco contaminantes han ejercido un efecto tóxico significativo sobre el peso y la reproducción de *Eisenia fetida* en el ensayo crónico.
3. En el ensayo de repulsión con *Eisenia fetida*, las lombrices han mostrado rechazo por todos los contaminantes, aunque para diclofenaco y pentaclorofenol la repulsión no ha sido significativamente diferente del control.
4. La mezcla de los compuestos ha incrementado la toxicidad, tanto sobre el peso y la puesta de huevos como sobre la repulsión de las lombrices.
5. Para los organismos estudiados, se han observado diferencias significativas respecto a los efectos tóxicos de los contaminantes, lo que demuestra la necesidad de recurrir a una batería de bioensayos en estudios de toxicidad.
6. En el ensayo RYA, clorfenvinfos, PFO y terbutrina han mostrado actividad estrogénica a niveles muy bajos comparado con el patrón. Esta actividad no se ha podido determinar para pentaclorofenol debido a su elevada toxicidad sobre la levadura.
7. En la evaluación de riesgos ambientales mediante el cociente PEC/PNEC los contaminantes clorfenvinfos, terbutrina y pentaclorofenol han mostrado un elevado riesgo para los ecosistemas acuáticos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADEMA, D. M. M. (1978). *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59(2), 125-134.
- ÁLVAREZ, C. (2017) *Evaluación de los riesgos ambientales de contaminantes de preocupación emergente en la Unión Europea*. Trabajo Final de Grado en Biotecnología. Universitat Politècnica de València.
- ASTM. E1676-95, (1995). Standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with lumbricid earthworms *Eisenia foetida*. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials.
- BANJAC, Z., GINEBREDÀ, A., KUZMANOVIC, M., MARCÉ, R., NADAL, M., RIERA, J. M., & BARCELÓ, D. (2015). Emission factor estimation of ca. 160 emerging organic microcontaminants by inverse modeling in a Mediterranean river basin (Llobregat, NE Spain). *Science of the Total Environment*, 520, 241-252.
- BIERKENS, J., KLEIN, G., CORBISIER, P., VAN DEN HEUVEL, R., VERSCHAEVE, L., WELTENS, R., & SCHOETERS, G. (1998). Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37(14), 2935-2947.
- BOUDREAU, T. M., SIBLEY, P. K., MABURY, S. A., MUIR, D. G. C., & SOLOMON, K. R. (2003a). Laboratory evaluation of the toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *Daphnia magna*, and *Daphnia pulex*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 44(3), 0307-0313.
- BOUDREAU, T. M., SIBLEY, P. K., MABURY, S. A., MUIR, D. G. C., & SOLOMON, K. R. (2003b). Laboratory evaluation of the toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *Daphnia magna*, and *Daphnia pulex*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 44(3), 0307-0313.
- CÉSPEDES, R., PETROVIC, M., RALDÚA, D., SAURA, Ú., PIÑA, B., LACORTE, S., ... & BARCELÓ, D. (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(3), 697-708.
- CHENG, Y., CHEN, H. M., YU, W. L., CUI, Y., ZHOU, L. L., & ZHOU, X. (2010). 3D-QSAR study of the endocrine disrupting effect of perfluorooctane sulfonates (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on human estrogen, androgen and thyroid receptors. *ChemPlusChem*, 75(4), 471.
- CZECH, B., JOŠKO, I., & OLESZCZUK, P. (2014). Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104, 247-253.
- DE LA TORRE, A., MUÑOZ, M. J., & CARBALLO, M. (2005). Evaluación medioambiental. Evaluación ecotoxicológica. Repercusión ambiental. *Toxicología Ambiental: Seguridad Química*.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. (DO L 327 de 22 de diciembre de 2000). Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2000-82524> (Consultado el 30 de enero de 2017).
- Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. (DO L 348 de 24 de diciembre de 2008). Disponible en https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-82606_82524 (Consultado el 30 de enero de 2017).
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. (DO L 226 de 24 de agosto de 2013). Disponible en https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=DOUE-L-2013-81677 (Consultado el 16 de junio de 2017).
- Directiva 84/449/CEE de la Comisión, de 25 de abril de 1984, por la que se adapta, por sexta vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. (DO L 251 de 19 de septiembre de 1984). Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31984L0449:ES:HTML> (Consultado el 25 de enero de 2017).
- Directiva 93/67/CEE de la Comisión, de 20 de julio de 1993, por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo. (DO L 227 de 8 de septiembre de 1993). Disponible en <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1993-81473> (Consultado el 10 de abril de 2017).
- DORSEY, W. C., & TCHOUNWOU, P. B. (2004). Pentachlorophenol-induced cytotoxic, mitogenic, and endocrine-disrupting activities in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *International journal of environmental research and public health*, 1(2), 90-99.

- FERRARI, B., PAXEUS, N., GIUDICE, R. L., POLLIO, A., & GARRIC, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359-370.
- GARCÍA-REYERO, N., GRAU, E., CASTILLO, M., ALDA, D., LÓPEZ, M. J., BARCELÓ, D., & PIÑA, B. (2001). Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6), 1152-1158.
- HAAP, T., TRIEBSKORN, R., & KÖHLER, H. R. (2008). Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*, 73(3), 353-359.
- HARTNIK, T., & STYRISHAVE, B. (2008). Impact of Biotransformation and Bioavailability on the Toxicity of the Insecticides α -Cypermethrin and Chlorfenvinphos in Earthworm. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 11057-11064.
- HICKEY, C. W. (1989). Sensitivity of four New Zealand cladoceran species and *Daphnia magna* to aquatic toxicants. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 23(1), 131-137.
- HONG, H. N., KIM, H. N., PARK, K. S., LEE, S. K., & GU, M. B. (2007). Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67(11), 2115-2121.
- HU, C. W., ZHANG, L. J., WANG, W. L., CUI, Y. B., & LI, M. (2014). Evaluation of the combined toxicity of multi-walled carbon nanotubes and sodium pentachlorophenate on the earthworm *Eisenia fetida* using avoidance bioassay and comet assay. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 123-130.
- ISO 17512-1. (2008). Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).
- JI, K., KIM, Y., OH, S., AHN, B., JO, H., & CHOI, K. (2008). Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid on freshwater macroinvertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) and fish (*Oryzias latipes*). *Environmental toxicology and chemistry*, 27(10), 2159-2168.
- JIN, Y. H., LIU, W., SATO, I., NAKAYAMA, S. F., SASAKI, K., SAITO, N., & TSUDA, S. (2009). PFOS and PFOA in environmental and tap water in China. *Chemosphere*, 77(5), 605-611.
- KÜHN, R., PATTARD, M., PERNAK, K. D., & WINTER, A. (1989). Results of the harmful effects of selected water pollutants (anilines, phenols, aliphatic compounds) to *Daphnia magna*. *Water Research*, 23(4), 495-499.
- LANKADURAI, B. P., FURDUI, V. I., REINER, E. J., SIMPSON, A. J., & SIMPSON, M. J. (2013). ¹H NMR-based metabolomic analysis of sub-lethal perfluorooctane sulfonate exposure to the earthworm, *Eisenia fetida*, in soil. *Metabolites*, 3(3), 718-740.
- LIU, Y., WANG, L., PAN, B., WANG, C., BAO, S., & NIE, X. (2017). Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 183, 104-113.
- MARCHINI, S., PASSERINI, L., CESAREO, D., & TOSATO, M. L. (1988). Herbicidal triazines: Acute toxicity on *Daphnia*, fish, and plants and analysis of its relationships with structural factors. *Ecotoxicology and environmental safety*, 16(2), 148-157.
- MEMMERT, U., PEITHER, A., BURRI, R., WEBER, K., SCHMIDT, T., SUMPTER, J. P., & HARTMANN, A. (2013). Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(2), 442-452.
- MESQUITA, N. M. D. C. P. (2005). *Efeitos de dois pesticidas organofosforados em Daphnia spp* (Master's thesis, Universidade de Aveiro).
- MILLER, C. A. (1999). A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicology and applied pharmacology*, 160(3), 297-303.
- OLLER, I., MALATO, S., & SÁNCHEZ-PÉREZ, J. (2011). Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. *Science of the total environment*, 409(20), 4141-4166.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Informe 2015 del PCM sobre el acceso a agua potable y saneamiento: datos esenciales*. <http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp-2015-key-facts/es/> [Consulta: 20 de marzo de 2017]
- ORTON, F., LUTZ, I., KLOAS, W., & ROUTLEDGE, E. J. (2009). Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. *Environmental science & technology*, 43(6), 2144-2150.
- PROPUESTA DE DIRECTIVA 2011/0429 del Parlamento europeo y del Consejo por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52011PC0876&from=ES> (Consultado el 16 de junio de 2017).
- QUEDNOW, K., & PÜTTMANN, W. (2007). Monitoring terbutryn pollution in small rivers of Hesse, Germany. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(12), 1337-1343.
- RIZZO, L. (2011). Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water research*, 45(15), 4311-4340.
- ROBINSON, P. W. (1999). The toxicity of pesticides and organics to mysid shrimps can be predicted from *Daphnia* spp. toxicity data. *Water Research*, 33(6), 1545-1549.

- RODA, A., MIRASOLI, M., MICHELINI, E., MAGLIULO, M., SIMONI, P., GUARDIGLI, M., ... & MARINO, A. (2006).** Analytical approach for monitoring endocrine-disrupting compounds in urban waste water treatment plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(4), 742-752.
- ROSAL, R., RODEA-PALOMARES, I., BOLTES, K., FERNÁNDEZ-PIÑAS, F., LEGANÉS, F., & PETRE, A. (2010).** Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. *Chemosphere*, 81(2), 288-293.
- SCHRIKS, M., HERINGA, M. B., VAN DER KOOI, M. M., DE VOOGT, P., & VAN WEZEL, A. P. (2010).** Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water research*, 44(2), 461-476.
- SILVA, E., BATISTA, S., CAETANO, L., CEREJEIRA, M. J., CHAVES, M., & JACOBSEN, S. E. (2011).** Integrated approach for the quality assessment of freshwater resources in a vineyard area (South Portugal). *Environmental monitoring and assessment*, 176(1), 331-341.
- SINGH, V. K., & SINGH, J. (2006).** Toxicity of industrial wastewater to the aquatic plant *Lemna minor* L. *Journal of environmental biology*, 37(2), 385-390.
- SISMEIRO-VIVAS, J., ABRANTES, N., PEREIRA, J. L., CASTRO, B. B., & GONÇALVES, F. (2007).** Short-term effects of Quirlan®(chlorfenvinphos) on the behavior and acetylcholinesterase activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental toxicology*, 22(2), 194-202.
- STEVENS, J. T., BRECKENRIDGE, C. B., WETZEL, L. T., GILLIS, J. H., LUEMPERT III, L. G., & ELDRIDGE, J. C. (1994).** Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 43(2), 139-153.
- STUART, M., LAPWORTH, D., CRANE, E., & HART, A. (2012).** Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1-21.
- UNE.EN.ISO. 11268-2. (2012).** Calidad del suelo. Efectos de los contaminantes en lombrices de tierra. Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*.
- UNE.EN.ISO. 20079. (2007).** Determinación del efecto tóxico de los constituyentes del agua y de las aguas residuales sobre la lenteja de agua (*Lemna minor*) Ensayo de inhibición del crecimiento de la lenteja de agua.
- UNE.EN.ISO 6341. (2013).** Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna straus* (Cladocera, Crustacea) Ensayo de toxicidad aguda.
- VAN GESTEL, C. A. M., VAN DIS, W. A., VAN BREEMEN, E. M., & SPARENBURG, P. M. (1989).** Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia fetida andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2, 4-dichloroaniline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18(3), 305-312.
- VINGGAARD, A. M., BREINHOLT, V., & LARSEN, J. C. (1999).** Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation in vitro. *Food Additives & Contaminants*, 16(12), 533-542.
- VELISEK, J., STARA, A., MACHOVA, J., DVORAK, P., ZUSKOVA, E., PROKES, M., & SVOBODOVA, Z. (2012).** Effect of terbutryn at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 102(1), 102-108.
- WANG, Y., CANG, T., ZHAO, X., YU, R., CHEN, L., WU, C., & WANG, Q. (2012).** Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 79, 122-128.
- XING, L., SUN, J., LIU, H., & YU, H. (2012).** Combined toxicity of three chlorophenols 2, 4-dichlorophenol, 2, 4, 6-trichlorophenol and pentachlorophenol to *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(6), 1677-1683.
- YANG, S., XU, F., WU, F., WANG, S., & ZHENG, B. (2014).** Development of PFOS and PFOA criteria for the protection of freshwater aquatic life in China. *Science of the Total Environment*, 470, 677-683.
- ZHENG, W., YU, H., WANG, X., & QU, W. (2012).** Systematic review of pentachlorophenol occurrence in the environment and in humans in China: not a negligible health risk due to the re-emergence of schistosomiasis. *Environment international*, 42, 105-116.

