



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA
SUPERIOR ENGINYERS
INDUSTRIALS VALÈNCIA

Curs Acadèmic:



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Academic year:

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, y a aquellas personas que considero forman parte de ella.

Gracias por todo.

RESUMEN

En el presente documento se exponen dos procedimientos de trabajo diferentes para la determinación de la toxicidad de ciertas muestras de agua contaminada con Norfloxacino (un antibiótico) y sometidas a un proceso de oxidación avanzada para intentar eliminar este compuesto. El primer método se basa en el ensayo de bioluminiscencia empleando la bacteria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) mediante el equipo Microtox, y el segundo método consiste en una prueba estática de toxicidad aguda utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), del que se han obtenido resultados basados en la germinación así como en el crecimiento de las radículas. Además, se han analizado diferentes electrodos y condiciones de trabajo empleados en el proceso de oxidación avanzada para determinar qué electrodo y en qué condiciones consigue una mayor disminución de la toxicidad de la muestra inicial.

Palabras clave: toxicidad, antibiótico, Norfloxacino, oxidación avanzada

RESUM

En el present document s'exposen dos procediments de treball diferents per a la determinació de la toxicitat de certes mostres d'aigua contaminada amb Norfloxacino (un antibiòtic) i sotmeses a un procés d'oxidació avançada per intentar eliminar aquest compost. El primer mètode està basat en l'assaig de bioluminescència emprant la bactèria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) a través de l'equip Microtox, i el segon mètode consisteix en una prova estàtica de toxicitat aguda emprant llavors de lletuga (*Lactuca sativa*), del qual s'han obtingut resultats basats en la germinació així com en el creixement radicular. A més, s'han analitzat diferents elèctrodes i condicions de treball utilitzats en el procés d'oxidació avançada per tal d'establir quin elèctrode i en quines condicions aconseguix una major disminució de la toxicitat de la mostra inicial.

Paraules clau: toxicitat, antibiòtic, Norfloxacino, oxidació avançada

ABSTRACT

In this document, two different working procedures to determine the toxicity of certain water samples contaminated previously with Norfloxacin (antibiotic) and subjected to an advanced oxidation process are defined. On one hand, based on the bioluminescence test using the *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) bacterium via Microtox, and on the other hand in which an static toxicity test is carried out using lettuce seeds (*Lactuca sativa*), which has given results based on germination in addition to radicle growth results. Different electrodes utilized in the advanced oxidation process have been analyzed in order to establish the one who has achieved higher toxicity reduction compared to the non-treated initial sample.

Key words: toxicity, antibiotic, Norfloxacin, advanced oxidation

DOCUMENTOS DEL TFG

- DOCUMENTO I: MEMORIA
- DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

ÍNDICE DE LA MEMORIA

LISTADO DE FIGURAS	5
LISTADO DE TABLAS	6
1. OBJETIVOS DEL TRABAJO	8
2. PREFACIO Y MOTIVACIÓN	9
3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA Y CONCEPTUAL	11
3.1 – TOXICIDAD	11
3.2 – PH	12
3.3 – MÉTODOS DE OXIDACIÓN AVANZADA.....	13
3.4 – DQO	13
3.5 – COT	14
3.6 – NORFLOXACINO.....	15
4. ANTECEDENTES, PROPUESTAS Y JUSTIFICACIÓN	15
5. METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	16
5.1 – COMPROBACIÓN Y AJUSTE DEL VALOR DE PH.....	16
5.1.1 - <i>Introducción</i>	16
5.1.2 – <i>Materiales y equipos</i>	17
5.1.3 – <i>Procedimiento experimental para el ajuste del pH (en caso de ser necesario)</i>	17
5.2 - ENSAYO DE BIOLUMINISCENCIA CON MICROTOX	19
5.2.1 - <i>Introducción</i>	19
5.2.2 - <i>Ventajas</i>	20
5.2.3 - <i>Condiciones del experimento</i>	21
5.2.4 – <i>Materiales y equipos</i>	21
5.2.5 - <i>DESARROLLO EXPERIMENTAL</i>	21
5.2.5.1 - <i>Puesta a punto del equipo Microtox</i>	21
5.2.5.2 - <i>Preparación del reactivo</i>	22
5.2.5.3 - <i>Preparación de las cubetas</i>	22
5.2.5.4 - <i>Introducción del diluyente y de la muestra</i>	22
5.2.5.5 - <i>Introducción del reactivo</i>	23
5.2.5.6 - <i>Toma de valores inicial</i>	23
5.2.5.7 - <i>Puesta en contacto del reactivo con la muestra</i>	23
5.2.5.8 - <i>Toma de valores final</i>	23
5.2.5.9 - <i>Análisis de los datos y resultados</i>	23
5.2.6 - <i>Problemática durante el desarrollo</i>	25
5.3 - ENSAYO ESTÁTICO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA	25
5.3.1 – <i>Introducción</i>	25
5.3.2 - <i>Ventajas</i>	26
5.3.3 - <i>Condiciones del experimento</i>	27
5.3.4 - <i>Material necesario</i>	27
5.3.5 - <i>DESARROLLO EXPERIMENTAL</i>	27
5.3.5.1 - <i>Preparación de las placas de Petri</i>	27
5.3.5.2 - <i>Impregnación del papel de filtro</i>	28
5.3.5.3 - <i>Colocación de las semillas</i>	28

5.3.5.4 – Almacenaje	28
5.3.5.5 - Medición y toma de resultados	29
5.3.6 - Problemática durante el desarrollo	30
5.3.6.1 - Aparición de hongos	30
5.3.6.2 - Propuesta frente a los hongos – Esterilizado + Almacenamiento en frigorífico	31
5.3.6.3 - Nueva propuesta – Semillas nuevas	32
5.3.7 - <i>Procesado de datos</i>	33
6. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 – MÉTODO MICROTOX.....	35
6.2 - MÉTODO DE LAS SEMILLAS	40
6.3 - COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS MÉTODOS.....	50
6.3.1 - Trabajo a $I=cte.=15mA$. Variable Temperatura de sinterizado ($^{\circ}C$).....	51
6.3.2 - Trabajo a $E=cte.=2,5V_{Ag/ClAg}$. Variable Temperatura de sinterizado ($^{\circ}C$)	52
6.3.3 - Trabajo a $T^{\circ}=cte.=1200^{\circ}C$ (R20). Variable Intensidad (mA)	54
6.3.4 - Trabajo a $T^{\circ}=cte.=1250^{\circ}C$ (R30). Variable potencial de electrodo (E).....	55
6.3.5 - Electrodo BDD. Variable Potencial de electrodo (E).....	57
6.3.6 – Comparativa entre electrodo cerámico y electrodo BDD.....	58
7. CONCLUSIONES	60
8. SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS.....	62
8.1 - MEDICIÓN Y AJUSTE DEL PH.....	62
8.2 – MICROTOX	62
8.3 - MÉTODO DE LAS SEMILLAS	62
11. BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN	69
2. PRESUPUESTOS PARCIALES	69
2.1 – Equipos y material	69
2.2 - Mano de obra	71
3. PRESUPUESTO TOTAL	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Carbono total y sus fracciones	14
Figura 2. Tiras indicadoras de pH	17
Figura 3. Medidor de pH electrónico	17
Figura 5. Electrodo soporte	18
Figura 4. Montaje experimental para ajustar el pH	18
Figura 6. Esquema del proceso de ajuste del pH	19
Figura 7. Microtox 500	20
Figura 8. Parte de los materiales empleados en el método del Microtox	21
Figura 9. Esquematación del ensayo con el equipo Microtox	22
Figura 10. Pipetas micrométricas empleadas	22
Figura 11: Hoja de datos del programa Microtox	24
Figura 12. Esquema del ensayo con el equipo Microtox	25
Figura 14. Preparación de las placas de Petri	27
Figura 15. Proceso de impregnado del papel de filtro	28
Figura 16. Proceso de colocación de las semillas y resultado final de una placa	28
Figura 17. Semillas después del proceso de germinación y detalle del proceso de medición	29
Figura 19. Aparición de hongos puntuales en semillas, impidiendo su germinación	30
Figura 20. Esquema del proceso de esterilizado de las semillas	31
Figura 21. Germinación nula tras el proceso de esterilizado	32
Figura 22. Nueva variedad de Lactuca Sativa adquirida y Condiciones de Germinación	33
Figura 23. Imagen del programa estadístico empleado, Past UIO	34
Figura 24. Crecimiento radicular medio y EC50 – Ensayo 1	42
Figura 25. Crecimiento radicular medio y EC50 - Ensayo 2	44
Figura 26. Crecimiento radicular medio y EC50 - Ensayo 3	46
Figura 27. Crecimiento radicular medio y EC50- Ensayo 4	47
Figura 19. Crecimiento radicular medio y EC50 - Ensayo 5	49
Figura 29. Comparativa UT y Germinación. Electrodos cerámicos. I=cte. Tª variable	51
Figura 30. Variación en la concentración de DQO y NoR. Electrodos cerámicos. I=cte. Tª variable	52
Figura 31. Comparativa UT y Germinación. Electrodos cerámicos. E=cte. Tª variable	53
Figura 32. Variación en la concentración de DQO y NoR. Electrodos cerámicos. E=cte. Tª variable	53
Figura 33. Comparativa en la Germinación. Electrodo cerámico. E=cte. I variable	54
Figura 34. Variación en la concentración de DQO y NoR. Electrodo cerámico. Tª=cte. I variable	55
Figura 35. Comparativa en la Germinación. Electrodo cerámico. Tª=cte. E variable	56
Figura 36. Variación en la concentración de DQO, COT y NoR. Electrodo cerámico. Tª=cte. E variable...	56
Figura 37. Comparativa UT y Germinación. Electrodo BDD. E variable	57
Figura 38. Variación en la concentración de DQO, COT y NoR. Electrodo BDD. E variable	58
Figura 39. Comparativa UT y Germinación. Electrodos R30 y BDD. E variable	59
Figura 40. Comparativa en la variación en la concentración de DQO, NoR y COT. Electrodos R30 y BDD. E variable	59

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Datos de Toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R04	36
Tabla 2. Datos de Toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R20	36
Tabla 3. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R24.....	36
Tabla 4. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R30.....	37
Tabla 5. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R27.....	37
Tabla 6. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 3V R30.....	37
Tabla 7. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 2,5V BDD.....	38
Tabla 8. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 3V BDD.....	38
Tabla 9. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra inicial (antes de ser tratada mediante oxidación avanzada).....	38
Tabla 10. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra inicial con un factor de dilución 1:10	39
Tabla 11. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra inicial con un factor de dilución 1:2 ..	39
Tabla 12. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 2,5V R24.....	39
Tabla 13. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 2,5V R24. FD (1:2)	40
Tabla 14. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA BDD.....	40
Tabla 15. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value - Ensayo1	41
Tabla 16. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) – Ensayo 1..	42
Tabla 17. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value – Ensayo 2	43
Tabla 18. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) – Ensayo 2..	44
Tabla 19. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) - Ensayo 3...	45
Tabla 20. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value - Ensayo 4	46
Tabla 21. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) - Ensayo 4...	47
Tabla 23. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) - Ensayo 5...	48
Tabla 24. Datos de partida de la muestra contaminada	50
Tabla 25. Datos obtenidos. Electrodo cerámicos. I=cte. Tª variable.....	51
Tabla 26. Datos obtenidos. Electrodo cerámicos. E=cte. Tª variable.....	52
Tabla 27. Datos obtenidos. Electrodo cerámico R20. Tª=cte. I variable.....	54
Tabla 28. Datos obtenidos. Electrodo cerámico R30. Tª=cte. E variable.....	55
Tabla 29. Datos obtenidos. Electrodo BDD. E Variable	57
Tabla 30. Datos obtenidos. Electrodo R30 y BDD. E Variable	58
Tabla 31. Presupuesto parcial del material común	69
Tabla 32. Presupuesto parcial del material para la medición y ajuste del pH.....	70
Tabla 33. Presupuesto parcial del material para el método de las semillas.....	70
Tabla 34. Presupuesto parcial para el método del Microtox	71
Tabla 35. Presupuesto parcial de la mano de obra	71
Tabla 36. Presupuesto total	72

DOCUMENTO I

MEMORIA

1. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El **objetivo principal** del trabajo es la presentación y desarrollo de varios métodos para la evaluación de la toxicidad en efluentes líquidos. Para ello, se deberán definir en primer lugar los conceptos más importantes tratados en el desarrollo del presente trabajo, de modo que se facilite la correcta comprensión para el lector. Se deberá desarrollar posteriormente una sólida base científica sobre la que sustentar la elección de los métodos de trabajo (ensayo de bioluminiscencia con el equipo Microtox y ensayo de fitotoxicidad empleando semillas de lechuga), así como las condiciones de trabajo de las muestras de agua residual tratadas con las que se va a trabajar. A continuación, será necesaria la definición del material necesario y los pasos a seguir para cada uno de los métodos para su correcto desarrollo. Se deberán incluir todos los datos obtenidos, así como las instrucciones para su tratamiento posterior. Para finalizar la parte descriptiva, se incluye la elaboración del presupuesto total del trabajo, entendido como si se tratase de un proyecto de consultoría, dividiendo el mismo para cada uno de los ensayos realizados.

Como **objetivo secundario** se establece el análisis de los resultados obtenidos con ambos métodos de medición de la toxicidad. En estos análisis, se evaluarán los electrodos empleados en el proceso de oxidación avanzada (electro-oxidación) al que han sido sometidas las muestras contaminadas con un antibiótico, de modo que se puedan establecer particularmente para cada uno de los electrodos (diferentes materiales y distintas temperaturas de sinterizado) y más en detalle para cada uno de los métodos de trabajo empleados (a intensidad constante y a potencial de electrodo constante) lo siguiente: por un lado, si ambos métodos de medición de la toxicidad muestran los mismos resultados y, por otro, con qué electrodo y metodología de trabajo se ha obtenido una mayor eliminación del contaminante y una menor toxicidad de la muestra. Como punto final se establece la comparativa entre los diferentes electrodos de trabajo en la electro-oxidación, comprobando si existe correlación entre ellos en función de las condiciones de trabajo o si en función del electrodo empleado los resultados son distintos sin importar el método empleado.

2. PREFACIO Y MOTIVACIÓN

El mundo se encuentra en permanente expansión. Las tecnologías, industrias y hábitos de consumo cambian, se desarrollan y crecen constantemente. Acorde con esto, se generan cada vez más un mayor número de vertidos de contaminantes y residuos en las aguas del planeta. A su vez, las leyes deben ser cada vez más estrictas en este aspecto, regulando las cantidades, concentraciones o bloqueando los vertidos de residuos contaminantes.

No obstante, el ritmo de mejora en los procesos de control y regulación de los vertidos no logra frenar el constante aumento del peligro de contaminación que sufren nuestros mares, océanos, ríos y lagos, indefensos ante este maltrato por parte del ser humano. [1] En especial preocupan aquellos vertidos de aguas residuales por parte de las grandes industrias, algunas de las que contienen elementos tales como colorantes, plaguicidas, medicamentos, etc. Son los denominados Contaminantes Emergentes (CE). Su vertido no encuentra límite pues no existe regulación ante el desconocimiento de su posible característica de peligrosidad y toxicidad hacia el medio ambiente. De todos estos, los más destacables son los que provienen de la industria farmacéutica, porque aunque muchos de ellos reciben algún tipo de tratamiento, bien físico, químico o biológico, no siempre su degradación es completa o incluso el producto obtenido después del tratamiento puede ser incluso más contaminante que el inicial. [2]

En relación al sector farmacéutico, en los últimos años, las ventas del sector han aumentado a raíz de un 4% anual. [3] Sus principales mercados son países emergentes como China, Brasil o India, cuyo crecimiento ha sobrepasado el 10% anual el último año.

El principal problema al respecto son los propios países en auge en la industria farmacéutica, pues sus gobiernos son incluso menos severos y las condiciones que se les exigen de control y vertidos de cualquier tipo de residuo no son tan rígidas e inflexibles como deberían. Esto se puede comprobar en gran cantidad de estudios, donde en China se hallaron hasta 20 tipos de antibióticos en el seno de un río de Shanghái. [4]

Además, el hecho de que la administración, venta y producción del sector esté controlado por la propia industria no hace presagiar nada bueno, pues por ejemplo, en 2008 se estimó que hasta un 87% de los colegiados en Aragón había recibido algún beneficio de la industria de los fármacos, además de que la publicidad de medicinas en las revistas científicas ascendía a casi el 70%. [5]

Siguiendo la línea de tendencia al alza de la venta de fármacos, multitud de estudios demuestran que la automedicación es un problema real y en constante crecimiento, alcanzando tasas de hasta el 90% de los encuestados, sin apenas regulación por parte de los Gobiernos. [6-10]

En concordancia a este autoconsumo descontrolado de medicinas por parte de la población, y aunque la esperanza de vida humana ha aumentado en los últimos 50 años de forma considerable en los países más desarrollados con las mejoras en la sanidad y la creciente investigación en nuevos medicamentos, también le siguen posibles consecuencias fatales ya demostradas en caso de mala administración, no respetar las dosis indicadas o sobre consumo, como la estadística que demuestra que el 42% de los fallos críticos de riñón en EEUU en 2005 fueron ocasionados por un exceso en la dosis de Paracetamol o la que nos indica que en Argentina es mayor la intoxicación por automedicación que por cocaína, lo que provoca 700 muertes al año. [11], [12]

Además, y puesto que el ser humano sintetiza la mayor parte de medicamentos por el riñón y después los expulsa mediante la orina, no somos conscientes del consiguiente vertido al medio que tiene lugar.

Por último, este autoconsumo de medicamentos es el que está generando la aparición de bacterias resistentes a los mismos, que lejos de conseguir una reducción en el consumo de medicamentos, generaría un futuro consumo de medicamentos más agresivos, en mayores dosis y concentraciones más altas agravando más si cabe el problema. [13]

Así, y de acuerdo con la OMS [14], en la última década se han encontrado en aguas potables tratadas restos de contaminantes que hace unos años se encontraban en valores de nanogramos por litro, actualmente ya en microgramos por litro. En esas concentraciones tan bajas (la EPA estipula un valor máximo de concentración en aguas potables de 0,5 mg/L [15], todavía en el orden de miles de veces superior a esta concentración de microgramos) no suponen ningún peligro para el ser humano pero el drástico aumento de su concentración en el agua y la escasez de información y estudios relativos al riesgo para la salud por contaminación cruzada de dosis aparentemente inofensivas de medicamentos en el agua potable, ha hecho plantearse, no sólo al público en general sino a los gobiernos y entidades cambios en las políticas y métodos de regulación de las aguas.

Al margen de la peligrosidad para las personas, la gran cantidad de vertidos y la cada vez mayor aparición de Contaminantes Emergentes, supone un riesgo crítico para la vida en general en cada punto de vertido, en especial aquellas zonas de vertidos como ríos y lagos, en los que los sedimentos y muestras de agua han sido observadas con altas cantidades de medicamentos, especialmente dañinos para el ecosistema como podrían ser relajantes musculares, opiáceos, etc. Este daño podría extenderse a lo largo de la cadena trófica, suponiendo una amenaza para los ecosistemas así como para gran cantidad de especies. El problema principal es la escasa regulación de las concentraciones de medicamentos como los mencionados pues el desconocimiento del efecto sobre el medio no está todavía claramente manifestado. [16]

La Directiva europea publicó la DE 2013/39/UE [17], que modificaba la Directiva Marco del Agua en relación a las sustancias prioritarias en la política de aguas y más tarde la EQSD (Environmental Quality Standards Directive) [18], quienes han ampliado hasta 45 la lista de sustancias prioritarias a eliminar en el ámbito del tratamiento de aguas, de las cuales hay 21 calificadas como peligrosas.

En este punto se puede describir la motivación intrínseca de este proyecto, quedando patente y de acuerdo a lo sugerido por la OMS [14], que es la de ser partícipes en el desarrollo de técnicas o procesos que consigan reducir o eliminar nuevos contaminantes de una muestra de agua residual, no sólo para la prevención de los riesgos que suponen a largo plazo para el ser humano sino en especial, la gran amenaza que suponen para el medio ambiente.

3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA Y CONCEPTUAL

A continuación se pasan a describir algunos conceptos que se entienden indispensables para la correcta comprensión del trabajo desarrollado y plasmado en este documento.

3.1 – Toxicidad

Citando a Paracelso, considerado como uno de los grandes maestros de la toxicología:

“Todo es tóxico, es la dosis la que hace el veneno”

La toxicidad se define generalmente como el riesgo para el medio ambiente asociado a un residuo. Por ello, normalmente los ensayos de eco-toxicidad suelen estar basados en la exposición de una especie (*Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *Hydra attenuada*, etc.) a varias concentraciones de una disolución de prueba y observar los efectos sobre ésta.

Actualmente, existen varios indicadores que se pueden emplear para conocer la presencia de sustancias tóxicas en un agua. Entre los más comunes, se encuentran el AOX y el METOX. El primero se refiere a la concentración de sustancias organohalogenadas adsorbibles en carbón activo. El segundo, es una medida de la concentración de metales pesados en el agua. Para obtenerlo, se necesitan conocer las concentraciones de ciertos metales pesados. Aunque estos indicadores no expresan realmente la toxicidad del agua propiamente dicha, debido a su fácil obtención y, sobre todo, a la falta de manipulación, cultivo o tratamiento de organismos para determinarlos así como su fácil comparativa frente a las mismas mediciones en sectores de la industria como el metalúrgico, son de uso común en la actualidad.

No obstante, sí hay ensayos que se ajustan a lo que se define como toxicidad. Éstos expresan la interacción entre el agua y el medio. Son los conocidos como de materias inhibidoras. El objetivo perseguido por estos ensayos es la obtención de una dilución en el agua residual que consiga afectar al 50% de la población de los microorganismos de ésta.

Hay ensayos que impiden el desarrollo de las propiedades de los organismos (como el EC50, Effective Concentration en inglés, indica la concentración para la que la respuesta se ve inhibida al 50%) y los hay que los eliminan por completo (por ejemplo el LC50, Lethal Concentration, la cual muestra la concentración para la que el 50% de mortalidad de los organismos es observada).

Se definen paralelamente a los ejemplificados la ED50 y LD50, que a diferencia de la medida de los primeros (miden en ppm, mg/L), éstos indican la dosis (entendida como el peso de las sustancias incorporadas). Para cada uno de estos métodos, se requiere de una minuciosa selección de los organismos a emplear, pues deben ser suficientemente sensibles a concentraciones pequeñas. [19]

De hecho, la LD50 es un valor utilizado por la UE para clasificar y etiquetar productos químicos tóxicos o peligrosos (D. 2001/59/CE). [20]

Frecuentemente se emplea para la medida de la toxicidad en aguas residuales la *Dalpnia* (un crustáceo), evaluando la concentración del agua que consigue su muerte o su inmovilización.

Otro método cuyo uso está bastante extendido es el uso de la bacteria *Photobacterium phosphoreum*, de la que se estudia su luminiscencia tras estar inmersa en agua residual durante

un tiempo comprendido entre 5 y 30 min (generalmente se emplea un tiempo intermedio, es decir, 15 min). Se trata de un método económico y de fácil manejo, y es una de las propuestas escogidas para su desarrollo posterior en este trabajo.

Dejando de lado los métodos para medir la toxicidad de una muestra, encontramos una nueva definición de Toxicidad de la EPA (United States Environmental Protection Agency), como aquel residuo con propiedades que lo hacen peligroso o le otorgan capacidad de tener un efecto dañino en la salud humana o la naturaleza. [21]

Así, de acuerdo con el Reglamento de la UE 1357/2014 [22], un residuo que cumpla una serie de características puede clasificarse como peligroso. A su vez, en el anexo III de la Directiva 2008/98/CE [23], se establecen las características de peligrosidad, entre las que figura la denominada como H6 - tóxico o muy tóxico: 'corresponde a los residuos que pueden provocar efectos tóxicos agudos tras su administración'. Además, se añade: 'Si la suma de las concentraciones de todas las sustancias presentes en el residuo, clasificadas con un código de clase y categoría de peligro de toxicidad aguda, es superior o igual al umbral marcado, el residuo se considerará como peligroso H6'

Es decir, se deberá comprobar la codificación de las sustancias presentes en el residuo y comprobar si se supera su umbral de concentración.

En el reglamento CLP 2016/1179 [24] podemos encontrar una actualización de una lista de compuestos con su correspondiente codificación.

3.2 – pH

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una disolución. Sus siglas provienen del latín, cuya traducción sería "potential Hydrogen atom", es decir, la cantidad de iones H^+ que hay en la disolución. Su fórmula de acuerdo a la ecuación (1) expresa el logaritmo negativo de la concentración de estos iones:

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (1)$$

Este valor suele estar comprendido entre 0 y 14, donde 0 indica que se trata de una disolución muy ácida y 14 una muy básica. Se toma como pH neutro el valor medio de este intervalo, es decir, un valor de pH de 7, valor de referencia del agua pura. El balance entre los iones de hidrógeno y los de hidróxido (ver ecuación (2)) es el que determina en un agua el pH, teniendo en cuenta la base química fundamental de ésta:



- Si $H^+ > OH^-$ -> disolución ácida
- Si $H^+ < OH^-$ -> disolución básica (alcalina)
- Si $H^+ = OH^-$ -> disolución neutra

El valor de pH de una disolución tiene una clara influencia en los procesos biológicos y reacciones químicas que se puedan dar en el seno de la misma, como se demostrará más tarde, y, por ello, habrá que ajustarlo de acuerdo al procedimiento descrito posteriormente siempre y cuando sea

requerido según el método que se quiera llevar a cabo (como es en el caso particular de este trabajo que nos concierne).

3.3 – Métodos de Oxidación Avanzada

Los métodos de oxidación avanzada son procesos basados en la formación de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) con potencial de oxidación muy alto y otros radicales altamente oxidantes, que son capaces de degradar compuestos difícilmente biodegradables o refractarios, como es el caso de los pesticidas y de los fármacos.

Su empleo se remonta hasta los inicios de los años 80, donde inicialmente se recomendaba su uso para el tratamiento de las aguas potables, aunque ha sido en los últimos años cuando más popularidad ha adquirido debido a la mejoría en la tecnología así como por la creciente preocupación por los Contaminantes Emergentes. Se emplean especialmente para reducir la cantidad de materia orgánica presente en las Aguas Residuales (AR).

Se emplean tanto para disminuir la toxicidad de un efluente, como para eliminar directamente contaminantes que han permanecido en el agua después de aplicar un proceso biológico. Puede llegar a conseguirse la total mineralización de ciertos contaminantes orgánicos.

Cabe añadir como punto positivo la flexibilidad en el diseño y la variedad de procesos de Oxidación Avanzada de los que se dispone y se conoce hoy en día. Además permite eliminar metales con el tratamiento adecuado y no transfiere la contaminación a la fase obtenida.

Como desventajas, se señalará la formación de productos intermedios de oxidación, de los que *a priori* no se conoce su nivel de toxicidad en relación al producto original previo a la oxidación, así como su coste de operación debido al empleo de sustancias químicas o a su coste de energía (como en el caso de la oxidación avanza por electro-oxidación).

Algunas de las técnicas de oxidación avanzada más empleadas en la actualidad son la electro-oxidación, así como procesos de oxidación avanzada con radicales Fenton, photo-Fenton, TiO_2 foto-catalítico y procesos UV/ ZnO , así como ozono (O_3) o incluso mediante ultrasonidos. [25]

En el presente TFG, se analiza la toxicidad de efluentes contaminados que han sido sometidos a un proceso de oxidación avanzada mediante el uso de diferentes ánodos, que son los electrodos donde tiene lugar dicha oxidación, y distintas condiciones de trabajo.

3.4 – DQO

Parámetro indicador del contenido en materia orgánica de un agua o efluente líquido. Mide concretamente la materia orgánica según las ppm de oxígeno que se consumen en su oxidación química, usando normalmente como reactivo oxidante dicromato potásico. Muestra, por tanto, cuánto oxígeno necesita el agua para oxidar la materia orgánica presente en ella.

Es un parámetro muy importante a tener en cuenta a la hora de diseñar, por ejemplo, las instalaciones de tratamiento de aguas residuales, más conocidas como EDARs (Estación de Aguas Residuales), así como para conocer el rendimiento de los procesos que en ellas tienen a cabo.

El proceso de determinación dura unas 3 horas, ya que pese a utilizar un catalizador, se requiere de un cierto tiempo de contacto para que se produzca la reacción de oxidación. Tras ese tiempo,

se determina el dicromato potásico sobrante, bien mediante valoración con una disolución de ion ferroso o bien con ayuda de un espectrofotómetro.

El método presenta algunos inconvenientes, ya que no toda la materia orgánica es oxidable por el dicromato potásico (por ejemplo, los compuestos aromáticos), con lo cual se estaría efectuando una determinación a la baja y, por otro lado, algunos compuestos inorgánicos presentes en el agua son oxidables por el dicromato potásico (por ejemplo, los cloruros o los sulfuros), con lo que se estaría efectuando una determinación al alza.

3.5 – COT

Este parámetro (Total Organic Carbon en inglés, TOC) mide la materia orgánica total presente una disolución. Su uso normalmente se reduce a cuando la materia orgánica se encuentra en concentraciones bajas. Para medirlo, se oxida el carbono de la materia orgánica a CO₂ mediante un proceso de combustión, de modo que con infrarrojos o efectuando su absorción con hidróxido de potasio (KOH) se puede medir éste.

En el caso de aguas potables municipales, por ejemplo, se debe reducir el parámetro COT previamente a los procesos de desinfección, pues si no la materia orgánica podría reaccionar con otros compuestos químicos, dando lugar a subproductos que podrían ser cancerígenos.

Para aguas residuales, su control previo y posterior a la planta, permite un mejor control de los procesos en ésta, optimizando el rendimiento y siendo un primer control previo a los vertidos del agua. Tanto a nivel de municipios como en las industrias, se exige un valor máximo de COT. Además, es un valor reconocido en la industria farmacéutica para el control de procesos biotecnológicos en la evaluación de métodos de purificación de aguas. De forma general, su cálculo se suele expresar de acuerdo a la siguiente ecuación (3):

$$\text{COT} = \text{CT} (\text{Carbono total}) - \text{CIT} (\text{Carbono inorgánico total}) \quad (3)$$

En la siguiente figura (Figura 1) se puede observar, a modo de esquema resumen y de acuerdo a la ecuación previa (3) para entender mejor la distribución del carbono en un organismo, las fracciones en las que se divide el carbono total:

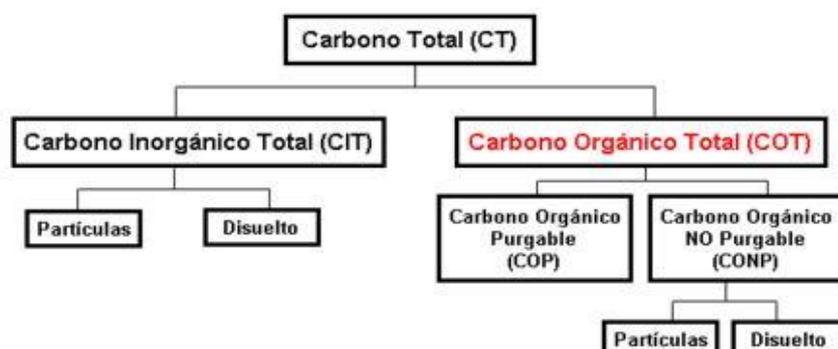


Figura 1. Carbono total y sus fracciones

3.6 – Norfloxacin

Se trata de un medicamento indicado para el tratamiento de gérmenes patógenos perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas. Es un antibiótico sintético, pues no es producido por ningún organismo vivo. Principalmente es suministrado para el tratamiento de infecciones en la vía urinaria y la próstata, eliminando las bacterias que causan las infecciones. También es empleado para tratar infecciones estomacales o intestinales, no se debe emplear para el tratamiento de gripes, resfriados u otras infecciones víricas. Su número CAS es el 70458-96-7 (del inglés Chemical Abstracts Service). Este número es asignado por esta división de la Sociedad Americana de Química, de modo que mantiene un registro de todas aquellas sustancias químicas que aparecen en la literatura, de modo que quedan identificadas.