7. ANEXO

7.1. Ensayo de toxicidad aguda con *Lemna minor*

7.1.1. Clorfeninfos

7.1.1.1. ANOVA simple: Inhibición del crecimiento (%) según concentración de clorfeninfos.

Variable dependiente: Inhibición CLORF

Factor: Concentración CLORF

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

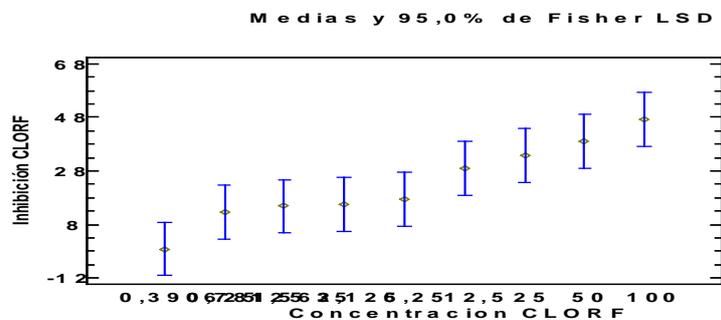


Tabla ANOVA para Inhibición CLORF por Concentración CLORF

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5499,53	8	687,442	5,09	0,0020
Intra grupos	2429,51	18	134,973		
Total (Corr.)	7929,04	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Inhibición CLORF por Concentración CLORF

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,390625	3	-1,05537	X
0,78125	3	12,6148	XX
1,5625	3	14,8732	XXX
3,125	3	15,6212	XXX
6,25	3	17,3464	XXX
12,5	3	29,016	XXX
25	3	33,8039	XX
50	3	39,114	X
100	3	47,122	X

7.1.1.2. ANOVA simple: Área de la curva tasa crecimiento vs tiempo según concentración de clorfeninfos. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Área (tasa) CLORF

Factor: Concentración CLORF

Número de observaciones: 30

Número de niveles: 10

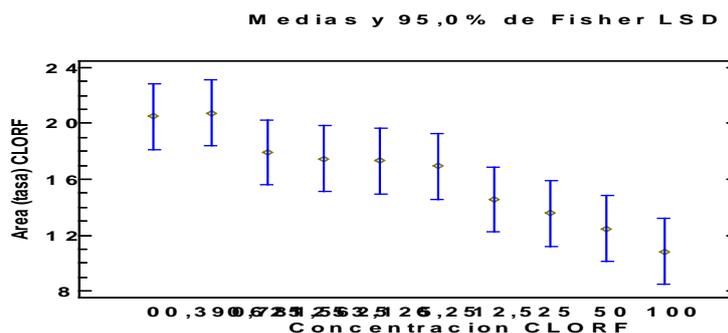


Tabla ANOVA para Área (tasa) CLORF por Concentración CLORF

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	292,072	9	32,4524	4,29	0,0032
Intra grupos	151,279	20	7,56396		
Total (Corr.)	443,351	29			

Pruebas de Múltiple Rangos para Área (tasa) CLORF por Concentración CLORF

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	10,84	x
50	3	12,48	xx
25	3	13,57	xxx
12,5	3	14,5533	xxx
6,25	3	16,9467	xxx
3,125	3	17,2967	xx
1,5625	3	17,4533	xx
0,78125	3	17,9167	xx
0	3	20,5	x
0,390625	3	20,7167	x

7.1.1.3. Análisis Probit. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		25
Rechazados	Perdidos	2
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Conc_CLOR	,565	,040	13,968	,000	,486	,644
Intersección	-1,225	,051	-24,137	,000	-1,276	-1,175

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

	Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	22,231	23	,506 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es mayor que ,150, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Conc_CLOR			Límites de confianza al 95% para log(Conc_CLOR) ^a		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ,010	,011	,004	,027	-1,948	-2,448	-1,569
,020	,034	,013	,072	-1,466	-1,889	-1,144
,030	,069	,029	,134	-1,160	-1,535	-,874
,040	,118	,054	,214	-,930	-1,268	-,670
,050	,181	,089	,313	-,742	-1,052	-,504
,060	,261	,135	,434	-,583	-,868	-,363
,070	,361	,196	,578	-,443	-,708	-,238
,080	,481	,273	,747	-,318	-,564	-,127
,090	,625	,369	,944	-,204	-,433	-,025
,100	,796	,486	1,172	-,099	-,313	,069
,150	2,161	1,509	2,897	,335	,179	,462
,200	4,779	3,634	6,076	,679	,560	,784
,250	9,443	7,492	11,827	,975	,875	1,073
,300	17,408	13,872	22,246	1,241	1,142	1,347
,350	30,683	23,910	41,021	1,487	1,379	1,613
,400	52,538	39,435	74,511	1,720	1,596	1,872
,450	88,400	63,401	133,979	1,946	1,802	2,127
,500	147,519	100,617	239,986	2,169	2,003	2,380
,550	246,175	159,131	431,350	2,391	2,202	2,635
,600	414,213	252,951	784,486	2,617	2,403	2,895
,650	709,237	407,707	1458,112	2,851	2,610	3,164
,700	1250,077	673,387	2805,772	3,097	2,828	3,448
,750	2304,446	1156,044	5692,091	3,363	3,063	3,755
,800	4553,629	2108,315	12524,905	3,658	3,324	4,098
,850	10072,525	4243,648	31432,669	4,003	3,628	4,497
,900	27349,614	10223,270	100134,085	4,437	4,010	5,001
,910	34812,095	12640,583	132486,407	4,542	4,102	5,122
,920	45243,715	15917,929	179589,244	4,656	4,202	5,254
,930	60355,709	20509,396	250935,247	4,781	4,312	5,400
,940	83272,686	27218,036	364620,481	4,921	4,435	5,562
,950	120206,295	37583,989	558403,380	5,080	4,575	5,747
,960	185025,099	54906,592	921418,486	5,267	4,740	5,964
,970	314410,039	87491,211	1705681,140	5,497	4,942	6,232
,980	636201,389	162509,942	3867890,337	5,804	5,211	6,587
,990	1932160,842	431132,918	1,406E7	6,286	5,635	7,148

a. Base del logaritmo = 10.

7.1.2. Diclofenaco

7.1.2.1. ANOVA simple: Inhibición del crecimiento (%) según concentración de diclofenaco.

Variable dependiente: Inhibición DIC

Factor: Concentración DIC

Número de observaciones: 28
 Número de niveles: 10

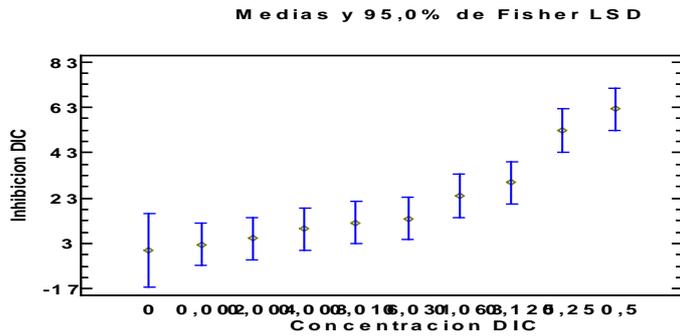


Tabla ANOVA para Inhibición DIC por Concentración DIC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11297,4	9	1255,26	10,50	0,0000
Intra grupos	2151,31	18	119,517		
Total (Corr.)	13448,7	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para Inhibición DIC por Concentración DIC

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	1	0	XX
0,002	3	2,5	X
0,004	3	5,27333	XX
0,008	3	9,38333	XX
0,016	3	12,1167	XXX
0,031	3	13,9567	XXX
0,063	3	23,9533	XX
0,125	3	29,8433	X
0,25	3	52,8267	X
0,5	3	62,15	X

7.1.2.2. ANOVA simple: Área de la curva tasa crecimiento vs tiempo según concentración de diclofenaco. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Área DIC
 Factor: Concentración DIC
 Número de observaciones: 28
 Número de niveles: 10

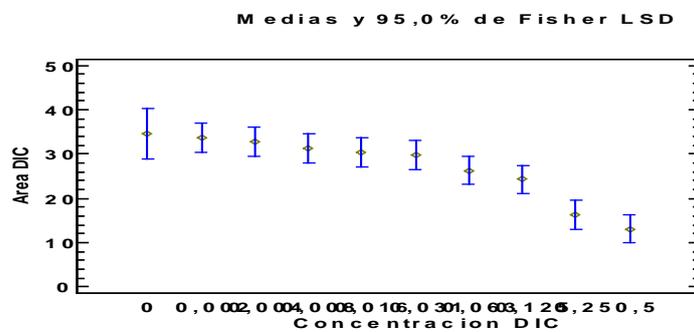


Tabla ANOVA para Área DIC por Concentración DIC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1353,18	9	150,353	10,51	0,0000
Intra grupos	257,624	18	14,3124		

Total (Corr.)	1610,8	27			
---------------	--------	----	--	--	--

Pruebas de Múltiple Rangos para Área DIC por Concentración DIC

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,5	3	13,0967	X
0,25	3	16,3233	X
0,125	3	24,28	X
0,063	3	26,3167	XX
0,031	3	29,7767	XXX
0,016	3	30,4133	XXX
0,008	3	31,36	XX
0,004	3	32,78	XX
0,002	3	33,7433	X
0	1	34,6	XX

7.1.2.3. Análisis Probit. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		23
Rechazados	Perdidos	4
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Conc_DIC	,756	,043	17,729	,000	,673	,840
Intersección	,381	,059	6,499	,000	,322	,440