Entre sus efectos adversos, se encuentran síntomas como debilidad, dolores, temblores, hinchazones, pero lo más preocupante, problemas óseos y daños permanentes en los nervios de las articulaciones, especialmente en niños. No se tiene experiencia con sobredosis del mismo, aunque se admiten altos riesgos de cristaluria (aparición de cristales en la orina) si se ingieren dosis altas. [26], [27]

Recientemente, un informe elaborado en 2014 en la Universidad de Princeton mostró un aumento del 55% de consumo de antibióticos en todo el mundo [28]. Esto supone un problema más grande si cabe pues como se mostró en 2005 en un trabajo que elaboró la Universidad de Antwerp, en Europa Occidental se mostraron unos porcentajes de resistencia a los antibióticos muy altos. [29]

4. ANTECEDENTES, PROPUESTAS Y JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la motivación previamente introducida de la búsqueda de métodos que consigan reducir o eliminar nuevos contaminantes de las aguas residuales, el Departamento de Ingeniería Química y Nuclear de la UPV se encuentra constantemente desarrollando métodos para ello.

Así, y en concordancia con las preocupaciones por los contaminantes emergentes como son los medicamentos, se están llevando a cabo procesos de oxidación avanzada (OA) con el fin de eliminar el Norfloxacin presente en aguas residuales. Para ello, se ha empleado un proceso conocido como electro-oxidación, técnica barata dentro de las OA pues no requiere de la adición de productos químicos. [30]

La electro-oxidación consiste en el empleo de ánodos con potenciales muy altos, como son los electrodos de diamante dopados con boro (de ahora en adelante, BDD). El principal problema del método es la estabilidad de los mismos en las condiciones de oxidación en las que se tiene que trabajar. Los BDD responden con una gran eficacia, aunque su gran inconveniente es el alto precio o su escasa disponibilidad. Como alternativa, se buscaron electrodos cerámicos, mucho más baratos y a su vez estables. Estos están compuestos por una matriz cerámica en presencia de Sb (Antimonio) y dopados con SnO₂.

Con el proceso de oxidación realizado, surge la justificación de este trabajo, pues en el proceso de oxidación avanzada, aunque se elimine el contaminante original, se desconoce *a priori* la

posible formación de productos de oxidación intermedios, que dado el caso pueden resultar incluso más tóxicos que los productos de partida. Es por ello que se debían buscar métodos que permitiesen evaluar la posible toxicidad de las muestras en función del electrodo empleado en el proceso de oxidación avanzada y de las condiciones de trabajo.

Se conocen múltiples herramientas de la toxicología acuática para la detección de contaminantes en el agua. No obstante, su caracterización es compleja y también muy cara. Existen estudios y métodos para la evaluación de los productos intermedios de la oxidación [31], o pruebas y análisis que permiten evaluar la calidad o contaminación de un efluente.

No obstante, se ha optado por descartar este tipo de tratamientos, pues no sólo resultarían muy caros y escaparían al alcance del desarrollo de un TFG, sino principalmente porque se realizan empleando organismos acuáticos y terrestres para determinar el grado de contaminación del agua, aunque estos métodos estén contemplados por la legislación. [32]

En la búsqueda de alternativas, encontramos que en el reglamento CE 440/2008 (punto C. ENSAYOS ALTERNATIVOS) [33] se establece que 'Constituye un objetivo científico de la UE la elaboración y validación de técnicas alternativas que puedan proporcionar el mismo nivel de información que los actuales ensayos con animales, utilizando menos animales o evitando el uso de animales'. Esta es la base de la que se parte para la elección o realización de cualquier método en el presente trabajo.

De acuerdo con numerosos estudios que avalan el método, así como su inclusión en la legislación mediante la orden Ministerial de 1989, BOE 10 de noviembre [34], la primera técnica elegida para la evaluación de la toxicidad en el efluente contaminado con Norfloxacin y tratado con un proceso de electro-oxidación ha sido el Ensayo de Bioluminiscencia mediante el equipo Microtox. [35], [36]

Teniendo en cuenta el proceso previo aplicado al agua residual contaminada (oxidación avanzada), también se escogió el Ensayo estático de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca Sativa* como segundo método a desarrollar para el análisis y la caracterización de posible toxicidad en los efluentes líquidos tratados. [37]

5. METODOLOGÍA DE TRABAJO

A continuación se describirán las diferentes metodologías de trabajo seguidas para el completo desarrollo de los objetivos del TFG.

5.1 – COMPROBACIÓN Y AJUSTE DEL VALOR DE pH

5.1.1 - Introducción

Previamente al desarrollo de cualquiera de los dos métodos de trabajo elegidos para la medición de la toxicidad de nuestro efluente líquido, hay que realizar la comprobación del pH de las muestras, pues tras el proceso de oxidación avanzada aplicado al agua contaminada, algunas de las muestras generalmente presentaban un pH muy ácido o muy básico. A continuación, se describirá el proceso de comprobación y ajuste si fuese necesario.

Para realizar esta comprobación hay varios métodos. Un primer método posible es el empleo de papel tornasol, el cual cambia a color rojo o azul en función de la acidez o alcalinidad,

respectivamente (rojo=ácido y azul=básico) de la solución. [38] Otro método igualmente rápido y no por ello menos preciso de los habitualmente empleados en laboratorios como en el que se ha desarrollado este proyecto, es mediante el uso de unas tiras indicadoras de pH, las cuales se sumergen en la solución de la que se quiere obtener su valor de pH, se agita levemente durante 1 a 10 minutos hasta que no se aprecie cambio de color en la tira, y comparándola con un patrón de colores, se obtiene su valor de pH (ver Figura 2). [39]

No obstante y dada la sensibilidad de las muestras alrededor del rango de pH buscado, se optó por el empleo de un medido de pH electrónico (ver Figura 3), de modo que el seguimiento de la evolución de su valor ha sido mucho más sencillo e inmediato dada la cantidad de muestras a ajustar.

Si el pH obtenido es menor que el rango buscado para nuestras condiciones de trabajo óptimas, se deberá añadir una base para aumentar su pH. De forma contraria, si el pH fuese demasiado alto, añadiendo un ácido se conseguirá disminuir el pH de nuestra solución.



Figura 2. Tiras indicadoras de pH



Figura 3. Medidor de pH electrónico

5.1.2 – Materiales y equipos

Medidor de pH electrónico

Vaso de precipitados

Cuentagotas/Pipeta

Muestras

Agua destilada

Ácido sulfúrico concentrado

Hidróxido sódico concentrado

Agitador magnético

Imán de mezcla

5.1.3 – Procedimiento experimental para el ajuste del pH (en caso de ser necesario)

Como medida inicial previa al desarrollo del procedimiento, se deberá comprobar el correcto funcionamiento del medidor de pH. Para ello, se introduce el electrodo soporte en agua destilada y se verifica que se obtiene un valor de pH alrededor de 7 (tener en cuenta la tolerancia

indicada por el fabricante). Con el medidor de pH correctamente calibrado, el desarrollo del proceso para ajustar el pH queda del siguiente modo: [40]

- Verter en un vaso de precipitados la muestra.
- Añadir al vaso el imán de mezcla.
- Con el agitador magnético encendido, colocar encima el vaso, de modo que el imán empezará a girar para homogeneizar la solución (ver Figura 4).
- Introducir el electrodo en la muestra, de modo que la punta blanca del electrodo de referencia quede totalmente cubierta por la muestra (ver Figura 5).
- Esperar hasta que el valor de pH se estabilice. Si se encuentra en el rango de valores buscado, anotar el dato. En caso negativo:
 - Si se encuentra por debajo, añadir una o dos gotas de base con el cuentagotas. En el desarrollo de este trabajo fue empleado el hidróxido de sodio (NaOH).
 - Si se encuentra por encima, añadir una o dos gotas de ácido con el cuentagotas. Se empleó ácido sulfúrico en este caso (H_2SO_4).

Se deberá repetir el proceso de acuerdo al punto anterior hasta que el valor de pH se estabilice en el rango de valores admisibles para nuestro experimento.

- Ya con el pH en un valor apto para el experimento, apagar el agitador y retirar el electrodo y el imán del vaso. La muestra está lista para evaluar su toxicidad (en este caso).



Figura 4. Montaje experimental para ajustar el pH

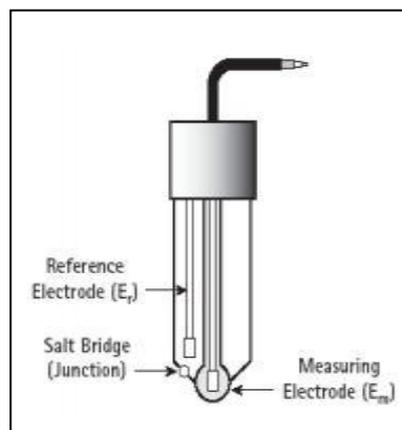


Figura 5. Electrodo soporte

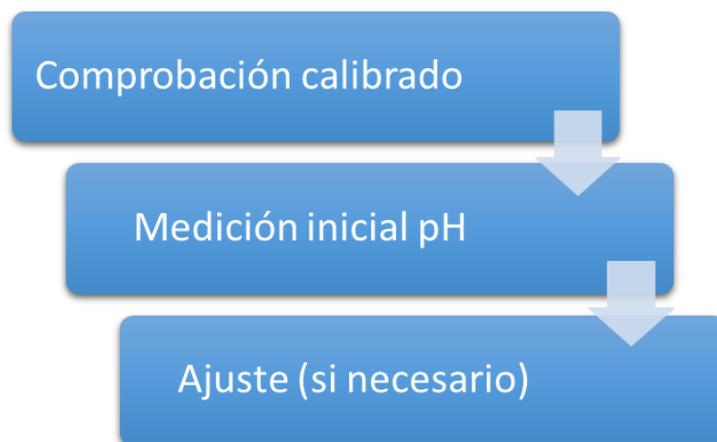


Figura 6. Esquema del proceso de ajuste del pH

5.2 - ENSAYO DE BIOLUMINISCENCIA CON MICROTOX

5.2.1 - Introducción

El primer método empleado para el análisis de la toxicidad en el efluente líquido elegido fue el correspondiente al equipo Microtox. Éste consiste en un fotómetro de alta sensibilidad el cual nos posibilita la determinación de la toxicidad tanto de sustancias líquidas como de sedimentos mediante el empleo de la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* (nombre oficial *Photobacterium Phosphoreum*, NRRL number B-11177) como referencia.

Este aparato (ver Figura 7), desarrollado en 1979 por Microbics Corporation (actualmente Azur Environmental), tiene un uso regular tanto en la industria en general (especialmente en la hidrometalurgia) como en el ámbito medioambiental, ya que es un primer indicador de la toxicidad de los posibles vertidos que se vayan a realizar, ya que puede suponer una gran ayuda a la hora de determinar la presencia de materiales tóxicos, así como para establecer la posible contaminación de aguas, tanto potables como de ríos o agua de mar. Ampliamente aceptado por la industria química como método para la determinación de la contaminación, ha sido empleado en trabajos de investigación y proyectos de índole similar a lo largo de los años en muchas universidades, incluyendo la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). [41-43]

La bacteria empleada, la cual emite luz de forma natural como consecuencia de su proceso metabólico de respiración, cuando se pone en contacto con un material tóxico, ve alterado su proceso de respiración celular, lo que incurre en una disminución de la luz emitida por la misma, la cual será medida por el fotómetro. Esta variación es la que una vez medida tiene una correlación directa con el valor de toxicidad de la sustancia en cuestión.

Se escoge la *Photobacterium Phosphoreum* no sólo debido a la intensidad de la luz emitida sino también a su estabilidad en la emisión, y a su alta sensibilidad a un extenso espectro de compuestos diferentes.

La base del test es la lectura de la medida de luminiscencia emitida por las *Vibrio Fischeri* tras estar en contacto con una muestra desde 5 hasta 30 minutos. Cuanto mayor sea el tiempo de contacto, menor será el valor de EC50 proporcionado por el test. La intensidad de la luz medida en cada muestra será comparada con la intensidad de la luz medida en la cubeta que contendrá

el reactivo (bacterias) liofilizado junto a una solución de reconstitución (en este caso, agua destilada). El vial con bacterias liofilizadas y con un crecimiento óptimo ha sido proporcionado por el Departamento de Ingeniería Química y Nuclear de la UPV, al igual que el equipo Microtox. Cada serie de bacterias que se muestrea (hay millones de cuerpos en cada vial que se emplee) ha sido preparada en unas condiciones muy controladas. Sus condiciones de almacenamiento son de no más de un año de duración del mismo, y una temperatura superior a -20°C pero no inferior a -25°C . Se puede guardar en un congelador convencional pero su vida disminuye considerablemente. Muy importante tener en cuenta que pasadas un par de horas desde su reconstitución, su sensibilidad se empieza a ver afectada, pudiendo ser severa en algunas muestras pasado este tiempo.



Figura 7. Microtox 500

5.2.2 - Ventajas

- Dado que las bacterias liofilizadas se pueden clonar y almacenar, no es necesario el cultivo previo de la biota.
- No requiere de tratamiento inicial entre el resto de materiales a emplear, por lo que el test se puede comenzar rápidamente una vez se disponga de lo necesario.
- Todo el proceso está asistido por el programa informático, el cual almacena, muestra y analiza con rapidez. En cuestión de minutos se puede tener un resultado objetivo acerca de la toxicidad de una muestra, lo que permite una rápida respuesta en efluentes monitorizados.
- A excepción del propio aparato, el cual requiere una fuerte inversión inicial, el resto del equipamiento es de precio reducido y además requiere de poco espacio en el laboratorio.

El procedimiento del método del Microtox empleado ha sido construido de acuerdo a las propias indicaciones del manual y del programa informático que acompaña al Microtox y ajustado acordemente a lo plasmado por otros investigadores [44], quedando de la forma siguiente que se indica a continuación:

5.2.3 - Condiciones del experimento

- Temperatura 20°C
- pH de las muestras comprendido entre 5,5 y 8
- Tiempo de contacto con la bacteria: 15 minutos
- Biota: bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*
- Muestra: Efluente líquido contaminado con Norfloxacin y sometido a un proceso de oxidación avanzada
- Factor de dilución: 2

5.2.4 – Materiales y equipos

Equipo Microtox

Agua destilada libre de tóxicos como solución de reconstitución

NaCl al 22% como solución acuosa de ajuste osmótico

NaCl al 2% como solución acuosa diluyente

Cubetas

Pipetas

Vasos de precipitado

Ordenador

Puntas de pipeteado



Figura 8. Parte de los materiales empleados en el método del Microtox

5.2.5 - DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.2.5.1 - Puesta a punto del equipo Microtox

En primer lugar, conectar a la red el equipo Microtox.

Esperar unos minutos hasta que se encienda una luz en su parte frontal, lo cual nos indica que ya ha autorregulado su temperatura y está listo para ser utilizado.

5.2.5.2 - Preparación del reactivo

- Sacar el vial de las bacterias del congelador.
- Colocar una cubeta en la celda del reactivo (donde indica Reagent) y pipetear 1mL de solución de reconstitución en ésta.
- Extraer la tapa del vial de las bacterias.
- Volcar todo el contenido de la cubeta en el vial de las bacterias súbitamente con un solo movimiento.
- Agitar el vial y devolver todo su contenido a la cubeta.
- Mezclar varias veces con la pipeta de 1mL de modo que se homogeneice la mezcla.

5.2.5.3 - Preparación de las cubetas

Colocar las cubetas en el bloque de incubación en las filas A y B (ver Figura 9).

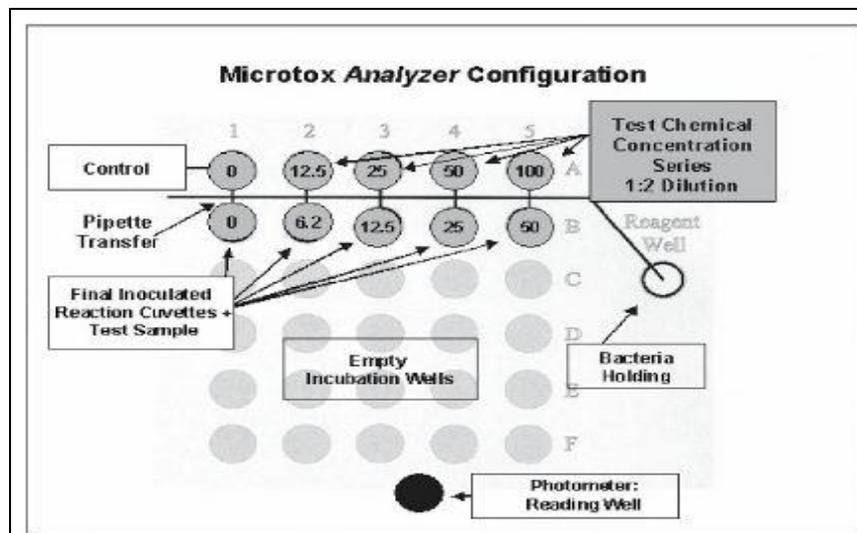


Figura 9. Esquematización del ensayo con el equipo Microtox

5.2.5.4 - Introducción del diluyente y de la muestra

- Pipetear 0,5mL de diluyente en las cubetas de la fila B (figura 10).
- Pipetear 1mL de diluyente en las cubetas de A1, A2, A3 y A4.
- Agregar 2,5mL de la muestra a A5.
- Agregar 0,25mL de ajustador osmótico a A5 y mezclar.
- Eliminar 1,75mL de la cubeta A5.
- Trasvasar 1mL de la cubeta de A5 a la A4. Mezclar
- Trasvasar 1mL de la cubeta de A4 a la A3. Mezclar.
- Trasvasar 1mL de la cubeta de A3 a la A2. Mezclar.
- Eliminar 1mL de la cubeta de A2 (No se trasvasa nada a A1 pues es nuestro control)



Figura 10. Pipetas micrométricas empleadas

5.2.5.5 - Introducción del reactivo

- Trasvasar 10µL de bacterias reconstituidas a la cubeta de B1.
- Asegurar la mezcla de las bacterias con el diluyente agitando levemente con los dedos.
- Cronometrar 15 minutos hasta que se estabilicen las bacterias para conseguir una correcta lectura inicial de su valor de luz emitida.
- Trasvasar 10µL de bacterias reconstituidas al resto de cubetas de la fila B.