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	111,781	21	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Conc_DIC			Límites de confianza al 95% para log(Conc_DIC) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,000	,000	,001	-3,581	-4,495	-3,044
,020	,001	,000	,002	-3,220	-4,005	-2,756
,030	,001	,000	,003	-2,991	-3,695	-2,572
,040	,002	,000	,004	-2,819	-3,463	-2,434
,050	,002	,001	,005	-2,679	-3,274	-2,320
,060	,003	,001	,006	-2,560	-3,114	-2,223
,070	,004	,001	,007	-2,456	-2,974	-2,138
,080	,004	,001	,009	-2,362	-2,849	-2,061
,090	,005	,002	,010	-2,277	-2,736	-1,990
,100	,006	,002	,012	-2,199	-2,632	-1,925
,150	,013	,006	,022	-1,875	-2,208	-1,649
,200	,024	,013	,038	-1,617	-1,882	-1,419
,250	,040	,024	,062	-1,396	-1,616	-1,209
,300	,063	,040	,099	-1,197	-1,393	-1,004
,350	,097	,063	,159	-1,014	-1,201	-,799
,400	,145	,093	,256	-,839	-1,031	-,592
,450	,214	,133	,414	-,670	-,876	-,383
,500	,313	,187	,674	-,504	-,729	-,171
,550	,459	,259	1,109	-,338	-,586	,045
,600	,678	,360	1,850	-,169	-,444	,267
,650	1,013	,502	3,155	,006	-,299	,499
,700	1,547	,711	5,561	,190	-,148	,745
,750	2,443	1,030	10,283	,388	,013	1,012
,800	4,065	1,554	20,448	,609	,191	1,311
,850	7,356	2,502	45,679	,867	,398	1,660
,900	15,518	4,544	125,930	1,191	,657	2,100
,910	18,583	5,247	160,936	1,269	,720	2,207
,920	22,604	6,133	210,102	1,354	,788	2,322
,930	28,035	7,280	281,704	1,448	,862	2,450
,940	35,658	8,816	390,936	1,552	,945	2,592
,950	46,912	10,964	568,184	1,671	1,040	2,754
,960	64,751	14,162	881,782	1,811	1,151	2,945
,970	96,230	19,395	1514,028	1,983	1,288	3,180
,980	162,944	29,446	3107,389	2,212	1,469	3,492
,990	373,719	56,825	9657,837	2,573	1,755	3,985

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.1.3. Pentaclorofenol

7.1.3.1. ANOVA simple: Inhibición del crecimiento (%) según concentración de pentaclorofenol.

Variable dependiente: Inhibición PENT
 Factor: Concentración PENT
 Número de observaciones: 28
 Número de niveles: 10

Medias y 95,0% de Fisher LSD

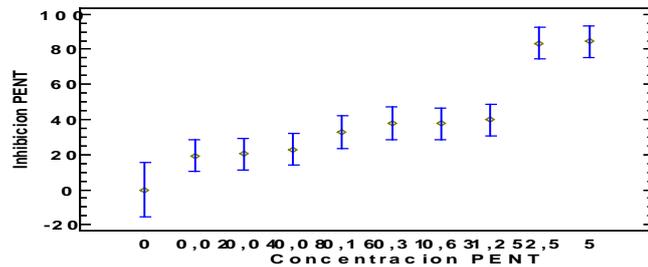


Tabla ANOVA para Inhibición PENT por Concentración PENT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16684,1	9	1853,79	16,47	0,0000
Intra grupos	2025,69	18	112,539		
Total (Corr.)	18709,8	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para Inhibición PENT por Concentración PENT
 Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	1	0	X
0,02	3	19,2314	XX
0,04	3	20,4484	XXX
0,08	3	22,8779	XXXX
0,16	3	32,7756	XXX
0,63	3	37,6804	XX
0,31	3	37,8509	XX
1,25	3	39,648	X
2,5	3	83,5312	X
5	3	84,3479	X

7.1.3.2. ANOVA simple: Área de la curva tasa crecimiento vs tiempo según concentración de pentaclorofenol. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Área PENT
 Factor: Concentración PENT
 Número de observaciones: 28
 Número de niveles: 10

Medias y 95,0% de Fisher LSD

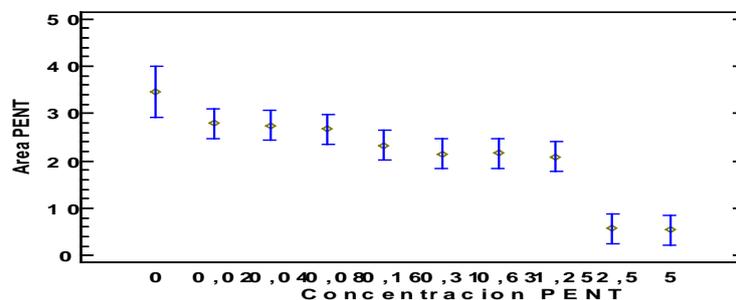


Tabla ANOVA para Área PENT por Concentración PENT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1998,4	9	222,045	16,47	0,0000
Intra grupos	242,724	18	13,4847		
Total (Corr.)	2241,12	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para Área PENT por Concentración PENT

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	5,41333	X
2,5	3	5,7	X
1,25	3	20,8833	X
0,31	3	21,5067	XX
0,63	3	21,5667	XX
0,16	3	23,2633	XXX
0,08	3	26,69	XXXX
0,04	3	27,5333	XXX
0,02	3	27,9533	XX
0	1	34,6	X

7.1.3.3. Análisis Probit. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		27
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Conc_PENT	,764	,035	21,696	,000	,695	,834
Intersección	,154	,030	5,077	,000	,124	,184

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	229,880	25	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Conc_PENT			Límites de confianza al 95% para log(Conc_PENT) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,001	,000	,003	-3,244	-4,402	-2,592
,020	,001	,000	,005	-2,888	-3,905	-2,312
,030	,002	,000	,007	-2,662	-3,590	-2,133
,040	,003	,000	,010	-2,491	-3,354	-1,998
,050	,004	,001	,013	-2,353	-3,162	-1,888
,060	,006	,001	,016	-2,235	-2,999	-1,794
,070	,007	,001	,019	-2,132	-2,856	-1,711
,080	,009	,002	,023	-2,039	-2,729	-1,637
,090	,011	,002	,027	-1,955	-2,613	-1,570
,100	,013	,003	,031	-1,878	-2,507	-1,507
,150	,028	,009	,057	-1,557	-2,069	-1,245
,200	,050	,019	,093	-1,302	-1,726	-1,032
,250	,082	,036	,143	-1,084	-1,438	-,844
,300	,130	,065	,215	-,887	-1,187	-,667
,350	,197	,109	,321	-,705	-,963	-,494
,400	,293	,173	,481	-,533	-,762	-,318
,450	,431	,263	,731	-,366	-,580	-,136
,500	,629	,387	1,135	-,201	-,413	,055
,550	,919	,555	1,803	-,037	-,255	,256
,600	1,349	,788	2,939	,130	-,103	,468
,650	2,008	1,116	4,939	,303	,048	,694
,700	3,053	1,593	8,625	,485	,202	,936
,750	4,798	2,320	15,875	,681	,366	1,201
,800	7,937	3,501	31,531	,900	,544	1,499
,850	14,272	5,622	70,595	1,154	,750	1,849
,900	29,863	10,141	195,807	1,475	1,006	2,292
,910	35,693	11,685	250,700	1,553	1,068	2,399
,920	43,322	13,627	327,988	1,637	1,134	2,516
,930	53,607	16,132	440,859	1,729	1,208	2,644
,940	68,004	19,473	613,592	1,833	1,289	2,788
,950	89,202	24,126	894,913	1,950	1,382	2,952
,960	122,691	31,020	1394,821	2,089	1,492	3,145
,970	181,555	42,230	2408,165	2,259	1,626	3,382
,980	305,670	63,592	4980,488	2,485	1,803	3,697
,990	694,772	121,072	15676,220	2,842	2,083	4,195

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.1.4. PFO

7.1.4.1. ANOVA simple: Inhibición del crecimiento (%) según concentración de PFO.

Variable dependiente: Inhibición PFO
 Factor: Concentración PFO

Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 9

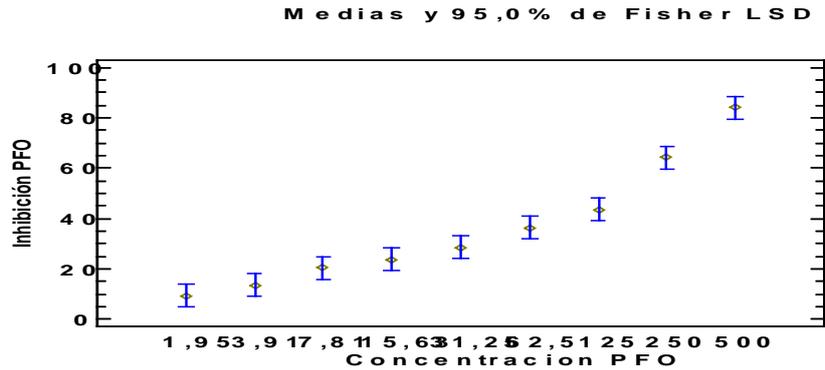


Tabla ANOVA para Inhibición PFO por Concentración PFO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14458,1	8	1807,26	66,82	0,0000
Intra grupos	486,874	18	27,0485		
Total (Corr.)	14945,0	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Inhibición PFO por Concentración PFO

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1,95	3	9,42988	X
3,91	3	13,6502	XX
7,81	3	20,3803	XX
15,63	3	23,8414	X
31,25	3	28,6971	XX
62,5	3	36,3229	XX
125	3	43,5093	X
250	3	64,2382	X
500	3	84,1129	X

7.1.4.2. ANOVA simple: Área de la curva tasa crecimiento vs tiempo según concentración de PFO. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Área (tasa) PFO

Factor: Concentración PFO

Número de observaciones: 30

Número de niveles: 10

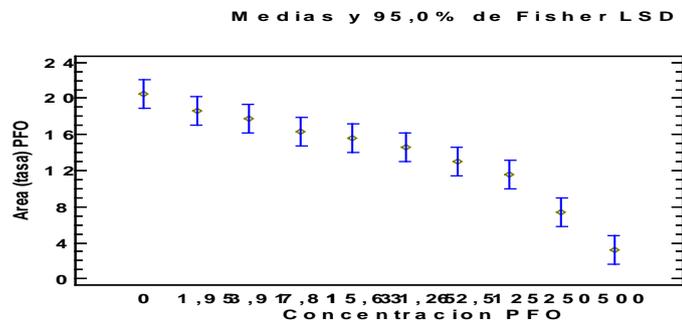


Tabla ANOVA para Área (tasa) PFO por Concentración PFO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	754,759	9	83,8621	24,09	0,0000
Intra grupos	69,625	20	3,48125		
Total (Corr.)	824,384	29			

Pruebas de Múltiple Rangos para Área (tasa) PFO por Concentración PFO

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
500	3	3,25667	x
250	3	7,33	x
125	3	11,58	x
62,5	3	13,0567	xx
31,25	3	14,6167	xxx
15,63	3	15,6133	xxx
7,81	3	16,3233	xx
3,91	3	17,7	xxx
1,95	3	18,5633	xx
0	3	20,5	x

7.1.4.3. Análisis Probit. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		27
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Conc_PFO	,853	,037	23,031	,000	,781	,926
Intersección	-1,707	,066	-25,883	,000	-1,772	-1,641