5.2.5.6 - Toma de valores inicial

- Introducir la cubeta de B1 en la celda del fotomultiplicador. Pulsar SET.
- Pulsar READ y apuntar el dato de la emisión de luz.

NOTA: Se deberá tomar 3 medidas de cada una de las cubetas, y trabajar con la media de estos 3 datos, para cada una de las cubetas.

- Introducir en el fotomultiplicador la cubeta de B2 y pulsar READ. Apuntar el dato.
- Llevar a cabo el paso anterior con B3, B4 y B5.

5.2.5.7 - Puesta en contacto del reactivo con la muestra

- Trasvasar 0,5mL desde la cubeta de A1 a B1. Mezclar.
- Cronometrar de nuevo 15 minutos de modo que se homogeneice la mezcla de la muestra diluida las bacterias.
- Trasvasar 0,5mL desde la cubeta de A2 a B2. Mezclar.
- Trasvasar 0,5mL desde la cubeta de A3 a B3. Mezclar.
- Trasvasar 0,5mL desde la cubeta de A4 a B4. Mezclar.
- Trasvasar 0,5mL desde la cubeta de A5 a B5. Mezclar.

5.2.5.8 - Toma de valores final

Análogamente a la Toma de valores inicial pero sin necesidad de establecer el SET, tomar la lectura de cada una de las cubetas de la fila B empezando por la B1 introduciendo cada cubeta en el fotomultiplicador y pulsando READ.

Tanto las puntas de pipeteado como las cubetas se deberán desechar después de su empleo; no se admite reutilización de las mismas.

5.2.5.9 - Análisis de los datos y resultados

Con los datos introducidos en el programa informático (Figura 11), el dato que nos proporcionará el mismo es el EC50 de la muestra en cuestión. Éste se obtiene de las representaciones gráficas de la dosis (concentración de la muestra) frente a la respuesta de la bacteria.

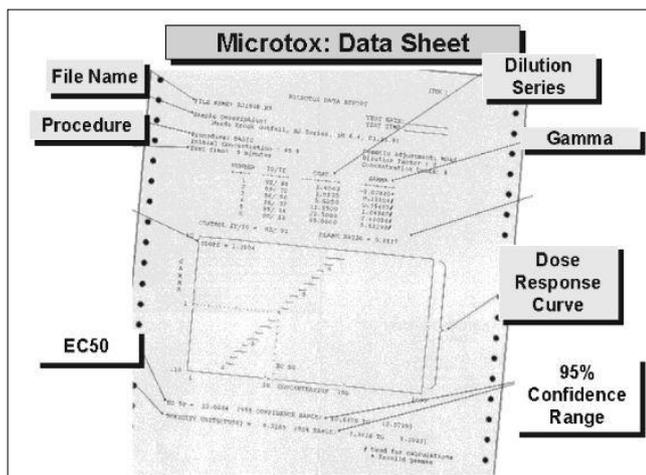


Figura 11: Hoja de datos del programa Microtox

Definido como el valor de concentración que inmovilizará la actividad de las bacterias presentes (reducirá la emisión de luz en este caso) al 50%, la normativa reguladora de residuos tóxicos indica que se debe expresar en ppm. Para ello, se debe multiplicar por 1000 el obtenido en EC50 y, según el BOE (13 de octubre de 1989) [34], será peligroso y tóxico si se supera un valor límite de 3000 ppm (333 UT).

Para obtener este dato de acuerdo a la norma reguladora de la contaminación (AFNOR), normalmente expresado en Equitox (N Equitox implica la necesidad de diluir una muestra N veces de modo que se obtenga la inmovilización del 50% de la población de los organismos), simplemente se deberá hacer la inversa del EC50 de acuerdo a la siguiente ecuación (4), expresión adimensional ya que es un porcentaje:

$$UT = \frac{1}{EC50} * 100 \quad (4)$$

En el método desarrollado, su límite superior es de 25 UT.

Cabe la posibilidad que el programa nos indique que la muestra es muy tóxica, acompañado de un nuevo factor de dilución inicial recomendado de la muestra, comprendido entre 1:2 hasta 1:10. En este caso, diluir de acuerdo a lo indicado por el programa y volver a proceder con el proceso de toma de datos desde el punto 5.2.5.3.

En otras ocasiones, el programa nos dará como resultados Hormesis. Este resultado se debe a que estamos trabajando en una zona de pH muy sensible, por lo que a dosis relativamente bajas se consigue estimular la respuesta del agente químico en cuestión pero con dosis relativamente altas resultan tóxicas y por tanto peligrosas. Esta inestabilidad en la respuesta, cuya solución a la exposición a dosis bajas escapa al alcance de este proyecto, se anotó y se procedió a volver a medir aquella muestra cuyo resultado fuese éste, diluyéndola previamente, y evaluando si la respuesta mejoraba. [45]



Figura 12. Esquema del ensayo con el equipo Microtox

5.2.6 - Problemática durante el desarrollo

Después de varios ensayos correctos y sin presentar ningún problema, en posteriores muestreos el equipo Microtox dio ciertos problemas incluso con los blancos, indicando exceso de luminosidad en algunos momentos, y contrariamente imposibilidad de medición debido a la escasez de la misma en otros momentos. Ya que se disponía de suficientes datos en ese momento para realizar el posterior tratamiento de los mismos, se optó por no continuar con el método y pasar al siguiente ensayo.

5.3 - ENSAYO ESTÁTICO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA

5.3.1 – Introducción

El bioensayo estático de toxicidad aguda empleando semillas de *Lactuca sativa*, nos permite conocer los efectos tóxicos de una disolución sobre el proceso de crecimiento de las radículas de las semillas, así como sobre la germinación de las mismas. Así pues, los parámetros que se analizarán serán el porcentaje de germinación (%) así como la elongación de sus radículas.

Los resultados obtenidos con este ensayo son generalmente extrapolables a cualquier tipo de semilla o plantas en general, pues es durante las primeras horas de cultivo y germinación de las mismas cuando más sensibles son, pues tienen lugar muchos de los procesos en los que su puesta en contacto con un material tóxico puede interferir de manera notoria en su desarrollo y crecimiento.

Así, estudiando los factores ya comentados, se podrá conocer la respuesta de una especie ante un ambiente en el que se encuentren ciertas sustancias presentes que *a priori* puedan interferir en su adaptación y supervivencia en el medio.

Aunque en la Universidad de Bogotá compararon este método junto a la sensibilidad de *S. Capricornutum*, obteniendo un efecto menor del 50% [46], sí se demostró que el ensayo con *Lactuca Sativa* presentaba una gran sensibilidad, por lo que el bajo porcentaje de inhibición en este caso fuese posiblemente atribuible no sólo a la no toxicidad atribuible al agua vertida sino a la posible intervención de los productos químicos también vertidos en el mismo agua por la industria cercana al lugar de la toma de las muestras.

Se puede afirmar por ello que el indicador de la elongación de la radícula es más sensible que el de germinación, por lo que una concentración baja de un contaminante puede llegar a inhibir la elongación de la misma, pero, sin embargo, no impedir la germinación. Es por ello que se cuantifica la elongación como un efecto subletal mientras el porcentaje de germinación se considera como letal (si se inhibe por muerte del embrión y no por un simple retraso en su desarrollo). Mediante la prueba del tetrazolium [47], se puede comprobar su letalidad.

Además y aunque no se trate de una planta acuática, la medida de la inhibición en la elongación de la radícula, como demostró McInnis para la EPA en 1989 [48], puede ser un valor extrapolable para la medición de la toxicidad de aguas de ríos o lagos.

Pese a que también se propone y se ha evaluado la elongación del hipocotilo en anteriores estudios [49], debido al alcance temporal limitado del trabajo aquí descrito, se optó por medir la elongación de la radícula así como evaluar la germinación de cada muestra. [50], [51]

Además, se optó por repetir cada ensayo 3 veces y con 3mL de muestra, pues aunque ciertos estudios indiquen que se realice con 4mL, ésta era una cantidad que comprobamos demasiado grande pues las semillas se encontraban sumergidas en el líquido. La elección de 3 placas de Petri por muestra se debe principalmente a que el programa estadístico en el que se trataron los datos requería de un mínimo de 3 valores por muestra. Thomas y Cline [52] estimaron inicialmente una correcta duración del test en 120h, aunque determinaron óptimo alternar períodos de incubación con luz y en ausencia de la misma [47]. A lo largo de los años se ha mantenido la duración aunque no las condiciones de luz del mismo, siendo realizada la incubación de las semillas en ausencia de luz casi en la totalidad de los trabajos.

5.3.2 - Ventajas

- Método sencillo, práctico y visual para la medición de la toxicidad de una muestra, tanto de compuestos puros solubles, aguas de lagos y ríos, subterráneas, potables así como lodos o matrices sólidas [47].
- No requiere de plantas o algas para su realización ni pre tratamiento.
- La *Lactuca sativa* permite el desarrollo del método en unos pocos días pues germina rápidamente.

5.3.3 - Condiciones del experimento

- Temperatura 20°C
- PH de las muestras comprendido entre 5,5 y 8
- Tiempo de incubación de las semillas: 120 horas
- En ausencia de luz durante la germinación
- Organismo a ensayar: Lactuca sativa
- Muestras: Efluentes líquidos contaminados con Norfloxacin y sometidos a un proceso de oxidación avanzada (Figura 13)

5.3.4 - Material necesario

Pinzas

Vasos de precipitados/matracas

Placas de Petri (3 por muestra)

Pipetas

Regla de doble milímetro

Papel de filtro

Alcohol 96%

Agua destilada

Electrolito soporte (Na_2SO_4)

Film transparente

5.3.5 - DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.3.5.1 - Preparación de las placas de Petri

- Colocar en una placa de Petri un papel de filtro (con las pinzas).
- Anotar con un rotulador permanente qué muestra se va a introducir en ella (ver Figura 14).



Figura 14. Preparación de las placas de Petri

5.3.5.2 - Impregnación del papel de filtro

Verter con una pipeta 3mL de la muestra sobre el papel de filtro (se recomienda empezar por el agua destilada, nuestro control), repartiéndolo bien sobre todo el papel (Figura 15).

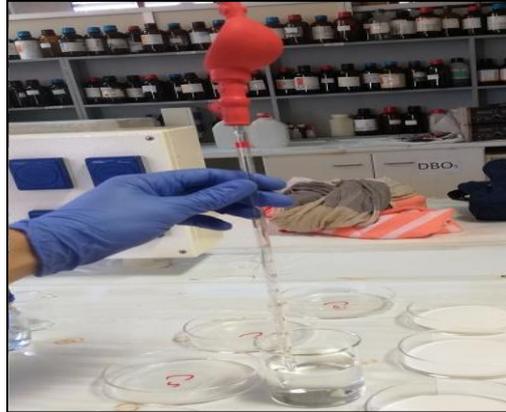


Figura 15. Proceso de impregnado del papel de filtro

5.3.5.3 - Colocación de las semillas

Minuciosamente, colocar con las pinzas (sin llegar a tener contacto con el papel impregnado) 20 semillas en el papel impregnado, de modo que queden según lo indicado en la Figura 16.

Nota: Dado el caso en que la pinza entrase en contacto con alguna de las disoluciones, lavar bien con agua destilada y alcohol y dejar secar para evitar contaminación cruzada con el resto de muestras que se prepararían a continuación.

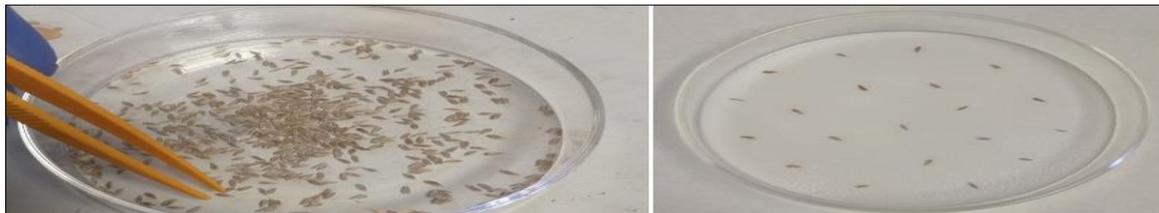


Figura 16. Proceso de colocación de las semillas y resultado final de una placa

Después de la preparación de cada grupo de 3 placas de Petri por muestra en cada ensayo, se deberá lavar también con agua destilada y alcohol la pipeta empleada para el vertido de la muestra para evitar contaminar la pipeta y que repercuta en las siguientes muestras.

5.3.5.4 – Almacenaje

Se guarda la placa de Petri de la muestra en una caja con tapa o que se pueda cerrar.

Volver al punto inicial del desarrollo y proceder del mismo modo hasta completar 3 placas de Petri para la muestra escogida (60 semillas en total).

Antes de cambiar de muestra, lavar bien la pipeta de acuerdo a lo indicado anteriormente con agua destilada y alcohol antes de pasar a la siguiente muestra.

Efectuar un muestreo de 2mL de la siguiente muestra a emplear (es decir, tomar 2mL y desecharlos antes de empezar con la impregnación de los papeles de filtro).

Volver al punto inicial de preparación de las placas de Petri y proseguir de igual forma con todas las muestras disponibles.

Una vez se haya terminado con todas las muestras disponibles, guardar la caja con todas las placas en algún armario o algún lugar seco y oscuro, de modo que su crecimiento sea en ausencia de luz y a 20°C.

5.3.5.5 - Medición y toma de resultados

Transcurridas 120h desde la colocación de las semillas, se procederá a medir minuciosamente y con una regla milimetrada (de acuerdo a la Figura 17, de doble milímetro mejor para mayor precisión) la elongación de la radícula de cada una de las semillas de cada muestra, y se anotará el valor.

Se calculará además como parámetro indicador de toxicidad la media del porcentaje de germinación (%) de las 60 semillas de cada muestra.



Figura 17. Semillas después del proceso de germinación y detalle del proceso de medición

Después de cada ensayo, se deben lavar perfectamente todas las placas de Petri así como los vasos de precipitados, pinzas y matraces de modo que se elimine cualquier posible contaminación durante la realización del ensayo y que ésta tenga efecto en los resultados del siguiente. Para ello se empleará agua destilada y alcohol.



Figura 18. Etapas en el ensayo de toxicidad con semillas para cada una de las muestras

5.3.6 - Problemática durante el desarrollo

5.3.6.1 - Aparición de hongos

Transcurridos algunos ensayos, durante un par de semanas los resultados obtenidos distaban bastante de los de las anteriores semanas, no sólo en porcentajes de germinación que como se verá más adelante no se admiten como estadísticamente viables, sino sobre todo por la aparición de hongos (ver Figura 19).

Esta aparición se explica bien por el posible exceso de humedad en las placas de Petri, bien por alguna otra característica del proceso como la temperatura que fuese demasiado alta, o por la contaminación de las semillas pues aunque se guardaban en lugar seco y cerradas en una bolsa hermética, era una posibilidad a contemplar.



Figura 19. Aparición de hongos puntuales en semillas, impidiendo su germinación

5.3.6.2 - Propuesta frente a los hongos – Esterilizado + Almacenamiento en frigorífico

En este punto y debido a la citada aparición de los hongos de forma regular, se consultó con el Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Siguiendo sus consejos, y de acuerdo con otros estudios que así lo respaldan [52], se optó por la esterilización de las semillas en un primer momento, para descartar la posible contaminación de las mismas. De acuerdo con la Universidad de Chicago y avalado por gran parte de la literatura científica [53], dentro de los posibles métodos de esterilización el más apropiado para tratar las semillas de lechuga sería su esterilización con alcohol. Así, las instrucciones seguidas para el esterilizado de las semillas, proporcionadas por el Instituto, y en concordancia con las consultadas de acuerdo con la Universidad de Hohenheim [54], fueron:

- Se pesan aproximadamente 6 mg de semillas (son alrededor de unas 300 semillas, teniendo en cuenta que emplearemos sobre esa cantidad y se colocan en un Eppendorf).
- Se añaden 900 µl de la solución de esterilizado: ETOH 70% + 0.005% Triton X-100. Se agita constantemente durante 3 minutos.

Esta solución de esterilizado, si bien con alcohol 70% bastaría, fue la proporcionada por el Instituto, al cual se le pidió una solución de esterilizado basada en alcohol isopropílico del 70% (el cual contiene 70mL de etanol absoluto por cada 100mL de solución alcohólica), pues frente a otras disoluciones como el alcohol puro, por ejemplo, ha demostrado ser menos agresivo y no provocar un estado inactivo en las semillas. [55])

- Se elimina la solución de esterilizado.
- Se añade a las semillas 900 µl de ETOH 96% y se agita durante 1 minuto.
- Con una pipeta se toman las semillas y se colocan encima de un papel estéril.
- Dejar secar el alcohol y con la ayuda de unas pinzas y una punta estéril, se distribuyen las semillas por la placa como se indicó en las instrucciones anteriores a éstas.
- Se sellan las placas.

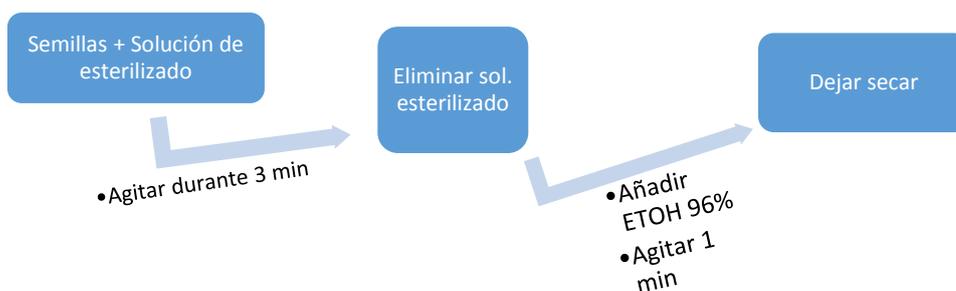


Figura 20. Esquema del proceso de esterilizado de las semillas

Después del proceso de esterilizado, y de igual forma al procedimiento habitual, se mantuvieron en una caja cerrada durante 5 días.

Como medida adicional, la caja a su vez se guardó en una nevera a temperatura controlada (20°C), de modo que se descartase una temperatura no admisible durante el proceso de germinación.

Los resultados en este caso no sólo fueron similares a los obtenidos en los ensayos previos en cuanto a aparición de hongos se refiere sino que únicamente en las placas con el papel

impregnado en agua destilada llegaron a germinar semillas, como se puede apreciar en la imagen de la Figura 21.



Figura 21. Germinación nula tras el proceso de esterilizado

En este punto, la única conclusión viable ante no sólo la nueva aparición de hongos sino además la nula germinación de las semillas, fue que al margen de un proceso de esterilización demasiado agresivo para con las semillas, de modo que neutralizaba su poder de germinación, pese al esterilizado de las mismas, en el avance del proceso había algún elemento que interfería de manera muy agresiva durante el desarrollo del mismo.

5.3.6.3 - Nueva propuesta – Semillas nuevas

Ante la comentada aparición de los hongos también en los ensayos realizados en el Instituto, si se optaba por esterilizar todo el material empleado en el ensayo de toxicidad aguda, dado que requeriría de una gran cantidad de tiempo para llevar a cabo el proceso de esterilizado de la totalidad del material empleado, se descartó esa opción.

La posibilidad de la contaminación de las semillas debido al calor era una a contemplar también. La temperatura real de trabajo se estima en 20/22°C, pero dado que se hacía en un laboratorio cerrado sin ventilación ni regulación de la temperatura, es posible que en los días de verano la temperatura fuese superior durante el proceso de colocación y preparación de las semillas en las placas de Petri, de modo que los primeros días las semillas se hubiesen visto sometidas a una contaminación por temperatura superior a la admisible.

En relación a la temperatura de trabajo con las semillas, en algún estudio se comenta que para el caso concreto de las semillas de lechuga, para conseguir la óptima germinación y viabilidad de todo el proceso, no se deberá trabajar nunca a una temperatura superior (aunque sea un par de grados °C) a la estipulada en las condiciones de trabajo aunque sea durante un tiempo de exposición muy pequeño y posteriormente colocadas a temperaturas inferiores. Este efecto es conocido como ‘termodormancia’ o ‘dormancia inducida por la temperatura’. [56]

Ante la imposibilidad de mejorar las condiciones del lugar de trabajo, se optó por adquirir nuevas semillas y realizar nuevos ensayos guardando éstas también en el frigorífico, pues además la variedad adquirida recomendaba su cultivo a una temperatura menor a 20°C.

La nueva variedad *Lactuca sativa* (Figura 22) mostraba unas características de tamaño, forma y color de germinación iguales a la anterior.



Figura 22. Nueva variedad de Lactuca Sativa adquirida y Condiciones de Germinación

Los nuevos datos obtenidos, pese a mantener la existencia de ciertos hongos de manera puntual, presentaban estadísticamente viabilidad para su comparación con los datos previos obtenidos con la variedad anterior, como se puede ver en el apartado de Análisis de los resultados.

5.3.7 - Procesado de datos

Con las medidas de la elongación de cada una de las muestras, se efectuará una media de cada una de las 3 placas de Petri por solución. Estos datos serán tratados a continuación en un programa estadístico, el Past UIO.

Este programa estadístico creado en 1995 [57] y con actualizaciones constantes, se emplea en numerosas industrias, no únicamente para el análisis de datos paleontológicos para los que fue inicialmente diseñado, sino en económicas, ingeniería y en especial en el tratamiento de datos relativos a ciencias de la tierra.

Es un programa gratuito que puede descargarse desde internet. Así, del propio manual [58] y de acuerdo con el procedimiento realizado por un compañero del departamento, se deberán seguir los siguientes pasos:

- Se deberán poner en filas o columnas por separado los datos de las 3 medias de elongación de cada una de las muestras.
- Seleccionar los 3 valores de una de las muestras y en el menú, seleccionar Normality Test. Éste computa y analiza, a partir de un mínimo de 3 valores, la normalidad de la serie de datos.
- Si el p-value es $p\text{-value} > 0,05$, la muestra sigue una distribución normal. En caso contrario, se procederá de forma diferente para su comparación con el control y evaluar de este modo la significancia de la muestra y por ende su toxicidad.
- Realizar el mismo procedimiento con todas las muestras.

Ahora se debe comparar la significancia de los datos con el control, para ello:

- Seleccionar todos los datos cuyo p-value fuese superior a 0,05, y seleccionar 'Several-sample tests' en el menú de opciones. Ir a la pestaña 'Tuckey's pairwise'. Observar todos los valores de p-value. Aquellos menores a 0,05, indican que la muestra es tóxica.

- Seleccionar todos los datos cuyo p-value fuese menor a 0,05, y seleccionar ‘Several-sample tests’ en el menú de opciones. Ir a la pestaña “Mann-Whitney pairwise’. Observar todos los valores de p-value. Aquellos menores a 0,05, indican que la muestra es tóxica.

Con los datos obtenidos y procesados con el programa Past UIO (ver Figura 23), se procede a ordenar todos los datos obtenidos y a su tratamiento, de modo que se pueda evaluar no sólo qué muestras fueron tóxicas y si se correlacionan ambas medidas, de acuerdo a la variación en la elongación de la radícula y el porcentaje de germinación, sino también cuál de los electrodos empleados en el proceso de oxidación avanzada consiguió una mayor disminución de la toxicidad.

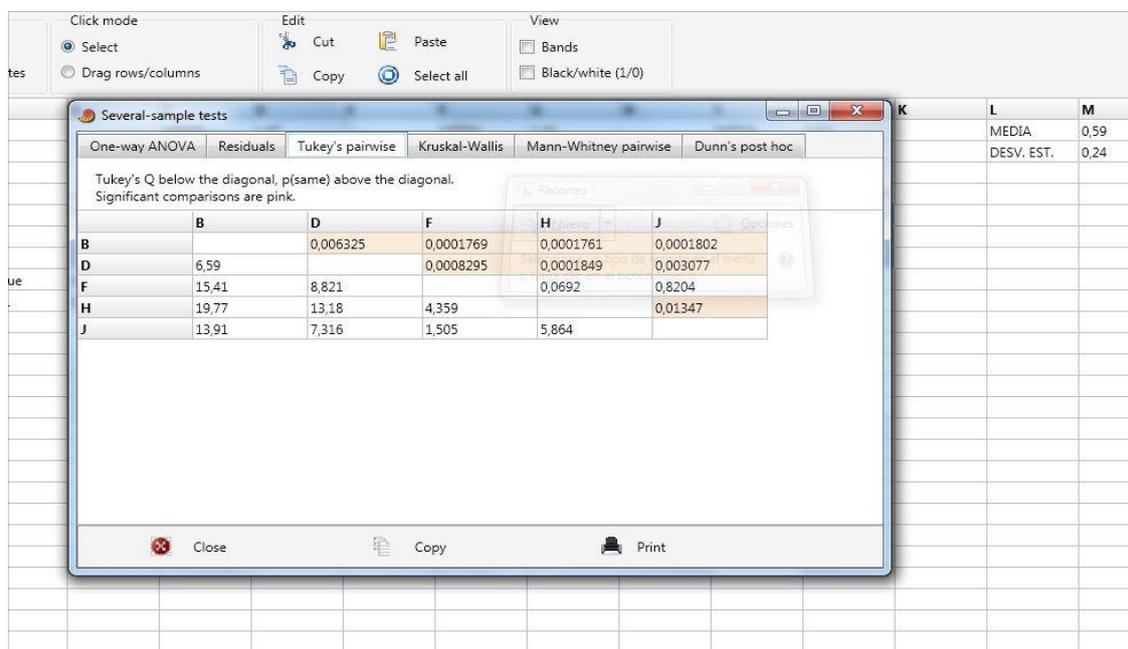


Figura 23. Imagen del programa estadístico empleado, Past UIO

6. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

A continuación se mostrarán los resultados obtenidos tanto con el método del Microtox como con el método de las semillas, se explicará el tratamiento realizado con los mismos particularmente para cada caso y posteriormente se analizarán en función del electrodo con el que se ha tratado cada muestra en el proceso previo de oxidación avanzada y de las condiciones de trabajo.

No obstante y como paso anterior a la visualización de los resultados, es de vital importancia conocer la nomenclatura que se le ha otorgado a cada uno de los electrodos empleados como ánodo en el proceso de oxidación avanzada al que han sido sometidas las muestras del agua

residual con Norfloxacino, pues de ahora en adelante cada una de las muestras será referida por el nombre del electrodo con el que se ha tratado así como su método de trabajo.

En el caso de los electrodos cerámicos, para la obtención de cada uno de ellos se trabajó a una temperatura de sinterizado diferente, por lo que se ha asignado para cada temperatura de trabajo una nomenclatura distinta. Mediante este proceso, se consigue aumentar la resistencia mecánica, aumentando el tamaño de grano y pasando de un estado de polvo cerámico a otro compacto y coherente.

Por otro lado, la oxidación avanzada se llevó a cabo con dos metodologías de trabajo distintas: por un lado, fijando el valor de la intensidad y, por otro lado, fijando el potencial del electrodo con ayuda de un electrodo de referencia, concretamente se empleó un electrodo de plata/cloruro de plata.

La nomenclatura final queda del siguiente modo:

- BDD – Se empleó a potenciales de trabajo de 2,5 y 3 $V_{Ag/AgCl}$. También se trató la muestra empleando el BDD a distintas intensidades de trabajo (5, 10 y 15 mA).
- Cerámicos:
 - R24 – Tª de sinterizado de 1050°C
 - R27 – Tª de sinterizado de 1100°C
 - R20 – Tª de sinterizado de 1150°C
 - R30 – Tª de sinterizado de 1200°C
 - R04 – Tª de sinterizado de 1300°C
 - En este caso, se ha trabajado a potencial de electrodo constante (2,5 $V_{Ag/AgCl}$) y Tª de sinterizado variable, a intensidad constante (15mA) y Tª de sinterizado variable, y a Tª de sinterizado constante (1150°C, es decir, R20) y potencial variable (E).

6.1 – Método Microtox

De las medidas realizadas mediante el método del Microtox y de acuerdo con el procedimiento presentado previamente, se obtenían para cada ensayo 3 valores de luminiscencia para cada cubeta anteriores a la puesta en contacto de las bacterias y la muestra (únicamente con diluyente y el reactivo, 'Blanco' de ahora en adelante), y 3 más después de su puesta en contacto. De este modo, en el programa informático del propio Microtox, se introducía la media de estas 3 medidas.

A partir de todas las medidas suministradas al programa, éste generaba el dato de toxicidad de la muestra en concentración de EC50, de modo que haciendo su inversa de acuerdo a lo indicado en la ecuación (4), se obtiene el valor de UT buscado mediante este método.

Los resultados obtenidos en las mediciones fueron los indicados en las tablas que se muestran a continuación:

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	93	81	90	92	89	9%	11,11
	Valor2	93	81	89	92	88		
	Valor3	93	80	89	91	89		
	Promedio	93,00	80,67	89,33	91,67	88,67		
15 mA R04 pH 6,4	Valor1	93	55	35	3	1		
	Valor2	93	55	34	3	1		
	Valor3	92	56	35	3	1		
	Promedio	92,67	55,33	34,67	3,00	1,00		

Tabla 1. Datos de Toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R04

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	93	91	89	94	99	22%	4,45
	Valor2	92	90	89	92	96		
	Valor3	90	90	90	93	97		
	Promedio	91,67	90,33	89,33	93,00	97,33		
15 mA R20 pH 6,2	Valor1	93	80	64	50	26		
	Valor2	92	79	63	50	26		
	Valor3	92	78	63	50	27		
	Promedio	92,33	79,00	63,33	50,00	26,33		

Tabla 2. Datos de Toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R20

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	94	95	95	91	97	2%	50
	Valor2	92	95	93	90	95		
	Valor3	93	95	93	90	96		
	Promedio	93,00	95,00	93,67	90,33	96,00		
15 mA R24 pH 6,3	Valor1	93	15	5	1	0		
	Valor2	93	15	5	1	0		
	Valor3	93	15	5	1	0		
	Promedio	93,00	15,00	5,00	1,00	0,00		

Tabla 3. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R24

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	92	100	102	95	99	73%	1,37
	Valor2	91	98	100	96	100		
	Valor3	91	98	100	96	99		
	Promedio	91,33	98,67	100,67	95,67	99,33		
15 mA R30 pH 5,72	Valor1	75	76	75	60	48		
	Valor2	75	75	72	60	48		
	Valor3	75	74	73	59	47		
	Promedio	75,00	75,00	73,33	59,67	47,67		

Tabla 4. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R30

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	92	81	92	84	83	18%	5,55
	Valor2	93	80	90	83	82		
	Valor3	92	80	91	82	81		
	Promedio	92,33	80,33	91,00	83,00	82,00		
15 mA R27 pH 6,38	Valor1	95	54	84	24	33		
	Valor2	94	54	84	24	33		
	Valor3	94	54	84	24	33		
	Promedio	94,33	54,00	84,00	24,00	33,00		

Tabla 5. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA R27

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	94	112	101	102	111	57%	1,75
	Valor2	94	113	101	102	113		
	Valor3	92	113	100	100	113		
	Promedio	93,33	112,67	100,67	101,33	112,33		
3V R30 pH 5,00	Valor1	94	124	104	94	74		
	Valor2	95	125	105	93	73		
	Valor3	94	123	105	93	73		
	Promedio	94,33	124,00	104,67	93,33	73,33		