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	82,581	25	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Conc_PFO			Límites de confianza al 95% para log(Conc_PFO) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,188	,063	,417	-,726	-1,201	-,380
,020	,392	,151	,790	-,407	-,822	-,102
,030	,625	,262	1,186	-,204	-,582	,074
,040	,888	,397	1,611	-,052	-,402	,207
,050	1,181	,556	2,068	,072	-,255	,316
,060	1,506	,740	2,559	,178	-,131	,408
,070	1,864	,950	3,085	,270	-,022	,489
,080	2,256	1,189	3,650	,353	,075	,562
,090	2,683	1,457	4,254	,429	,164	,629
,100	3,148	1,757	4,900	,498	,245	,690
,150	6,099	3,789	8,840	,785	,578	,946
,200	10,318	6,920	14,249	1,014	,840	1,154
,250	16,198	11,492	21,671	1,209	1,060	1,336
,300	24,286	17,920	31,935	1,385	1,253	1,504
,350	35,346	26,709	46,318	1,548	1,427	1,666
,400	50,466	38,509	66,769	1,703	1,586	1,825
,450	71,225	54,212	96,256	1,853	1,734	1,983
,500	99,976	75,137	139,375	2,000	1,876	2,144
,550	140,333	103,295	203,460	2,147	2,014	2,308
,600	198,059	141,835	300,724	2,297	2,152	2,478
,650	282,785	195,870	452,581	2,451	2,292	2,656
,700	411,571	274,159	699,011	2,614	2,438	2,844
,750	617,072	392,822	1121,028	2,790	2,594	3,050
,800	968,720	584,672	1902,190	2,986	2,767	3,279
,850	1638,703	927,056	3532,255	3,215	2,967	3,548
,900	3175,089	1651,287	7716,746	3,502	3,218	3,887
,910	3725,091	1897,725	9322,883	3,571	3,278	3,970
,920	4431,083	2207,037	11450,121	3,647	3,344	4,059
,930	5362,738	2605,300	14355,304	3,729	3,416	4,157
,940	6636,618	3135,174	18482,112	3,822	3,496	4,267
,950	8462,765	3871,605	24659,339	3,928	3,588	4,392
,960	11259,992	4959,730	34609,564	4,052	3,695	4,539
,970	15996,024	6723,391	52515,494	4,204	3,828	4,720
,980	25509,364	10071,070	91447,928	4,407	4,003	4,961
,990	53230,477	19027,249	219346,084	4,726	4,279	5,341

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.1.5. Terbutrina

7.1.5.1. ANOVA simple: Inhibición del crecimiento (%) según concentración de terbutrina.

Variable dependiente: Inhibición TER

Factor: Concentración TER

Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 9

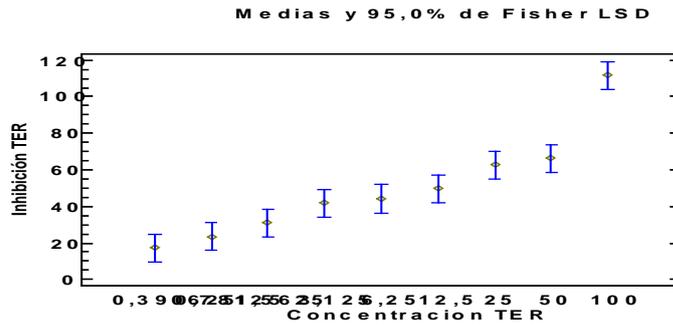


Tabla ANOVA para Inhibición TER por Concentración TER

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	19294,9	8	2411,86	30,13	0,0000
Intra grupos	1440,81	18	80,0448		
Total (Corr.)	20735,7	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Inhibición TER por Concentración TER
 Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,390625	3	17,3667	X
0,78125	3	23,6	X
1,5625	3	31,0667	XX
3,125	3	41,8333	XX
6,25	3	44,0667	XX
12,5	3	49,7333	XX
25	3	62,6	XX
50	3	66,2667	X
100	3	111,533	X

7.1.5.2. ANOVA simple: Área de la curva tasa crecimiento vs tiempo según concentración de terbutrina. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Área (tasa) TER
 Factor: Concentración TER
 Número de observaciones: 30
 Número de niveles: 10

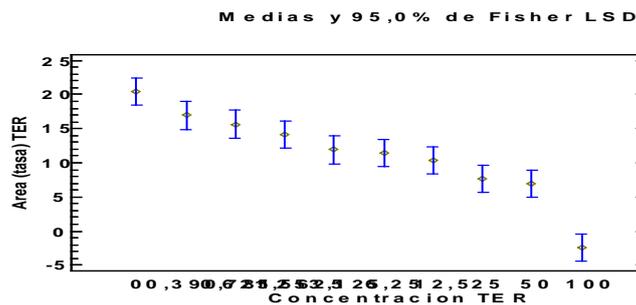


Tabla ANOVA para Área (tasa) TER por Concentración TER

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1094,45	9	121,605	22,21	0,0000
Intra grupos	109,52	20	5,476		
Total (Corr.)	1203,97	29			

Pruebas de Múltiple Rangos para Área (tasa) TER por Concentración TER
 Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos

100	3	-2,4	x
50	3	6,93333	x
25	3	7,66667	xx
12,5	3	10,3	xxx
6,25	3	11,4667	xx
3,125	3	11,9	xx
1,5625	3	14,1333	xxx
0,78125	3	15,6667	xx
0,390625	3	16,9333	xx
0	3	20,5	x

7.1.5.3. Análisis Probit. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		24
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	3
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Conc_TER	,638	,040	16,005	,000	,560	,717
Intersección	-,632	,038	-16,447	,000	-,671	-,594

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	66,460	22	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Conc_TER			Límites de confianza al 95% para log(Conc_TER) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,002	,000	,009	-2,654	-3,641	-2,023
,020	,006	,001	,021	-2,227	-3,092	-1,673
,030	,011	,002	,035	-1,956	-2,744	-1,450
,040	,018	,003	,052	-1,752	-2,483	-1,282
,050	,026	,005	,072	-1,586	-2,270	-1,145
,060	,036	,008	,094	-1,445	-2,090	-1,029
,070	,048	,012	,118	-1,321	-1,931	-,927
,080	,062	,016	,146	-1,211	-1,790	-,835
,090	,078	,022	,177	-1,110	-1,661	-,751
,100	,096	,029	,212	-1,017	-1,543	-,674
,150	,233	,088	,443	-,633	-1,055	-,353
,200	,470	,214	,803	-,328	-,670	-,095
,250	,859	,453	1,351	-,066	-,344	,131
,300	1,475	,876	2,184	,169	-,058	,339
,350	2,436	1,583	3,477	,387	,199	,541
,400	3,921	2,701	5,553	,593	,432	,745
,450	6,214	4,388	9,020	,793	,642	,955
,500	9,777	6,857	14,997	,990	,836	1,176
,550	15,383	10,457	25,551	1,187	1,019	1,407
,600	24,380	15,786	44,660	1,387	1,198	1,650
,650	39,241	23,886	80,455	1,594	1,378	1,906
,700	64,801	36,665	150,796	1,812	1,564	2,178
,750	111,344	57,891	298,761	2,047	1,763	2,475
,800	203,443	95,839	642,566	2,308	1,982	2,808
,850	410,749	171,826	1574,872	2,614	2,235	3,197
,900	994,268	356,883	4883,018	2,998	2,553	3,689
,910	1230,930	425,610	6420,541	3,090	2,629	3,808
,920	1552,287	515,275	8645,423	3,191	2,712	3,937
,930	2003,271	635,717	11993,146	3,302	2,803	4,079
,940	2663,481	803,660	17288,764	3,425	2,905	4,238
,950	3685,883	1049,786	26241,943	3,567	3,021	4,419
,960	5398,914	1436,545	42856,831	3,732	3,157	4,632
,970	8631,637	2111,823	78348,635	3,936	3,325	4,894
,980	16106,166	3523,126	174785,906	4,207	3,547	5,243
,990	43048,947	7887,434	619532,892	4,634	3,897	5,792

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

7.2.1. Clorfenvinfos

7.2.1.1. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de clorfenvinfos a las 24 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Clorfenvinfos
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

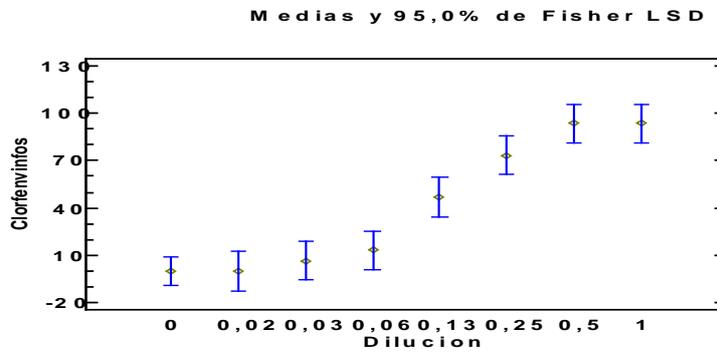


Tabla ANOVA para Clorfenvinfos por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	40029,6	7	5718,52	27,16	0,0000
Intra grupos	4000,0	19	210,526		
Total (Corr.)	44029,6	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Clorfenvinfos por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	0	X
0,02	3	0	X
0,03	3	6,66667	X
0,06	3	13,3333	X
0,13	3	46,6667	X
0,25	3	73,3333	X
0,5	3	93,3333	X
1	3	93,3333	X

7.2.1.2. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de clorfenvinfos a las 48 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Clorfenvinfos
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

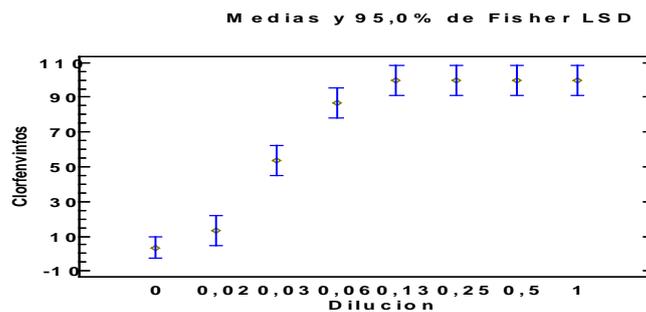


Tabla ANOVA para Clorfenvinfos por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	47133,3	7	6733,33	66,17	0,0000
Intra grupos	1933,33	19	101,754		
Total (Corr.)	49066,7	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Clorfenvinfos por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	3,33333	X
0,02	3	13,3333	X
0,03	3	53,3333	X
0,06	3	86,6667	X
0,25	3	100,0	X
0,5	3	100,0	X
0,13	3	100,0	X
1	3	100,0	X

7.2.1.3. Análisis Probit a las 24 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	6
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	2,394	,082	29,072	,000	2,233	2,555
Intersección	1,971	,078	25,363	,000	1,893	2,049

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	386,208	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,016	,005	,030	-1,795	-2,290	-1,527
,020	,021	,007	,037	-1,681	-2,126	-1,437
,030	,025	,010	,042	-1,609	-2,022	-1,380
,040	,028	,011	,046	-1,555	-1,944	-1,336
,050	,031	,013	,050	-1,510	-1,880	-1,300
,060	,034	,015	,054	-1,473	-1,827	-1,270
,070	,036	,017	,057	-1,440	-1,780	-1,243
,080	,039	,018	,060	-1,410	-1,738	-1,218
,090	,041	,020	,064	-1,383	-1,701	-1,196
,100	,044	,022	,067	-1,359	-1,666	-1,176
,150	,055	,030	,081	-1,256	-1,524	-1,089
,200	,067	,039	,096	-1,175	-1,413	-1,018
,250	,079	,048	,111	-1,105	-1,320	-,955
,300	,091	,058	,127	-1,042	-1,238	-,896
,350	,104	,068	,145	-,984	-1,165	-,839
,400	,118	,080	,165	-,929	-1,098	-,783
,450	,133	,092	,188	-,876	-1,035	-,727
,500	,150	,106	,214	-,823	-,976	-,669
,550	,170	,121	,246	-,771	-,918	-,609
,600	,192	,137	,285	-,717	-,863	-,545
,650	,218	,156	,333	-,662	-,807	-,477
,700	,249	,177	,395	-,604	-,751	-,404
,750	,287	,203	,477	-,542	-,693	-,322
,800	,337	,234	,591	-,472	-,631	-,228
,850	,407	,275	,764	-,390	-,560	-,117
,900	,515	,336	1,061	-,288	-,474	,026
,910	,545	,352	1,149	-,263	-,453	,061
,920	,580	,371	1,254	-,236	-,431	,098
,930	,621	,392	1,381	-,207	-,407	,140
,940	,670	,417	1,539	-,174	-,380	,187
,950	,731	,447	1,741	-,136	-,349	,241
,960	,809	,485	2,014	-,092	-,314	,304
,970	,917	,537	2,410	-,038	-,270	,382
,980	1,083	,612	3,063	,035	-,213	,486
,990	1,407	,753	4,477	,148	-,123	,651