Tabla 6. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 3V R30

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	93	83	101	93	99	27%	3,8
	Valor2	93	82	100	92	100		
	Valor3	93	83	100	94	101		
	Promedio	93,00	82,67	100,33	93,00	100,00		
2,5V BDD pH 5,47	Valor1	94	67	65	48	45		
	Valor2	94	68	65	48	45		
	Valor3	94	67	63	48	45		
	Promedio	94,00	67,33	64,33	48,00	45,00		

Tabla 7. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 2,5V BDD

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	94	109	117	108	111	9%	11,11
	Valor2	92	107	116	107	111		
	Valor3	93	107	116	107	111		
	Promedio	93,00	107,67	116,33	107,33	111,00		
3V BDD pH 5,27	Valor1	94	87	52	4	0		
	Valor2	94	88	52	4	0		
	Valor3	95	87	52	4	0		
	Promedio	94,33	87,33	52,00	4,00	0,00		

Tabla 8. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 3V BDD

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	94	107	103	107	88	Necesario diluir	
	Valor2	93	106	102	106	89		
	Valor3	94	106	102	105	88		
	Promedio	93,67	106,33	102,33	106,00	88,33		
100 ppm NOR	Valor1	74	35	34	36	30		
	Valor2	73	35	34	36	29		
	Valor3	73	34	34	35	29		
	Promedio	73,33	34,67	34,00	35,67	29,33		

Tabla 9. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra inicial (antes de ser tratada mediante oxidación avanzada)

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	93	102	94	99	118	Tox = 0 , Aumentar concentración	Esta muestra se repitió una tercera vez más tarde (Tabla 11) con resultados satisfactorios.
	Valor2	93	102	93	98	116		
	Valor3	93	102	93	98	115		
	Promedio	93,00	102,00	93,33	98,33	116,33		
100 ppm FD (1:10) NOR	Valor1	93	77	85	76	68		
	Valor2	93	76	85	74	68		
	Valor3	93	76	86	74	68		
	Promedio	93,00	76,33	85,33	74,67	68,00		

Tabla 10. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra inicial con un factor de dilución 1:10

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	92	96	85	87	78	5%	20
	Valor2	92	94	85	87	78		
	Valor3	92	95	85	86	78		
	Promedio	92,00	95,00	85,00	86,67	78,00		
100 ppm FD (1:2) NOR	Valor1	94	48	41	38	36		
	Valor2	94	48	41	38	36		
	Valor3	93	48	41	38	37		
	Promedio	93,67	48,00	41,00	38,00	36,33		

Tabla 11. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra inicial con un factor de dilución 1:2

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa
Blanco	Valor1	91	52	105	87	89	Necesario diluir
	Valor2	91	51	104	86	88	
	Valor3	92	50	102	85	87	
	Promedio	91,33	51,00	103,67	86,00	88,00	
2,5 V R24 pH 6,2	Valor1	78	11	4	2	0	Esta muestra se repitió (Tabla 13), con resultados satisfactorios.
	Valor2	78	11	4	2	0	
	Valor3	78	11	4	2	0	
	Promedio	78,00	11,00	4,00	2,00	0,00	

Tabla 12. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 2,5V R24

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	93	102	94	102	103	7%	14,3
	Valor2	94	103	94	101	102		
	Valor3	93	101	94	101	102		
	Promedio	93,33	102,00	94,00	101,33	102,33		
2,5V R24 pH 6,2 FD (1:2)	Valor1	93	74	20	6	2		
	Valor2	93	74	20	6	2		
	Valor3	93	73	20	6	2		
	Promedio	93,00	73,67	20,00	6,00	2,00		

Tabla 13. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 2,5V R24. FD (1:2)

		B1	B2	B3	B4	B5	Resultado Programa	UT
Blanco	Valor1	92	104	95	85	96	Hormesis	-
	Valor2	92	102	94	85	96		
	Valor3	92	102	95	85	97		
	Promedio	92,00	102,67	94,67	85,00	96,33		
15 mA BDD pH 6,08	Valor1	94	0	0	0	0		
	Valor2	94	0	0	0	0		
	Valor3	94	0	0	0	0		
	Promedio	94,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

Tabla 14. Datos de toxicidad con Microtox para la muestra 15mA BDD

Como se puede ver, en ciertas ocasiones hubo que repetir hasta 3 veces una muestra (Tablas 9-11), cosa que redujo nuestra capacidad global de análisis de diferentes muestras, pues para cada vial de bacterias el número de mediciones es limitado.

Del mismo modo, en la Tabla 14 se puede apreciar que el programa nos indicó como resultado "Hormesis", que como se ha definido anteriormente, indica que tiene un comportamiento inestable a dosis altas y bajas, debido a la sensibilidad en la zona de pH donde se está trabajando.

Aquellas muestras que en el posterior análisis y obtención de conclusiones no presente datos de UT es debido a que de acuerdo al número de horas que se deben dedicar al TFG, la posibilidad de realizar nuevas mediciones empleando este método quedó descartada.

6.2 - Método de las semillas

En el caso del ensayo estático de toxicidad aguda mediante las semillas de Lactuca Sativa, los resultados obtenidos han sido de 60 datos por muestra y ensayo (correspondientes a la medición de la radícula para cada una de las 3 placas que se prepararon por muestra, cada una de ellas con 20 semillas).

Con estos datos, se calculaba en primer lugar la media de cada una de las placas, su media global y las desviaciones estándar tanto de la media global como de la media particular de cada placa. De este modo y como se ha explicado previamente, eran estos valores particulares de las 3

medias para cada muestra los que se comparaban con las 3 medias de las 3 placas del control del mismo día de ensayo mediante el programa estadístico Past UIO. Con esto se obtiene el valor del p-value, de modo que nos indica si estadísticamente es una muestra tóxica. Además, directamente evaluada como la media de la germinación (en %) de los 3 ensayos para cada muestra, se obtiene la germinación global de la muestra (en %).

Los resultados obtenidos mediante este método son los indicados en las tablas y gráficos que se muestran a continuación:

crecimiento radicular

	Control (agua destilada)			Na ₂ SO ₄			100 ppm			10 mA R20			2,5V BDD		
1	1,4	1,1	0,8	1	0,7	0,8	0,6	0,7	1	1,1	0,3	0,2	0,6	0,2	0,4
2	1,1	0,7	0,5	1,5	0,6	0,6	0,6	0,9	2,2	0,4	0,5	0,4	0,9	0,4	0,5
3	1,3	0,9	0,8	0,5	0,8	0,8	0,7	1,5	1	0,7	0,5	0,9	0,7	0,9	1
4	1,1	0,6	0,7	0,9	0,8	0,4	0,7	0,8	0,8	1,2	0,6	1	0,8	0,6	0,8
5	0,7	0,9	1,3	0,4	0,6	0,5	0,5	1	0,8	0,9	0,3	0,4	0,6	0,7	0,8
6	1,2	1,1	0,6	0,6	0,7	1	0,5	0,8	0,7	0,5	0,4	0,6	0,5	0,9	0,6
7	0,9	0,5	1	0,6	0,8	0,8	0,5	0,6	0,9	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	0,7
8	0,8	0,6	0,8	0,9	0,6	0,4	0,8	0,8	0,7	0,6	0,4	0,4	0,9	0,9	0,6
9	1,2	0,3	0,9	1,4	1,4	0,7	0,4	0,5	0,8	0,6	0,4	0,8	0,7	0,7	0,8
10	0,7	1,1	0,7	0,7	1,2	1	0,9	0,5	0,4	0,7	0,6	0,9	0,6	0,7	0,9
11	0,6	1,4	1	0,6	0,8	0,2	0,9	1	0,7	0,6	0,5	0,6	0,7	0,5	0,5
12	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	0,1	0,4	0,4	0,5	0,9	1
13	0,9	0,9	0,6	0,5	1	0,5	0,7	0,6	0,9	0,5	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8
14	1,4	1,1	0,6	0,9	0,6	0,7	0,8	0,5	0,6	0,4	0,5	0,7	0,6	0,7	0,8
15	0,4	0,8	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,6	0,5		0,7	0,6	0,6	0,5	0,8
16	1,1	0,4	0,4	0,7	0,5	0,5	0,8	0,7	0,2		0,7	0,7	0,5	0,8	0,3
17	0,5	1	0,2	0,8	1,1	0,5	0,8	0,3	0,1		0,8	0,4	0,4	0,5	0,8
18	0,1	0,7	0,2	0,8	0,6	0,5	0,7		0,6		0,6	0,6	0,4	0,2	1,4
19	0,2	1,2		0,6	0,4	0,6	0,3		0,8					0,4	
20				0,4	0,6	0,6	0,1		0,7					0,6	
	MEDIA	0,79		MEDIA	0,70		MEDIA	0,71		MEDIA	0,58		MEDIA	0,66	
	DESV. EST	0,33		DESV. EST	0,26		DESV. EST	0,31		DESV. EST	0,22		DESV. EST	0,22	

Media	0,85	0,83	0,68	0,76	0,73	0,62	0,64	0,74	0,76	0,63	0,52	0,59	0,63	0,62	0,75
DP	0,39	0,30	0,28	0,30	0,27	0,20	0,21	0,27	0,41	0,29	0,14	0,21	0,14	0,22	0,25

NORMAL	p-value
si	0,7661

NORMAL	p-value
si	0,8353

NORMAL	p-value
si	0,287

NORMAL	p-value
si	0,4811

Tabla 15. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value - Ensayo1

germinacion

	1		2			3		
	20,0	100,0		20,0	100,0		20,0	100,0
control	19	95	control	19	95	control	18	90
Na2SO4	19	95	Na2SO4	20	100	Na2SO4	20	100
100 ppm	20	100	100 ppm	17	85	100 ppm	20	100
R 20	14	70	R 20	18	90	R 20	18	90
BDD	18	90	BDD	20	100	BDD	18	90

tratamiento	% germin.	DP
control	93	2,9
Na2SO4	98	2,9
100 ppm	95	8,7
R 20	83	11,5
BDD	93	5,8

Tabla 16. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) – Ensayo 1

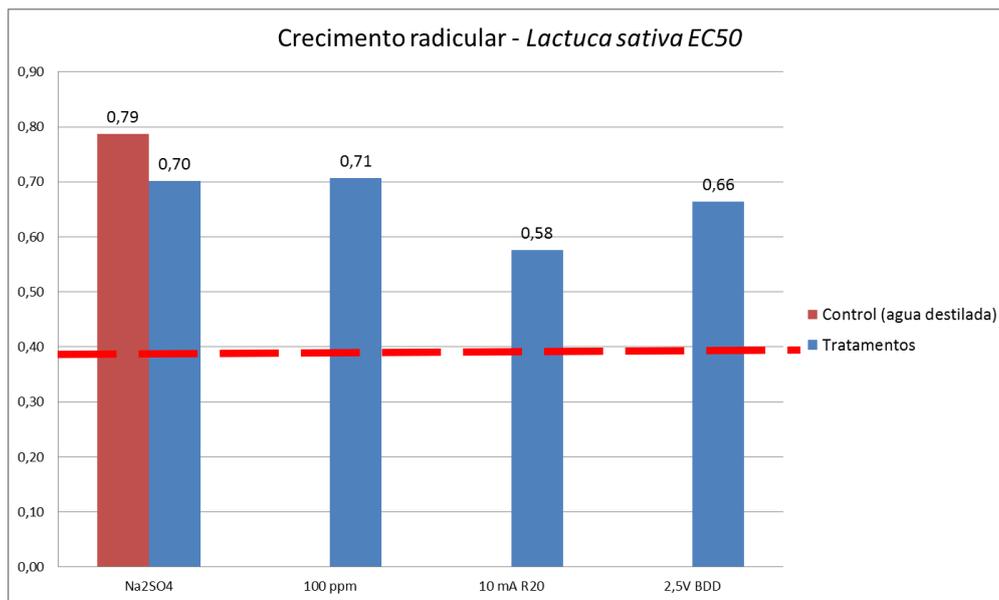


Figura 24. Crecimiento radicular medio y EC50 – Ensayo 1

Al margen de la obtención de los datos de germinación para cada ensayo, así como sus datos por muestra, gráficamente (Figura 24) se puede apreciar claramente si la muestra analizada es tóxica midiendo su valor de EC50, entendido como aquella concentración que logra inhibir el crecimiento de la radícula de al menos el 50% de la población de la muestra.

De igual forma a la expuesta, se procedió con todas las muestras analizadas, siendo los resultados obtenidos los que se exponen a continuación.

crecimiento radicular															
	Control (agua destilada)			Na ₂ SO ₄			5mA R20			2,5V R24			10 mA BDD		
1	1	0,6	2,6	0,3	0,2	0,1	0,1	0,8	0,8	0,3	0,3	0,5	0,7	0,1	0,5
2	1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,9	0,3	0,7	1	0,7	0,8	0,6	0,1	0,2	0,5
3	1,8	0,3	1,6	0,4	0,5	0,7	0,3	0,4	0,8	0,6	0,6	1	0,6	0,3	0,5
4	0,9	0,6	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,8	0,5	0,7	0,6	0,6	0,5	0,6
5	0,9	0,6	0,9	0,4	0,4	0,6	0,6	0,7	0,8	1,5	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
6	0,8	0,7	0,8	0,5	0,6	0,7	0,8	1	0,6	0,6	0,9	0,6	0,4	0,6	0,6
7	2	0,3	0,3	0,8	0,6	1,1	1,2	0,9	1	0,7	0,7	0,7	0,6	0,8	0,7
8	1,2	0,9	1	0,6	0,6	0,9	1,5	0,5	0,7	0,7	0,8	0,6	0,6	0,7	0,4
9	0,9	0,6	1,4	0,5	0,6	1,4	0,9	0,9	1,1	0,7	0,6	0,7	0,8	0,6	0,4
10	1,3	0,6	0,9	1	0,7	0,5	0,8	0,6	0,6	1,1	0,7	0,6	0,3	0,8	0,5
11	0,8	1,7	1,6	0,9	0,8	0,2	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	0,6	0,5	0,9
12	1,9	0,9	0,2	0,8	0,6	0,3	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,8	0,9	0,5	1
13	0,9	0,9	0,6	0,9	0,7	0,4		0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,6	0,5	0,8
14	0,5	0,7	0,9	0,4	0,6	0,6		0,4	0,8	0,5	0,9	0,9	0,9	0,7	0,5
15	0,4	1,7	0,9	1	0,7	0,7		0,8	0,4	0,6	0,7	0,6	0,7	0,8	0,5
16	1	0,8	1,2	1	0,5	0,6		0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5		0,6
17	0,9	1,7	1,1	1		0,9		1	0,8	0,4	0,7	0,5	0,4		0,5
18	0,9	0,5	0,9			1		0,5	0,9	0,6	0,6	0,4	0,3		0,8
19	1,2	0,1	0,1			0,9				0,5			0,6		0,8
20	0,8					0,5									
	MEDIA	0,93		MEDIA	0,65		MEDIA	0,70		MEDIA	0,66		MEDIA	0,58	
	DESV. EST.	0,50		DESV. EST.	0,26		DESV. EST.	0,26		DESV. EST.	0,20		DESV. EST.	0,19	

Media	1,06	0,77	0,97	0,67	0,56	0,70	0,68	0,67	0,73	0,65	0,67	0,66	0,57	0,55	0,62
DP	0,42	0,47	0,58	0,26	0,15	0,32	0,39	0,21	0,21	0,27	0,15	0,16	0,21	0,22	0,17
	más oscuras en 2			zona hongos en 2			zona hongos en 1			hongos puntuales en 2 y 3			zona hongos en 2		

NORMAL	p-value	NORMAL	p-value	NORMAL	p-value	NORMAL	p-value
si	0,0069	si	0,022	si	0,01	si	0,001

Tabla 17. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value – Ensayo 2

Como se puede ver en la tabla anterior (Tabla 17), algunas de las casillas correspondientes al valor del crecimiento de la radícula para el ensayo 2 aparecen en rojo. Corresponden a una semilla rodeada de un hongo. Ésta ha sido la metodología empleada para medir la cantidad de hongos aparecidos. *A priori* no se puede saber si una semilla contaminada con un hongo hubiese germinado si no hubiese aparecido éste, pues ha habido semillas que pese a haber presentado un hongo a su alrededor sí han germinado, aunque sea con una radícula minúscula. Es por ello y de acuerdo a lo expuesto anteriormente, que se tomará como valor significativo de la germinación en los posteriores análisis como un porcentaje de germinación %<50% para que se pueda considerar como tóxica la muestra gracias a este método.

germinacion

1			2			3		
	20,0	100,0		20,0	100,0		20,0	100,0
control	20	100	control	19	95	control	19	95
Na2SO4	17	85	Na2SO4	16	80	Na2SO4	20	100
R20	18	90	100 ppm	18	90	100 ppm	18	90
R24	19	95	R24	18	90	R24	18	90
BDD	18	90	BDD	15	75	BDD	19	95

tratamiento	% germin.	DP
control	97	2,9
Na2SO4	88	10,4
R20	90	0,0
R24	92	2,9
BDD	87	10,4

Tabla 18. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) – Ensayo 2

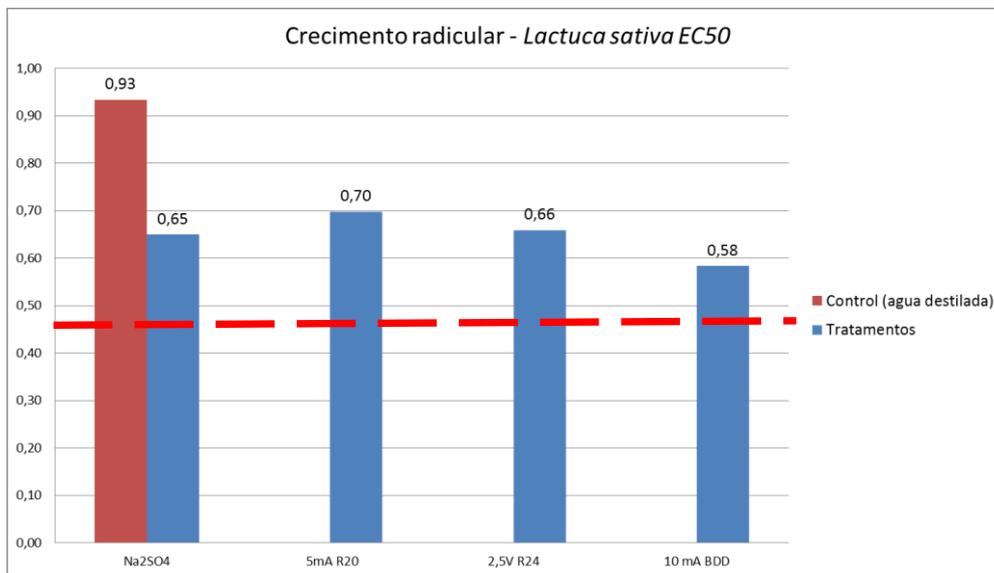


Figura 25. Crecimiento radicular medio y EC50 - Ensayo 2

crecimiento radicular															
	Control (agua destilada)			Na ₂ SO ₄			3V R30 5,47pH			3V BDD 5,27 Ph			2,5V R30 5,69 pH		
1	0,8	0,5	0,7	0,7	0,7	0,4	0,45	0,3	0,4	0,85	0,25	0,5	0,5	0,3	0,4
2	0,8	0,8	0,4	0,3	0,5	0,65	0,45	0,2	0,8	0,5	0,2	0,6	0,45	0,2	0,6
3	0,9	1,25	0,7	0,3	0,6	0,6	0,4	0,6	0,4	0,6	0,25	0,5	0,8	0,3	0,7
4	0,65	1,4	0,6	0,35	0,5	0,2	0,6	0,6	0,5	0,6	0,4	0,65	0,7	0,2	0,7
5	0,5	1,3	0,7	0,4	0,4	0,3	0,45	0,5	0,6	0,8	0,25	0,6	0,65	0,4	0,5
6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,6	0,4	0,65	0,7	0,7	0,4	0,4	0,6	0,4	0,3	0,5
7	0,8	1,8	0,4	0,5	0,9	0,4	0,5	0,4	0,25	1	0,75	0,3	0,5	0,4	0,55
8	0,9	0,8	0,3	0,5	0,5	0,6	0,9	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	1	0,7	0,3
9	0,4	0,4	0,5	0,7	0,6	0,9	0,4	0,35	0,5	0,5	0,4	0,2	0,65	0,6	0,35
10	0,7	0,7	0,7	0,5	0,9	0,6	0,4	0,4	0,6	1	0,5	0,6	0,65	0,5	0,45
11	0,6	0,7	0,5	0,6	1,1	0,5	0,5	0,5	0,6	0,55	0,3	0,4	0,35	0,5	0,6
12	1	0,9	0,8	0,75	0,7	0,5	0,6	0,5	1	1	0,4	0,5	0,6	0,4	1,1
13	0,8	1,1	0,8	0,4	0,6	0,9	0,35	0,7	0,8	0,5	0,35	0,6	0,3	1	0,6
14	0,8	0,8	0,8	0,4	0,4	0,6	0,5	0,7	0,65	0,6	0,2	0,6	0,45	0,7	0,5
15	1	1,5	0,7	0,5	0,4	1,1	0,4	0,5	0,7	0,5	0,3	0,35	0,6	0,5	0,6
16	1,3	0,45	0,6	0,6	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6	0,65	0,4	0,45	0,7	0,3	
17	0,9	0,9	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2			
18	1,1	0,5	0,9	0,2	0,2	0,9	0,6	0,8	0,5	0,3	0,3	0,2			
19	2		0,8	0,3		0,7	0,7				0,2	0,1			
20			1,15				0,8				0,15	0,4			
	MEDIA	0,80		MEDIA	0,54		MEDIA	0,54		MEDIA	0,46		MEDIA	0,53	
	DESV. EST.	0,34		DESV. EST.	0,21		DESV. EST.	0,16		DESV. EST.	0,21		DESV. EST.	0,20	

Media	0,87	0,91	0,65	0,46	0,58	0,59	0,53	0,51	0,58	0,62	0,34	0,45	0,58	0,46	0,56
DP	0,35	0,40	0,20	0,16	0,22	0,24	0,15	0,16	0,18	0,22	0,15	0,17	0,18	0,21	0,19
				NORMAL	p-value										
				si	0,1468		si	0,074		si	0,022		si	0,066	

Tabla 19. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value - Ensayo 3

GERMINACIÓN

	control	%	Na ₂ SO ₄	%	3V R30	%	BDD	%	2,5V R30	2,5V R30
1	19	95,00	19	95,00	20	100,00	18	90,00	16	80,00
2	18	90,00	18	90,00	18	90,00	20	100,00	16	80,00
3	20	100,00	19	95,00	18	90,00	20	100,00	15	75,00
MEDIA	19	95,00	19	93,33	19	93,33	19	96,67	16	78,33
DP	1,0	5,0	0,6	2,9	1,2	5,8	1,2	5,8	0,6	2,9

tratamiento	% germin.	DP
control	95	5,0
Na ₂ SO ₄	93	2,9
3V R30	93	5,8
BDD	97	5,8
2,5V R30	78	2,9

Tabla 19. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) - Ensayo 3

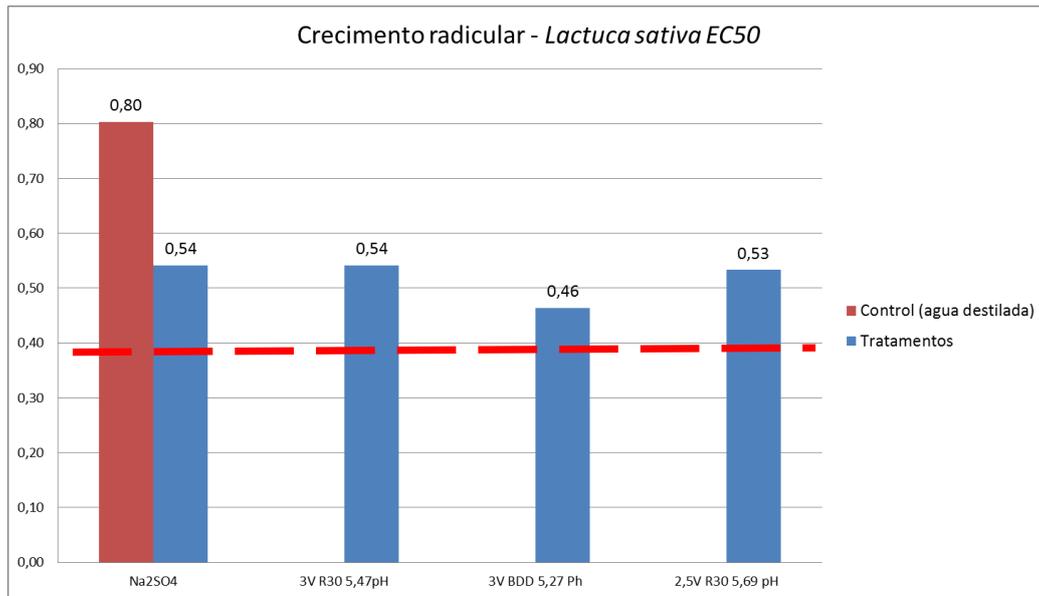


Figura 26. Crecimiento radicular medio y EC50 - Ensayo 3

crecimiento radicular

	Control (agua destilada)			Na ₂ SO ₄			15 mA R20			3V BDD			3V R30		
1	3,5	3,4	3,8	2,6	1,6	1,5	0,7	0,5	0,9	1,2	1,6	1,3	0,7	0,5	1
2	2,5	2,9	2,4	2,5	2,3	3	0,4	0,3	0,8	0,9	0,6	1,3	0,3	0,7	0,5
3	3,3	2,4	2,4	2,8	2,2	2,6	1,1	0,4	0,8	1,5	0,8	1	0,8	1	0,7
4	3,9	1,9	2,9	2,2	2,1	1,6	0,5	1,3	1,1	1,3	1,2	1,1	1	1,2	0,8
5	3,6	2,8	0,3	2,8	2,5	2,1	0,6	0,3	1,2	1,5	0,9	1	0,4	0,8	0,4
6	2,8	3	2,2	2,7	2,8	2,3	1,1	0,4	0,4	1,3	0,8	1,1	0,7	0,5	1,1
7	2,9	3,2	3	3,2	2,9	2,5	1,4	1,4	0,8	1,2	1,8	1,5	1,2	0,6	0,8
8	0,7	3,2	3,3	2,9	2,4	1,4	1,3	0,4	0,7	0,9	1,9	0,9	0,4	0,6	1,1
9	3,7	3	1,4	2,8	2,5	2,5	0,8	1,3	0,9	1,1	1,6	1,6	0,8	0,7	0,5
10	3	1,5	1,1	2,5	2,3	2,4	0,7	1,3	1	1,6	1,4	1,8	0,9	0,7	0,8
11	1,5	2,5	2	1,5	3	2,8	1,1	0,9	1,6	1,1	0,7	1	0,9	0,7	0,9
12	3,7	3,9	2,5	2,3	2,5	2,7	1,2	1,1	0,5	1,5	0,6	0,9	0,6	0,5	0,7
13	3,2	3,6	2,5	2,1	3	2,8	1	1	1,1	0,8	1,3	1,6	0,7	1	0,9
14	1,7	3,2	1,6	2,2	1,5	1,9	1,3	1,1	1,2	0,8	1,1	1,2	1,4	0,9	1,4
15	1,3	2,8		2,2	2,1	2,4	0,7	1	1,2	1,4	1,3	1,3	0,7	1,1	1,4
16	1,2	3,6		2,9	1,5	1,2	1,3	0,5	0,5	1,7		1,1	0,3	1,3	1,1
17	3,2	1		1,8	2,4	1,6	0,6	0,8	1	1,2		1,6	0,3	0,2	0,4
18	1,5	3		2,1	1,2	2,7	0,9	0,2	0,7			0,9	0,7		0,4
19	2			2,2	1,9	1,8	0,5		0,5						0,2
20				1,3	0,2										0,4
	MEDIA	2,58		MEDIA	2,24		MEDIA	0,86		MEDIA	1,22		MEDIA	0,75	
	DES. EST.	0,91		DES. EST.	0,58		DES. EST.	0,35		DES. EST.	0,33		DES. EST.	0,31	

Media	2,59	2,83	2,24	2,38	2,25	2,10	0,91	0,79	0,89	1,24	1,17	1,23	0,71	0,76	0,78
DP	1,01	0,75	0,92	0,49	0,52	0,70	0,32	0,41	0,31	0,28	0,43	0,28	0,31	0,29	0,34

NORM	p-value
si	0,2318

NORM	p-value
si	0,0001762

NORM	p-value
si	0,00018

NORM	p-value
si	0,00018

Tabla 20. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value - Ensayo 4

germinacion

1			2			3		
	20,0	100,0		20,0	100,0		20,0	100,0
control	19	95	controle	18	90	controle	14	70
Na2SO4	20	100	Na2SO4	19	95	Na2SO4	20	100
15 mA R20	19	95	15 mA R20	18	90	15 mA R20	19	95
3V BDD	17	85	3V BDD	15	75	3V BDD	18	90
3V R30	18	90	3V R30	17	85	3V R30	20	100

tratamiento	% germin.	DP
controle	85	13,2
Na2SO4	98	2,9
15 mA R20	93	2,9
3V BDD	83	7,6
3V R30	92	7,6

Tabla 21. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) - Ensayo 4

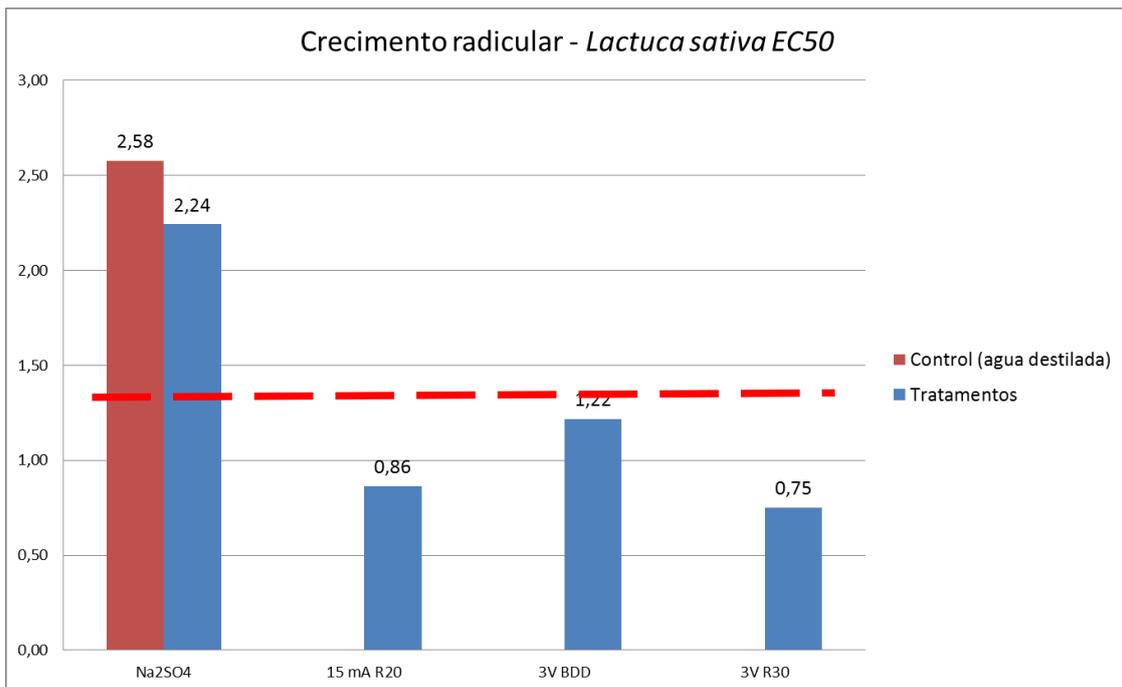


Figura 27. Crecimiento radicular medio y EC50- Ensayo 4

crecimiento radicular

	Control (agua destilada)			Na ₂ SO ₄			15 mA R24			5 mA R20			2,5V R24		
1	1,1	1	0,7	2	1,4	1,4	0,5	0,8	0,7	0,7	0,3	0,7	0,7	0,8	0,7
2	2,8	1,7	2,4	1,4	0,6	2,1	0,9	1	1,2	0,4	0,4	0,4	0,8	1	0,8
3	3	0,5	2,1	1,5	1,3	0,8	0,5	0,9	1,1	0,5	0,3	0,4	1	0,7	1,2
4	1,9	2	2,6	1,4	1,7	1,6	0,4	1	1,2	0,5	0,4	0,5	0,9	0,9	1,7
5	1,8	2,4	2	1,3	1,6	1,4	0,9	1,2	0,6	0,4	0,3	0,6	0,8	0,8	1,4
6	0,9	1,8	2	1,2	2	1,2	1	0,8	0,9	0,5	1	1,2	1,3	1,2	1,2
7	1	1,4	1,6	1,8	1,6	1,8	1,1	0,8	1	0,4	0,4	0,9	0,4	1	0,7
8	2	2,3	2,2	2,2	1,4	1,1	0,8	1,2	0,9	0,4	0,3	1	1,3	1,3	1,3
9	2,6	2,2	0,8	1,7	2	1,6	0,5	1,2	0,8	0,9	0,7	0,5	1,1	1,6	0,8
10	2	1,6	2,2	1,3	0,7	1,5	1,2	1	0,7	0,6	1	0,7	1	1,2	1,3
11	2,8	2,2	2,1	2,1	0,9	1,4	0,9	0,8	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	1,6	1,1
12	3,1	1,5	1,8	1,3	1,5	1,5	0,8	1	0,6	0,8	0,8	0,5	0,8	1,7	1
13	2	2	1,7	1	1,2	1,7	0,8	0,7	1	1,2	0,5	1,1	0,8	1,3	1,3
14	2,2	1,3	2	1	2	1,3	0,7	0,9	1,2	0,5	0,4	0,7	0,9	1,1	1,2
15	2,6	2,3	2	1,5	1,5	1,3	1,1	0,8	0,8	0,9	0,7	1	1,4	0,7	0,9
16	3,1	1,1	1,6	0,8	1,4	1,9	1,3	1	1,2	0,6	0,5	0,4	0,5	0,8	0,9
17	2		0,3	1,4	1	1,7	1	0,6	0,9	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,6
18	1,4		1,8	0,9	2	0,9	0,3	0,3		0,4	0,5	0,6	0,3		0,7
19	2,4		2,1		1,8	1,1				0,3	0,6	0,2			0,5
20	1				1,7	1									
	MEDIA	1,87		MEDIA	1,44		MEDIA	0,87		MEDIA	0,59		MEDIA	0,97	
	DESV. EST.	0,64		DESV. EST.	0,38		DESV. EST.	0,24		DESV. EST.	0,24		DESV. EST.	0,34	