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.1.4. Análisis Probit a las 48 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	3,899	,190	20,472	,000	3,526	4,272
Intersección	5,904	,287	20,602	,000	5,618	6,191

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	87,167	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,008	,005	,010	-2,111	-2,297	-1,988
,020	,009	,006	,012	-2,041	-2,209	-1,929
,030	,010	,007	,013	-1,997	-2,153	-1,892
,040	,011	,008	,014	-1,963	-2,111	-1,864
,050	,012	,008	,014	-1,936	-2,077	-1,841
,060	,012	,009	,015	-1,913	-2,048	-1,821
,070	,013	,009	,016	-1,893	-2,023	-1,804
,080	,013	,010	,016	-1,875	-2,000	-1,788
,090	,014	,010	,017	-1,858	-1,980	-1,774
,100	,014	,011	,017	-1,843	-1,961	-1,761
,150	,017	,013	,020	-1,780	-1,883	-1,707
,200	,019	,015	,022	-1,730	-1,822	-1,663
,250	,021	,017	,024	-1,687	-1,771	-1,625
,300	,022	,019	,026	-1,649	-1,725	-1,589
,350	,024	,021	,028	-1,613	-1,683	-1,556
,400	,026	,023	,030	-1,579	-1,645	-1,524
,450	,028	,025	,032	-1,547	-1,608	-1,492
,500	,031	,027	,035	-1,514	-1,573	-1,459
,550	,033	,029	,038	-1,482	-1,538	-1,426
,600	,036	,031	,041	-1,449	-1,504	-1,391
,650	,038	,034	,044	-1,416	-1,470	-1,354
,700	,042	,037	,049	-1,380	-1,436	-1,314
,750	,046	,040	,054	-1,341	-1,399	-1,269
,800	,050	,044	,060	-1,299	-1,360	-1,219
,850	,056	,048	,069	-1,249	-1,315	-1,159
,900	,065	,055	,083	-1,186	-1,259	-1,082
,910	,068	,057	,086	-1,171	-1,246	-1,063
,920	,070	,059	,091	-1,154	-1,232	-1,043
,930	,073	,061	,095	-1,136	-1,216	-1,021
,940	,077	,063	,101	-1,116	-1,199	-,995
,950	,081	,066	,108	-1,093	-1,179	-,967
,960	,086	,070	,117	-1,065	-1,156	-,933
,970	,093	,075	,128	-1,032	-1,127	-,891
,980	,103	,081	,146	-,988	-1,090	-,835
,990	,121	,093	,179	-,918	-1,031	-,747

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.2. Diclofenaco

7.2.2.1. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de diclofenaco a las 24 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Diclofenaco
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

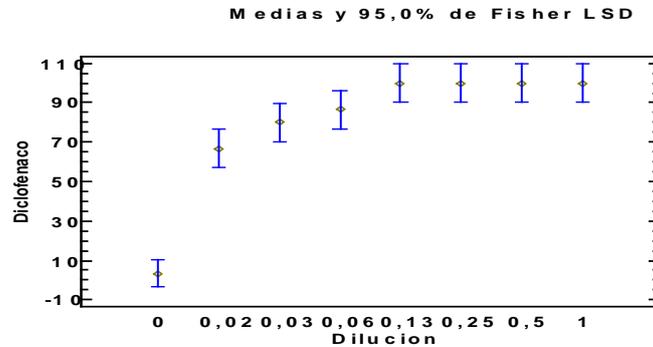


Tabla ANOVA para Diclofenaco por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	38600,0	7	5514,29	42,47	0,0000
Intra grupos	2466,67	19	129,825		
Total (Corr.)	41066,7	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diclofenaco por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	3,33333	X
0,02	3	66,6667	X
0,03	3	80,0	XX
0,06	3	86,6667	XX
0,25	3	100,0	X
0,5	3	100,0	X
0,13	3	100,0	X
1	3	100,0	X

7.2.2.2. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de diclofenaco a las 48 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Diclofenaco
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

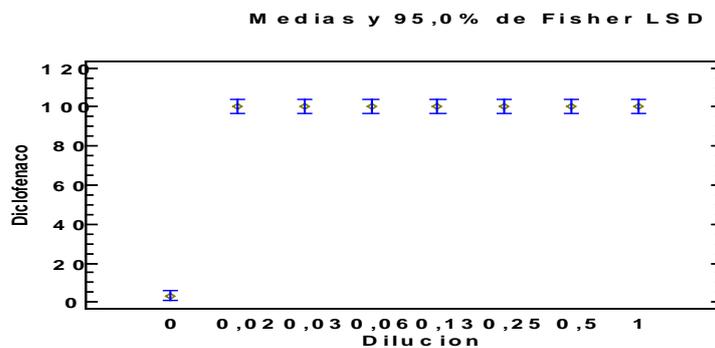


Tabla ANOVA para Diclofenaco por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	43607,4	7	6229,63	355,09	0,0000
Intra grupos	333,333	19	17,5439		
Total (Corr.)	43940,7	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diclofenaco por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	3,33333	X
0,03	3	100,0	X
1	3	100,0	X
0,13	3	100,0	X
0,25	3	100,0	X
0,5	3	100,0	X
0,06	3	100,0	X
0,02	3	100,0	X

7.2.2.3. Análisis Probit a las 24 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	6
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	2,137	,173	12,322	,000	1,797	2,477
Intersección	4,025	,259	15,528	,000	3,765	4,284

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	224,666	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,001	,000	,004	-2,972	-5,094	-2,404
,020	,001	,000	,005	-2,844	-4,788	-2,323
,030	,002	,000	,005	-2,763	-4,595	-2,271
,040	,002	,000	,006	-2,702	-4,449	-2,231
,050	,002	,000	,006	-2,653	-4,331	-2,199
,060	,002	,000	,007	-2,611	-4,230	-2,172
,070	,003	,000	,007	-2,574	-4,142	-2,148
,080	,003	,000	,007	-2,541	-4,063	-2,127
,090	,003	,000	,008	-2,511	-3,991	-2,107
,100	,003	,000	,008	-2,483	-3,925	-2,089
,150	,004	,000	,010	-2,368	-3,652	-2,014
,200	,005	,000	,011	-2,277	-3,435	-1,954
,250	,006	,001	,013	-2,199	-3,250	-1,902
,300	,007	,001	,014	-2,129	-3,084	-1,855
,350	,009	,001	,015	-2,063	-2,930	-1,811
,400	,010	,002	,017	-2,002	-2,786	-1,768
,450	,011	,002	,019	-1,942	-2,646	-1,726
,500	,013	,003	,021	-1,883	-2,510	-1,684
,550	,015	,004	,023	-1,824	-2,376	-1,640
,600	,017	,006	,026	-1,765	-2,241	-1,593
,650	,020	,008	,029	-1,703	-2,105	-1,542
,700	,023	,011	,033	-1,638	-1,967	-1,482
,750	,027	,015	,039	-1,568	-1,828	-1,407
,800	,032	,020	,049	-1,489	-1,692	-1,306
,850	,040	,027	,069	-1,398	-1,563	-1,158
,900	,052	,036	,117	-1,284	-1,440	-,933
,910	,055	,038	,134	-1,256	-1,415	-,874
,920	,059	,041	,155	-1,226	-1,389	-,809
,930	,064	,044	,183	-1,193	-1,361	-,737
,940	,070	,047	,222	-1,156	-1,331	-,654
,950	,077	,050	,276	-1,114	-1,299	-,559
,960	,086	,055	,359	-1,064	-1,262	-,445
,970	,099	,061	,496	-1,003	-1,218	-,305
,980	,120	,069	,766	-,922	-1,161	-,116
,990	,160	,084	1,528	-,795	-1,074	,184

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.2.4. Análisis Probit a las 48 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	2,289	,321	7,121	,000	1,659	2,919
Intersección	5,172	,536	9,658	,000	4,637	5,708

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	94,918	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,001	,000	,002	-3,276	-6,395	-2,623
,020	,001	,000	,003	-3,157	-6,049	-2,550
,030	,001	,000	,003	-3,081	-5,829	-2,504
,040	,001	,000	,003	-3,025	-5,664	-2,469
,050	,001	,000	,004	-2,978	-5,529	-2,441
,060	,001	,000	,004	-2,939	-5,415	-2,417
,070	,001	,000	,004	-2,904	-5,315	-2,396
,080	,001	,000	,004	-2,874	-5,225	-2,377
,090	,001	,000	,004	-2,845	-5,143	-2,360
,100	,002	,000	,005	-2,820	-5,068	-2,344
,150	,002	,000	,005	-2,713	-4,757	-2,278
,200	,002	,000	,006	-2,627	-4,510	-2,225
,250	,003	,000	,007	-2,554	-4,299	-2,180
,300	,003	,000	,007	-2,489	-4,109	-2,139
,350	,004	,000	,008	-2,428	-3,933	-2,101
,400	,004	,000	,009	-2,370	-3,767	-2,065
,450	,005	,000	,009	-2,315	-3,606	-2,029
,500	,005	,000	,010	-2,260	-3,448	-1,994
,550	,006	,001	,011	-2,205	-3,290	-1,959
,600	,007	,001	,012	-2,149	-3,130	-1,922
,650	,008	,001	,013	-2,091	-2,966	-1,884
,700	,009	,002	,014	-2,031	-2,794	-1,842
,750	,011	,002	,016	-1,965	-2,610	-1,795
,800	,013	,004	,018	-1,892	-2,408	-1,740
,850	,016	,007	,022	-1,807	-2,183	-1,666
,900	,020	,012	,029	-1,700	-1,931	-1,541
,910	,021	,013	,032	-1,674	-1,879	-1,502
,920	,023	,015	,035	-1,646	-1,828	-1,454
,930	,024	,017	,040	-1,615	-1,779	-1,395
,940	,026	,019	,048	-1,580	-1,731	-1,321
,950	,029	,021	,059	-1,541	-1,684	-1,230
,960	,032	,023	,077	-1,495	-1,636	-1,114
,970	,036	,026	,108	-1,438	-1,586	-,965
,980	,043	,030	,174	-1,362	-1,526	-,759
,990	,057	,036	,376	-1,243	-1,441	-,425

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.3. Pentaclorofenol

7.2.3.1. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de pentaclorofenol a las 24 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Pentaclorofenol
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

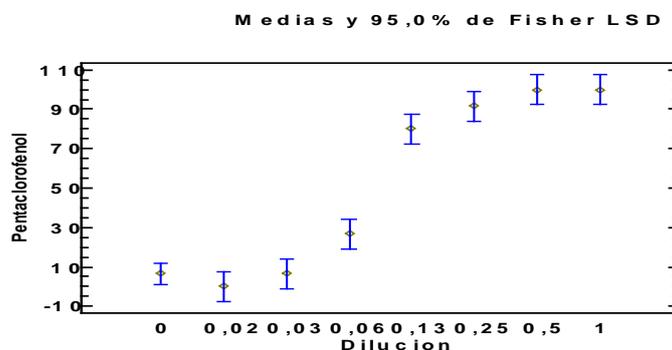


Tabla ANOVA para Pentaclorofenol por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	48607,4	7	6943,92	88,94	0,0000
Intra grupos	1483,33	19	78,0702		
Total (Corr.)	50090,7	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Pentaclorofenol por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,02	3	0	X
0,03	3	6,66667	X
0	6	6,66667	X
0,06	3	26,6667	X
0,13	3	80,0	X
0,25	3	91,6667	XX
0,5	3	100,0	X
1	3	100,0	X

7.2.3.2. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de pentaclorofenol a las 48 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Pentaclorofenol
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

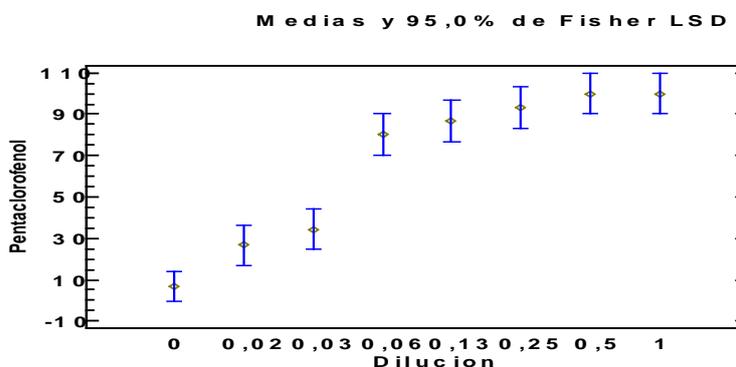


Tabla ANOVA para Pentaclorofenol por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	38615,8	7	5516,54	40,54	0,0000
Intra grupos	2585,19	19	136,063		
Total (Corr.)	41201,0	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Pentaclorofenol por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	6,66667	X
0,02	3	26,6667	X
0,03	3	34,4433	X
0,06	3	80,0	X
0,13	3	86,6667	XX
0,25	3	93,3333	XX
0,5	3	100,0	X
1	3	100,0	X

7.2.3.3. Análisis Probit a las 24 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	6
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	3,580	,137	26,113	,000	3,311	3,848
Intersección	3,816	,154	24,818	,000	3,663	3,970

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	178,913	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b			
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior	
PROBIT ^a	,010	,019	,011	,027	-1,716	-1,945	-1,570
	,020	,023	,014	,031	-1,640	-1,846	-1,507
	,030	,026	,016	,034	-1,592	-1,784	-1,466
	,040	,028	,018	,037	-1,555	-1,737	-1,435
	,050	,030	,020	,039	-1,526	-1,699	-1,410
	,060	,032	,022	,041	-1,500	-1,667	-1,389
	,070	,033	,023	,043	-1,478	-1,639	-1,370
	,080	,035	,024	,044	-1,459	-1,614	-1,353
	,090	,036	,026	,046	-1,441	-1,591	-1,338
	,100	,038	,027	,048	-1,424	-1,570	-1,323
	,150	,044	,033	,055	-1,356	-1,485	-1,263
	,200	,050	,038	,061	-1,301	-1,418	-1,214
	,250	,056	,043	,067	-1,255	-1,362	-1,171
	,300	,061	,049	,074	-1,213	-1,312	-1,131
	,350	,067	,054	,081	-1,174	-1,267	-1,094
	,400	,073	,060	,088	-1,137	-1,225	-1,057
	,450	,079	,065	,095	-1,101	-1,186	-1,020
	,500	,086	,071	,104	-1,066	-1,148	-,983
	,550	,093	,077	,114	-1,031	-1,112	-,945
	,600	,101	,084	,124	-,995	-1,076	-,905
	,650	,110	,091	,137	-,959	-1,039	-,863
	,700	,120	,100	,152	-,920	-1,002	-,818
	,750	,133	,109	,171	-,878	-,962	-,768
	,800	,148	,120	,194	-,831	-,920	-,711
	,850	,167	,135	,227	-,777	-,871	-,644
	,900	,196	,155	,277	-,708	-,811	-,558
	,910	,203	,160	,290	-,692	-,797	-,537
	,920	,212	,165	,306	-,674	-,781	-,515
	,930	,222	,172	,324	-,654	-,764	-,489
	,940	,233	,180	,346	-,632	-,746	-,461
	,950	,247	,189	,372	-,607	-,724	-,429
	,960	,265	,200	,406	-,577	-,699	-,391
	,970	,288	,215	,453	-,541	-,669	-,344
	,980	,322	,235	,523	-,492	-,628	-,282
	,990	,383	,272	,656	-,416	-,565	-,183

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.3.4. Análisis Probit a las 48 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	2,104	,092	22,773	,000	1,923	2,285
Intersección	3,103	,126	24,558	,000	2,976	3,229

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	291,653	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,003	,000	,006	-2,581	-3,321	-2,220
,020	,004	,001	,008	-2,451	-3,121	-2,122
,030	,004	,001	,009	-2,369	-2,995	-2,060
,040	,005	,001	,010	-2,307	-2,900	-2,013
,050	,006	,002	,011	-2,257	-2,823	-1,974
,060	,006	,002	,011	-2,214	-2,757	-1,941
,070	,007	,002	,012	-2,176	-2,700	-1,912
,080	,007	,002	,013	-2,143	-2,648	-1,887
,090	,008	,003	,014	-2,112	-2,602	-1,863
,100	,008	,003	,014	-2,084	-2,559	-1,841
,150	,011	,004	,018	-1,967	-2,382	-1,750
,200	,013	,006	,021	-1,875	-2,244	-1,676
,250	,016	,007	,024	-1,795	-2,126	-1,611
,300	,019	,010	,028	-1,724	-2,021	-1,552
,350	,022	,012	,032	-1,658	-1,926	-1,495
,400	,025	,015	,036	-1,595	-1,837	-1,440
,450	,029	,018	,041	-1,535	-1,753	-1,384
,500	,034	,021	,047	-1,475	-1,673	-1,327
,550	,038	,025	,054	-1,415	-1,596	-1,267
,600	,044	,030	,063	-1,354	-1,521	-1,202
,650	,051	,036	,074	-1,292	-1,448	-1,132
,700	,059	,042	,089	-1,226	-1,375	-1,052
,750	,070	,050	,109	-1,154	-1,302	-,962
,800	,084	,060	,139	-1,075	-1,225	-,856
,850	,104	,072	,187	-,982	-1,141	-,727
,900	,136	,091	,276	-,866	-1,041	-,559
,910	,145	,096	,303	-,838	-1,018	-,518
,920	,156	,102	,336	-,807	-,992	-,473
,930	,169	,108	,377	-,773	-,965	-,423
,940	,184	,116	,429	-,736	-,935	-,367
,950	,203	,126	,497	-,693	-,900	-,303
,960	,228	,138	,592	-,643	-,860	-,228
,970	,263	,154	,734	-,581	-,812	-,134
,980	,317	,179	,979	-,499	-,748	-,009
,990	,427	,225	1,544	-,369	-,648	,189

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.4. PFO

7.2.4.1. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de PFO a las 24 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: PFO

Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

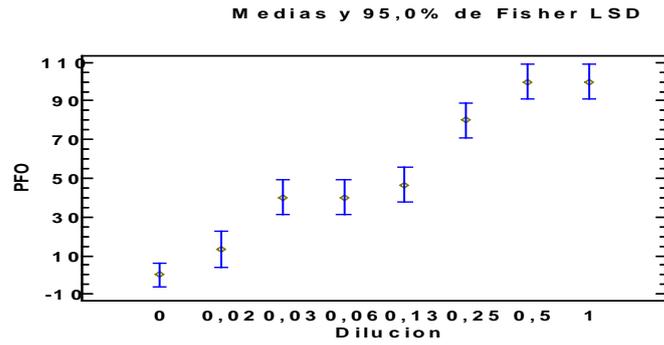


Tabla ANOVA para PFO por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	37066,7	7	5295,24	47,16	0,0000
Intra grupos	2133,33	19	112,281		
Total (Corr.)	39200,0	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para PFO por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	0	X
0,02	3	13,3333	X
0,03	3	40,0	X
0,06	3	40,0	X
0,13	3	46,6667	X
0,25	3	80,0	X
0,5	3	100,0	X
1	3	100,0	X

7.2.4.2. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de PFO a las 48 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: PFO
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

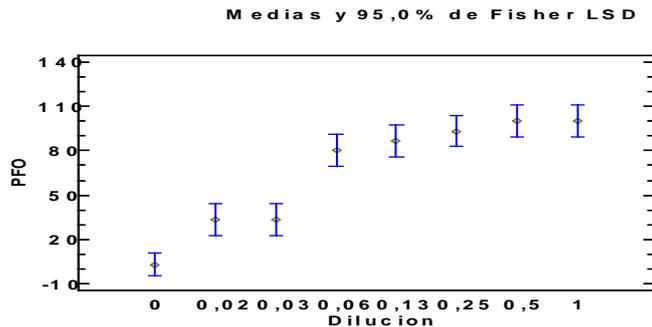


Tabla ANOVA para PFO por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	39785,2	7	5683,6	36,00	0,0000
Intra grupos	3000,0	19	157,895		
Total (Corr.)	42785,2	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para PFO por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	0	X
0,02	3	30,0	X
0,03	3	30,0	X
0,06	3	80,0	X
0,13	3	80,0	X
0,25	3	90,0	X
0,5	3	100,0	X
1	3	100,0	X

0	6	3,33333	X
0,03	3	33,3333	X
0,02	3	33,3333	X
0,06	3	80,0	X
0,13	3	86,6667	X
0,25	3	93,3333	X
0,5	3	100,0	X
1	3	100,0	X

7.2.4.3. Análisis Probit a las 24 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	6
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	1,778	,069	25,633	,000	1,642	1,914
Intersección	2,007	,081	24,803	,000	1,926	2,088

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	249,150	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,004	,001	,008	-2,437	-3,037	-2,101
,020	,005	,002	,010	-2,284	-2,822	-1,980
,030	,007	,002	,013	-2,187	-2,686	-1,903
,040	,008	,003	,014	-2,114	-2,584	-1,844
,050	,009	,003	,016	-2,054	-2,501	-1,797
,060	,010	,004	,018	-2,003	-2,431	-1,756
,070	,011	,004	,019	-1,959	-2,369	-1,720
,080	,012	,005	,021	-1,919	-2,314	-1,688
,090	,013	,005	,022	-1,883	-2,264	-1,659
,100	,014	,006	,023	-1,850	-2,218	-1,632
,150	,019	,009	,030	-1,712	-2,029	-1,518
,200	,025	,013	,037	-1,602	-1,881	-1,426
,250	,031	,018	,045	-1,508	-1,756	-1,346
,300	,038	,023	,054	-1,424	-1,645	-1,271
,350	,045	,029	,063	-1,346	-1,545	-1,200
,400	,054	,035	,074	-1,271	-1,452	-1,130
,450	,063	,043	,087	-1,200	-1,365	-1,059
,500	,074	,052	,103	-1,129	-1,283	-,987
,550	,087	,062	,123	-1,058	-1,204	-,911
,600	,103	,074	,148	-,986	-1,128	-,830
,650	,122	,089	,181	-,912	-1,053	-,742
,700	,147	,106	,225	-,834	-,977	-,647
,750	,178	,126	,288	-,750	-,898	-,540
,800	,221	,153	,382	-,656	-,814	-,418
,850	,284	,191	,534	-,546	-,720	-,273
,900	,391	,249	,820	-,408	-,604	-,086
,910	,422	,265	,910	-,375	-,576	-,041
,920	,459	,284	1,020	-,339	-,547	,009
,930	,502	,306	1,157	-,299	-,514	,063
,940	,557	,333	1,332	-,254	-,478	,124
,950	,625	,366	1,565	-,204	-,437	,194
,960	,717	,409	1,892	-,144	-,389	,277
,970	,849	,468	2,390	-,071	-,330	,378
,980	1,062	,559	3,266	,026	-,252	,514
,990	1,512	,740	5,350	,180	-,131	,728

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.4.4. Análisis Probit a las 48 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	1,290	,061	21,326	,000	1,172	1,409
Intersección	1,746	,074	23,674	,000	1,672	1,819

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	322,369	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,001	,000	,003	-3,156	-4,576	-2,538
,020	,001	,000	,004	-2,945	-4,224	-2,385
,030	,002	,000	,005	-2,810	-4,001	-2,287
,040	,002	,000	,006	-2,710	-3,834	-2,214
,050	,002	,000	,007	-2,628	-3,698	-2,153
,060	,003	,000	,008	-2,558	-3,582	-2,102
,070	,003	,000	,009	-2,497	-3,481	-2,057
,080	,004	,000	,010	-2,442	-3,390	-2,017
,090	,004	,000	,010	-2,392	-3,308	-1,980
,100	,005	,001	,011	-2,346	-3,233	-1,946
,150	,007	,001	,016	-2,156	-2,921	-1,803
,200	,010	,002	,020	-2,005	-2,675	-1,688
,250	,013	,003	,026	-1,876	-2,465	-1,588
,300	,017	,005	,032	-1,759	-2,280	-1,496
,350	,022	,008	,039	-1,652	-2,110	-1,408
,400	,028	,011	,048	-1,549	-1,952	-1,321
,450	,035	,016	,058	-1,450	-1,803	-1,233
,500	,044	,022	,072	-1,353	-1,662	-1,142
,550	,056	,030	,090	-1,256	-1,527	-1,044
,600	,070	,040	,116	-1,157	-1,399	-,936
,650	,088	,053	,153	-1,054	-1,276	-,814
,700	,113	,070	,212	-,946	-1,158	-,674
,750	,148	,091	,307	-,830	-1,042	-,512
,800	,199	,119	,477	-,701	-,923	-,321
,850	,282	,161	,814	-,550	-,794	-,089
,900	,437	,229	1,627	-,360	-,641	,211
,910	,485	,248	1,928	-,314	-,605	,285
,920	,545	,272	2,320	-,264	-,566	,365
,930	,618	,299	2,846	-,209	-,524	,454
,940	,711	,334	3,578	-,148	-,477	,554
,950	,835	,377	4,651	-,078	-,424	,668
,960	1,009	,435	6,335	,004	-,362	,802
,970	1,273	,517	9,275	,105	-,286	,967
,980	1,733	,650	15,425	,239	-,187	1,188
,990	2,818	,930	34,490	,450	-,031	1,538

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.5. Terbutrina

7.2.5.1. ANOVA simple: Inhibición de la movilidad (%) según concentración de terbutrina a las 24 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Terbutrina

Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

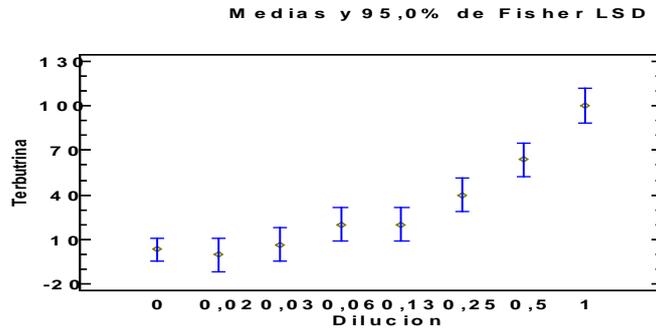


Tabla ANOVA para Terbutrina por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27591,2	7	3941,6	22,53	0,0000
Intra grupos	3324,09	19	174,952		
Total (Corr.)	30915,3	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Terbutrina por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,02	3	0	X
0	6	3,33333	X
0,03	3	6,66667	X
0,13	3	20,0	XX
0,06	3	20,0	XX
0,25	3	40,0	X
0,5	3	63,89	X
1	3	100,0	X

7.2.5.2. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según concentración de terbutrina a las 48 horas. Determinación del valor NOEC.

Variable dependiente: Terbutrina
 Factor: Dilución
 Número de observaciones: 27
 Número de niveles: 8

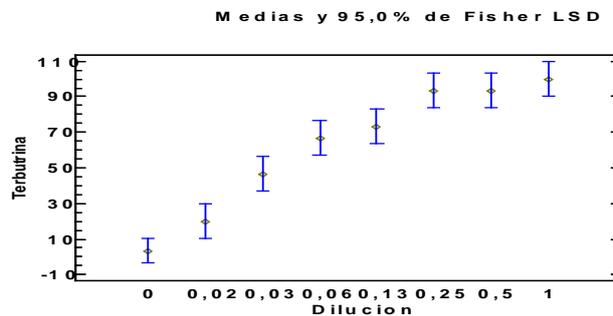


Tabla ANOVA para Terbutrina por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	36200,0	7	5171,43	39,83	0,0000
Intra grupos	2466,67	19	129,825		
Total (Corr.)	38666,7	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Terbutrina por Dilución

Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	6	3,33333	x
0,02	3	20,0	x
0,03	3	46,6667	x
0,06	3	66,6667	x
0,13	3	73,3333	x
0,5	3	93,3333	x
0,25	3	93,3333	x
1	3	100,0	x

7.2.5.3. Análisis Probit a las 24 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	6
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	1,973	,074	26,502	,000	1,827	2,119
Intersección	1,181	,064	18,571	,000	1,118	1,245

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	362,447	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b			
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior	
PROBIT ^a	,010	,017	,004	,034	-1,778	-2,371	-1,472
	,020	,023	,007	,043	-1,640	-2,165	-1,364
	,030	,028	,009	,051	-1,552	-2,034	-1,296
	,040	,033	,012	,057	-1,486	-1,937	-1,243
	,050	,037	,014	,063	-1,432	-1,858	-1,201
	,060	,041	,016	,069	-1,387	-1,791	-1,164
	,070	,045	,019	,074	-1,347	-1,732	-1,131
	,080	,049	,021	,079	-1,311	-1,680	-1,102
	,090	,053	,023	,084	-1,278	-1,633	-1,075
	,100	,056	,026	,089	-1,248	-1,590	-1,050
	,150	,075	,039	,114	-1,124	-1,413	-,945
	,200	,094	,053	,139	-1,025	-1,277	-,857
	,250	,115	,069	,167	-,941	-1,163	-,778
	,300	,137	,086	,198	-,865	-1,065	-,704
	,350	,161	,105	,234	-,794	-,978	-,631
	,400	,187	,126	,277	-,727	-,900	-,557
	,450	,218	,149	,329	-,662	-,828	-,483
	,500	,252	,174	,393	-,599	-,760	-,406
	,550	,292	,201	,473	-,535	-,696	-,325
	,600	,339	,233	,575	-,470	-,634	-,241
	,650	,395	,268	,707	-,403	-,572	-,151
	,700	,465	,310	,884	-,333	-,509	-,053
	,750	,554	,360	1,131	-,257	-,443	,054
	,800	,673	,425	1,495	-,172	-,372	,175
	,850	,845	,512	2,079	-,073	-,291	,318
	,900	1,124	,644	3,163	,051	-,191	,500
	,910	1,205	,680	3,503	,081	-,167	,544
	,920	1,299	,722	3,915	,113	-,142	,593
	,930	1,410	,770	4,425	,149	-,113	,646
	,940	1,546	,828	5,074	,189	-,082	,705
	,950	1,718	,899	5,934	,235	-,046	,773
	,960	1,944	,989	7,135	,289	-,005	,853
	,970	2,263	1,113	8,955	,355	,046	,952
	,980	2,769	1,300	12,120	,442	,114	1,084
	,990	3,806	1,659	19,557	,580	,220	1,291

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.5.4. Análisis Probit a las 48 horas. Determinación de la EC₅₀.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		21
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	1,548	,068	22,728	,000	1,414	1,681
Intersección	2,213	,087	25,521	,000	2,127	2,300

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	522,618	19	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a ,010	,001	,000	,005	-2,933	-4,610	-2,327
,020	,002	,000	,006	-2,757	-4,273	-2,205
,030	,002	,000	,007	-2,645	-4,060	-2,127
,040	,003	,000	,009	-2,561	-3,899	-2,068
,050	,003	,000	,010	-2,493	-3,769	-2,019
,060	,004	,000	,011	-2,435	-3,658	-1,978
,070	,004	,000	,011	-2,384	-3,562	-1,942
,080	,005	,000	,012	-2,338	-3,475	-1,909
,090	,005	,000	,013	-2,296	-3,396	-1,880
,100	,006	,000	,014	-2,258	-3,324	-1,852
,150	,008	,001	,018	-2,100	-3,026	-1,737
,200	,011	,002	,023	-1,974	-2,791	-1,644
,250	,014	,003	,027	-1,866	-2,591	-1,562
,300	,017	,004	,033	-1,769	-2,414	-1,486
,350	,021	,006	,039	-1,679	-2,252	-1,413
,400	,025	,008	,046	-1,594	-2,102	-1,341
,450	,031	,011	,054	-1,511	-1,960	-1,268
,500	,037	,015	,064	-1,430	-1,826	-1,191
,550	,045	,020	,078	-1,349	-1,697	-1,108
,600	,054	,027	,097	-1,266	-1,574	-1,015
,650	,066	,035	,123	-1,181	-1,457	-,910
,700	,081	,045	,163	-1,091	-1,344	-,788
,750	,101	,058	,227	-,994	-1,235	-,644
,800	,130	,075	,338	-,886	-1,127	-,471
,850	,174	,097	,553	-,760	-1,012	-,258
,900	,250	,132	1,056	-,602	-,880	,024
,910	,273	,141	1,238	-,564	-,850	,093
,920	,300	,152	1,474	-,522	-,817	,169
,930	,334	,165	1,788	-,477	-,782	,252
,940	,375	,181	2,221	-,426	-,743	,347
,950	,429	,200	2,848	-,367	-,699	,454
,960	,502	,225	3,819	-,299	-,648	,582
,970	,610	,259	5,488	-,215	-,586	,739
,980	,789	,313	8,910	-,103	-,505	,950
,990	1,183	,418	19,207	,073	-,379	1,283

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.2.6. Mezcla

7.2.6.1. ANOVA simple: Inhibición del movilidad (%) según dilución de la mezcla a las 24 horas. Determinación del valor LID.

Variable dependiente: %Inhibición

Factor: Dilución
 Número de observaciones: 36
 Número de niveles: 9

Medias y 95,0% de Fisher LSD

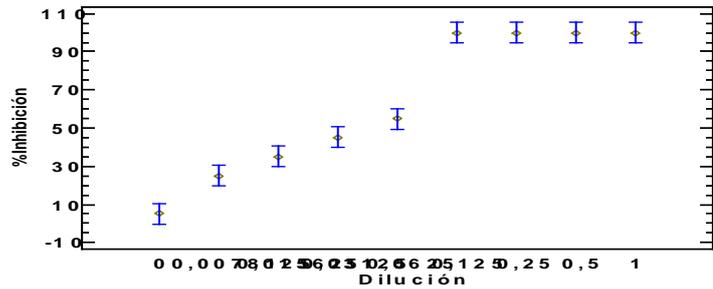


Tabla ANOVA para %Inhibición por Dilución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	45822,2	8	5727,78	103,10	0,0000
Intra grupos	1500,0	27	55,5556		
Total (Corr.)	47322,2	35			

Pruebas de Múltiple Rangos para %Inhibición por Dilución
 Método: 95,0 porcentaje LSD

Dilución	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	4	5,0	X
0,0078125	4	25,0	X
0,015625	4	35,0	XX
0,03125	4	45,0	XX
0,0625	4	55,0	X
0,25	4	100,0	X
0,125	4	100,0	X
1	4	100,0	X
0,5	4	100,0	X

7.2.6.2. Análisis Probit a las 24 horas. Determinación del valor MID.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		32
Rechazados	Perdidos	4
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dilución	1,898	,064	29,642	,000	1,773	2,024
Intersección	2,983	,099	30,252	,000	2,884	3,081

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

	Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	266,231	30	,000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dilución			Límites de confianza al 95% para log(Dilución) ^b			
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior	
PROBIT ^a	,010	,002	,001	,003	-2,797	-3,156	-2,554
	,020	,002	,001	,004	-2,653	-2,977	-2,433
	,030	,003	,001	,004	-2,562	-2,864	-2,356
	,040	,003	,002	,005	-2,493	-2,779	-2,298
	,050	,004	,002	,006	-2,438	-2,710	-2,251
	,060	,004	,002	,006	-2,390	-2,651	-2,210
	,070	,004	,003	,007	-2,349	-2,600	-2,175
	,080	,005	,003	,007	-2,311	-2,554	-2,143
	,090	,005	,003	,008	-2,277	-2,512	-2,114
	,100	,006	,003	,008	-2,246	-2,474	-2,087
	,150	,008	,005	,011	-2,117	-2,316	-1,976
	,200	,010	,006	,013	-2,014	-2,191	-1,886
	,250	,012	,008	,016	-1,926	-2,085	-1,808
	,300	,014	,010	,018	-1,847	-1,991	-1,737
	,350	,017	,012	,021	-1,774	-1,905	-1,670
	,400	,020	,015	,025	-1,705	-1,825	-1,605
	,450	,023	,018	,029	-1,637	-1,749	-1,541
	,500	,027	,021	,033	-1,571	-1,676	-1,476
	,550	,031	,025	,039	-1,505	-1,605	-1,409
	,600	,037	,029	,046	-1,438	-1,534	-1,339
	,650	,043	,034	,054	-1,368	-1,464	-1,264
	,700	,051	,041	,066	-1,295	-1,392	-1,183
	,750	,061	,048	,081	-1,216	-1,316	-1,093
	,800	,075	,058	,102	-1,128	-1,235	-,991
	,850	,094	,072	,135	-1,025	-1,142	-,870
	,900	,127	,094	,193	-,896	-1,028	-,714
	,910	,136	,100	,211	-,865	-1,000	-,677
	,920	,148	,107	,232	-,831	-,971	-,635
	,930	,161	,115	,257	-,794	-,938	-,590
	,940	,177	,125	,289	-,752	-,902	-,539
	,950	,197	,138	,331	-,705	-,862	-,481
	,960	,224	,154	,387	-,649	-,814	-,412
	,970	,263	,176	,470	-,580	-,755	-,328
	,980	,324	,210	,609	-,489	-,678	-,215
	,990	,451	,278	,918	-,346	-,556	-,037

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

7.3. Ensayo de toxicidad crónica con *Eisenia fetida*.

7.3.1. ANOVA simple: Tasa de crecimiento (%) según el contaminante al que es expuesto.

7.3.1.1. ANOVA simple a los 7 días

Variable dependiente: Tasa_7d

Factor: Muestra

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

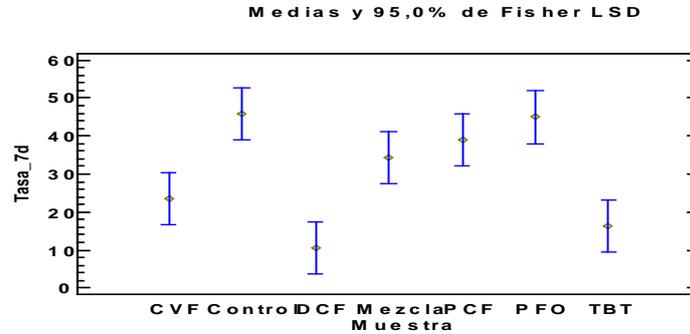


Tabla ANOVA para Tasa_7d por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3543,35	6	590,558	9,56	0,0003
Intra grupos	864,945	14	61,7818		
Total (Corr.)	4408,29	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa_7d por Muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
DCF	3	10,466	X
TBT	3	16,2777	X
CVF	3	23,5627	XX
Mezcla	3	34,456	XX
PCF	3	38,998	X
PFO	3	44,974	X
Control	3	45,7357	X

7.3.1.2. ANOVA simple a los 14 días

Variable dependiente: Tasa_14d

Factor: Muestra

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

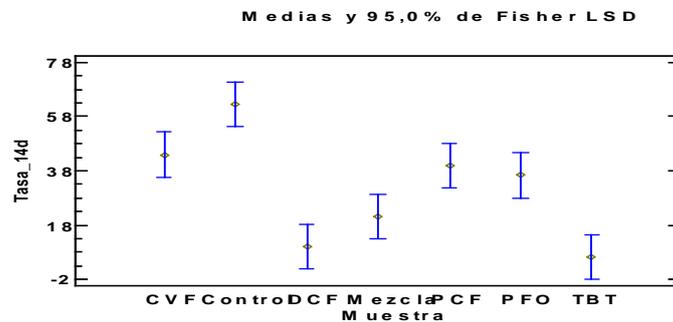


Tabla ANOVA para Tasa_14d por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7213,84	6	1202,31	13,64	0,0000
Intra grupos	1234,08	14	88,1482		
Total (Corr.)	8447,91	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa_14d por Muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TBT	3	6,388	X
DCF	3	10,247	X
Mezcla	3	21,1343	XX
PFO	3	36,323	XX
PCF	3	39,9137	X
CVF	3	43,957	X
Control	3	62,5747	X

7.3.1.3. ANOVA simple a los 21 días

Variable dependiente: Tasa_21d

Factor: Muestra

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7.

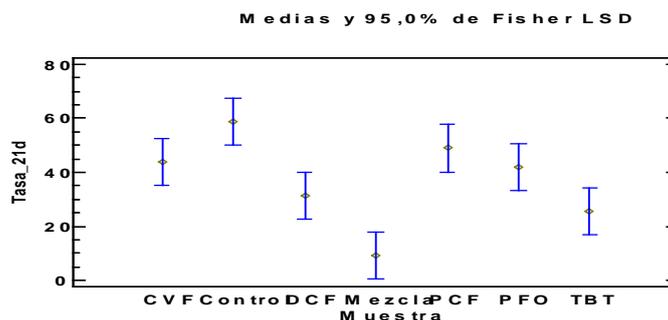


Tabla ANOVA para Tasa_21d por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4864,16	6	810,693	8,30	0,0006
Intra grupos	1366,67	14	97,6191		
Total (Corr.)	6230,83	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa_21d por Muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	9,19633	X
TBT	3	25,7667	XX
DCF	3	31,459	XX
PFO	3	41,9327	XXX
CVF	3	44,0547	XX
PCF	3	48,8877	X
Control	3	58,8223	X

7.3.1.4. ANOVA simple a los 28 días

Variable dependiente: Tasa_28d

Factor: Muestra

Número de observaciones: 21
 Número de niveles: 7

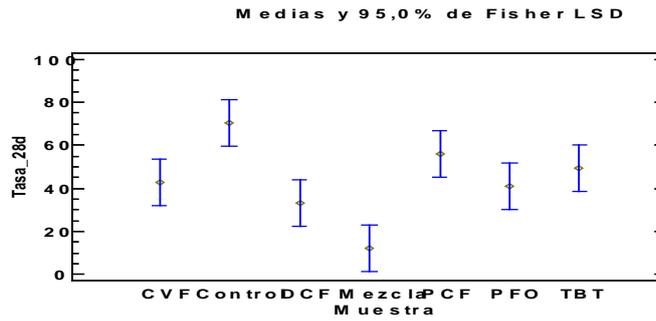


Tabla ANOVA para Tasa_28d por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5965,94	6	994,323	6,54	0,0019
Intra grupos	2127,38	14	151,956		
Total (Corr.)	8093,32	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa_28d por Muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	12,4437	X
DCF	3	33,255	XX
PFO	3	40,8637	XX
CVF	3	42,5777	XX
TBT	3	49,4833	XXX
PCF	3	56,2873	XX
Control	3	70,1857	X

7.3.2. ANOVA simple: Número de huevos según el contaminante al que es expuesto tras 28 días

Variable dependiente: N_huevos
 Factor: Muestra
 Número de observaciones: 21
 Número de niveles: 7

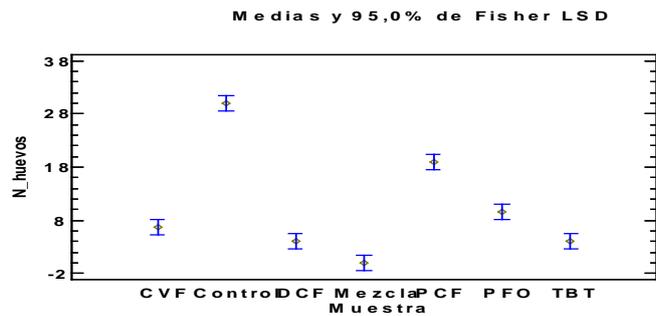


Tabla ANOVA para N_huevos por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1987,9	6	331,317	124,24	0,0000
Intra grupos	37,3333	14	2,66667		
Total (Corr.)	2025,24	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para N_huevos por Muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	0	X
DCF	3	4,0	X
TBT	3	4,0	X
CVF	3	6,66667	X
PFO	3	9,66667	X

PCF	3	19,0	X
Control	3	30,0	X

7.3.3. ANOVA simple: Porcentaje de respuesta neta (%) según el contaminante al que es expuesto en el ensayo de repulsión.

Variable dependiente: Respuesta

Factor: Muestra

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

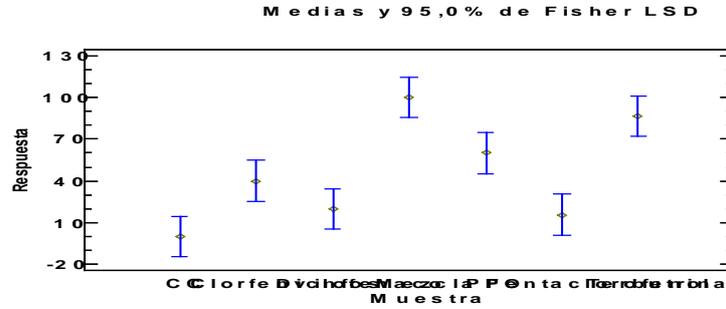


Tabla ANOVA para Respuesta por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25523,4	6	4253,9	15,40	0,0000
Intra grupos	3866,19	14	276,157		
Total (Corr.)	29389,6	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Respuesta por Muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CC	3	0	X
Pentaclorofenol	3	15,7667	XX
Diclofenaco	3	20,0	XX
Clorfenvinfos	3	40,0	XX
PFO	3	60,0	XX
Terbutrina	3	86,6667	XX
Mezcla	3	100,0	X