Media	2,09	1,71	1,79	1,43	1,47	1,42	0,82	0,89	0,91	0,58	0,54	0,66	0,83	1,06	1,02
DP	0,72	0,55	0,59	0,40	0,42	0,34	0,29	0,22	0,22	0,23	0,22	0,27	0,33	0,36	0,32

NORM	p-value
si	0,006325

NORM	p-value
si	0,0001769

NORM	p-value
si	0,0001761

NORM	p-value
si	0,00018

Tabla 22. Crecimiento radicular por ensayo y muestra, dato global y p-value – Ensayo 5

germinacion

	1		2		3	
	20,0	100,0	20,0	100,0	20,0	100,0
control	20	100	16	80	19	95
Na ₂ SO ₄	18	90	20	100	20	100
15 mA R24	18	90	18	90	17	85
5 mA R34	20	100	19	95	19	95
2,5V R24	18	90	17	85	19	95

tratamiento	% germin.	DP
controle	92	10,4
Na ₂ SO ₄	97	5,8
15 mA R24	88	2,9
5 mA R34	97	2,9
2,5V R24	90	5,0

Tabla 23. Germinación por ensayo y muestra y germinación global por muestra (%) - Ensayo 5

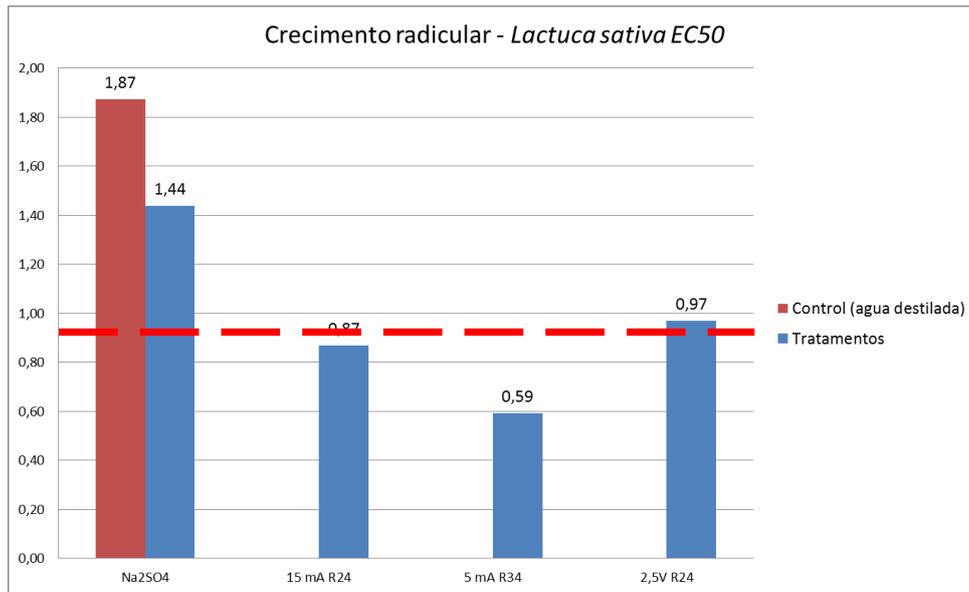


Figura 19. Crecimiento radicular medio y EC50 - Ensayo 5

Los datos obtenidos en las dos últimas mediciones (Tablas 21 y 23) se realizaron con la variedad de semilla de lechuga nueva y bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Bajo estas circunstancias y pese a la aparición de algún hongo de manera puntual, los valores del crecimiento de las radículas fueron superiores respecto a los valores obtenidos por los controles cuando se emplearon las anteriores semillas. Es por ello que se decidió trabajar con el porcentaje de inhibición en el crecimiento de la radícula respecto a su control. Es decir, el crecimiento de la radícula de cada muestra tratada se comparará con el crecimiento de la radícula del control del día en que fueron ensayadas. Además y de acuerdo a las Figuras 27 y 28, se puede apreciar claramente en estos casos que mediante el método del crecimiento de las radículas, sí obtenemos toxicidad en algunas de las muestras, concretamente su valor de EC50.

Al igual que ocurría con el caso del Microtox, no se han obtenido medidas de la toxicidad empleando el método de las semillas para todos los electrodos y condiciones de trabajo, por la limitación de horas de desarrollo del TFG. En concreto, ha sido la aparición de los hongos (los cuales en ocasiones han ocasionado la anulación de algunas de las medidas) las que han forzado a repetir algunos de los ensayos que previamente ya se habían realizado, con la consiguiente reducción en la cantidad de posibles muestras totales tratadas.

A continuación, se realizará una comparación de todos los resultados obtenidos, así como el análisis de los mismos.

6.3 - Comparación de los distintos métodos

Para un mejor procesado de los datos y la obtención de unas conclusiones más precisas y claras, y debido a la problemática previamente mencionada en cada uno de los métodos, el análisis comparativo se ha llevado a cabo en un primer lugar según el electrodo empleado durante el proceso de electro-oxidación. Además, los grupos de electrodos de trabajo se han separado en función de las condiciones de trabajo (a intensidad constante o a tensión constante) y de acuerdo a sus características (temperatura de sinterizado para los electrodos de tipo R).

Así pues y de acuerdo a lo mencionado en el apartado anterior, la obtención de todos los datos en ciertos electrodos no ha sido posible con ambos métodos. Pese a ello, a nivel global sí se han podido obtener conclusiones al margen de las particulares para cada método de trabajo.

Previo al análisis detallado de los datos en función del electrodo empleado en el proceso de oxidación avanzada y de las condiciones en que se empleó, definiremos las variables de trabajo en relación a los datos obtenidos y a los datos que el Departamento de Ing. Química y Nuclear proporcionó. En este caso fueron los valores de la concentración de contaminante (Norfloxacino) inicialmente y después del tratamiento de oxidación avanzada, los valores de DQO bajo las mismas condiciones (inicial y final) y los valores de COT (también inicial y final) únicamente para ciertos electrodos, pues el método de obtención de éste únicamente estuvo disponible a partir de cierto momento en el desarrollo del presente TFG.

Las variables de trabajo con las que se han llevado a cabo los análisis y así como la forma de calcular su valor (ecuación (5)) son:

- % de eliminación del contaminante
- % disminución DQO
- % disminución COT
- % germinación (ya calculado previamente)
- % inhibición crecimiento radícula
- p-value estadístico (obtenido del programa Past UIO)

$$\% \text{ Variación} = \frac{\text{Valor inicial} - \text{Valor final}}{\text{Valor inicial}} \quad (5)$$

La fórmula (5) es aplicable a cualquiera de las variables con las que se ha trabajado, siendo eliminación en el caso del contaminante, disminución en el caso de DQO y COT, o inhibición del crecimiento en el caso de la longitud de la radícula cuando se compara con la longitud media de la radícula del control correspondiente a su ensayo. Los datos de partida para su cálculo correspondientes al Norfloxacino se muestran en la Tabla 29:

	UT	DQO (ppm)	TOC (ppm)
100 ppm Norfloxacino	40	150	58,56

Tabla 24. Datos de partida de la muestra contaminada

Con estos datos, se procede al análisis individual de cada electrodo empleado.

6.3.1 - Trabajo a $I=cte.=15mA$. Variable Temperatura de sinterizado ($^{\circ}C$)

Electrodo	Método trabajo	Temperatura ($^{\circ}C$)	UT	% eliminación NoR	% disminución DQO	% germinación	% inhibición crecimiento radícula	p-value
R24	15 mA	1050	50	77,19%	10,67%	88%	53,48%	0,0001769
R27	15 mA	1150	5,55	75,19%	27,33%	-	-	
R20	15 mA	1200	4,45	72,61%	38,67%	93%	66,67%	0,0001762
R30	15 mA	1250	1,37	65,17%	73,33%	-	-	

Tabla 25. Datos obtenidos. Electrodo cerámicos. $I=cte$. T° variable

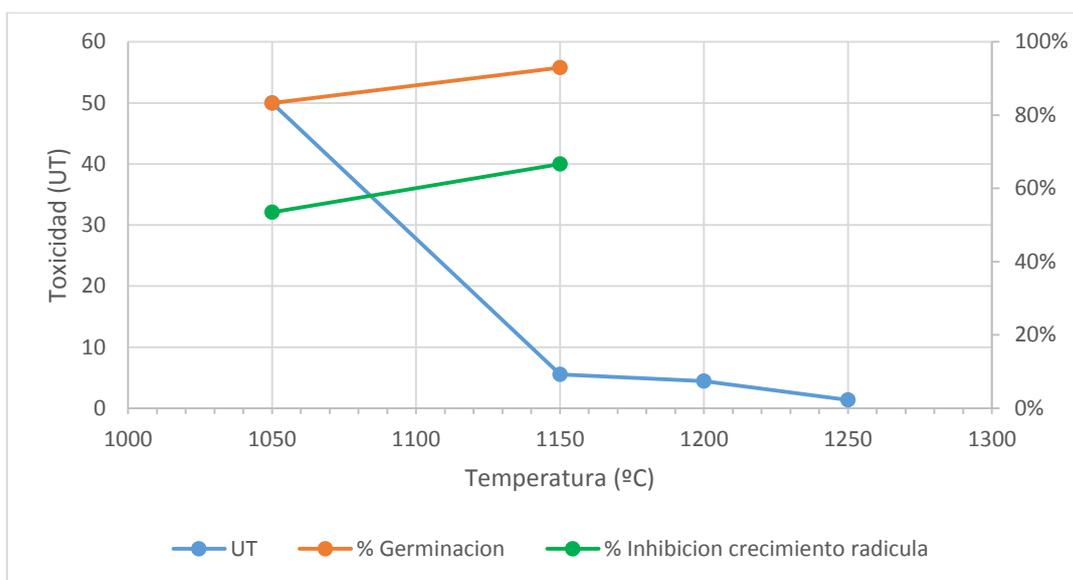


Figura 29. Comparativa UT y Germinación. Electrodo cerámicos. $I=cte$. T° variable

Analizando la Figura 29, se aprecia una clara tendencia del valor de UT a disminuir a medida que aumenta la Temperatura de sinterizado de los electrodo cerámicos. La germinación es alta en ambos casos, cercana o superior al 90%.

El ligero aumento en la inhibición del crecimiento de la radícula (Tabla 25) se puede explicar debido a que en el control de comparación del R20 ($1200^{\circ}C$) presentó algún hongo puntual con lo que el crecimiento medio fue menor, aunque el hecho más destacable es su alto valor en ambos casos, superando el umbral del EC50, por lo que *a priori* se consideraría tóxica la muestra.

En concordancia a este dato, el porcentaje de eliminación de la DQO sigue la misma tendencia (Figura 30), aumentando su eliminación a medida que aumenta la Temperatura de sinterizado. Pese a que la eliminación del contaminante en este caso no acompaña la tendencia creciente, se mantiene más o menos constante en un valor alto.

Además, de acuerdo con la Tabla 25, vemos que los p-value en ambos casos son menores de 0,05, lo cual indica toxicidad, acorde a lo visto de acuerdo con el EC50.

Haría falta otro ensayo mediante el método de las semillas para corroborar la tendencia, aunque se tienen datos más que suficientes gracias al resto de variables como para establecer una tendencia en este primer método de trabajo.

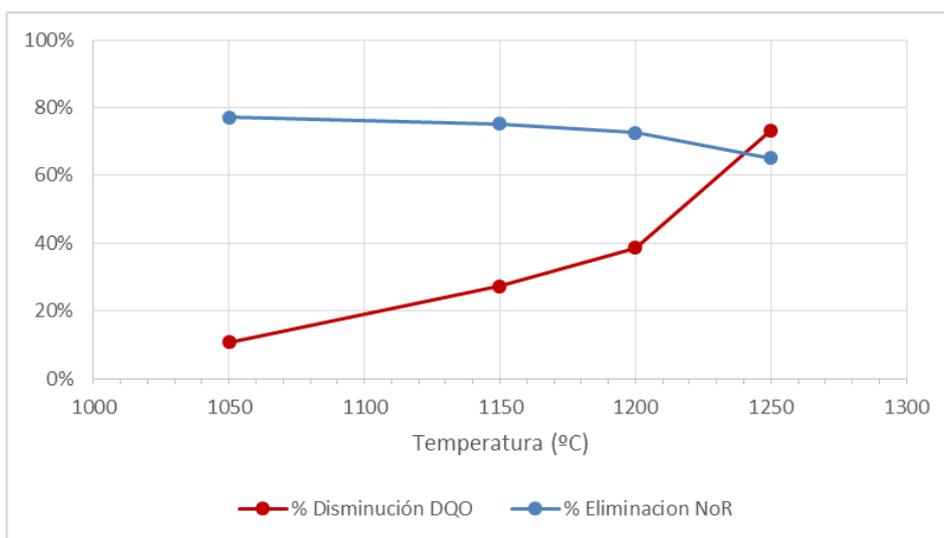


Figura 30. Variación en la concentración de DQO y NoR. Electrodo cerámico. $I=cte$. T^a variable

6.3.2 - Trabajo a $E=cte.=2,5V_{Ag/ClAg}$. Variable Temperatura de sinterizado (°C)

Electrodo	Método trabajo	Temperatura (°C)	UT	NoR (ppm)	% eliminación NoR	DQO (ppm)	% eliminación DQO	% germinación	% inhibición crecimiento radícula	p-value
R24	2,5V	1050	28,6	60	40,00%	115	23,33%	90,00%	48,13%	0,0001802
R30	2,5V	1250	7,7	37	63,00%	98	34,67%	78,00%	33,75%	0,066

Tabla 26. Datos obtenidos. Electrodo cerámico. $E=cte$. T^a variable

En este caso y de acuerdo a lo visto en el caso anterior, se aprecia también una predisposición del valor de UT a disminuir a medida que aumenta la Temperatura de sinterizado de los electrodos (Figura 31). La germinación es bastante alta en ambos casos, y aunque no superior al 90% en el caso de 1250°C, queda lejos de ser un valor estadísticamente relevante.

La inhibición del crecimiento de la radícula es bastante alta en ambos casos (Tabla 26), si bien no llega al 50%, valor que se considera como tóxico (EC50). El p-value en este caso (Tabla 26) es menor a 0,05 en el caso de R24 (menor T^a).

Por ello cabe señalar que aunque inicialmente a 1050°C la muestra era tóxica ($p\text{-value}<0,05$ y valor de $UT>25$), al aumentar la temperatura de sinterizado con el potencial constante, se consigue una muestra menos tóxica.

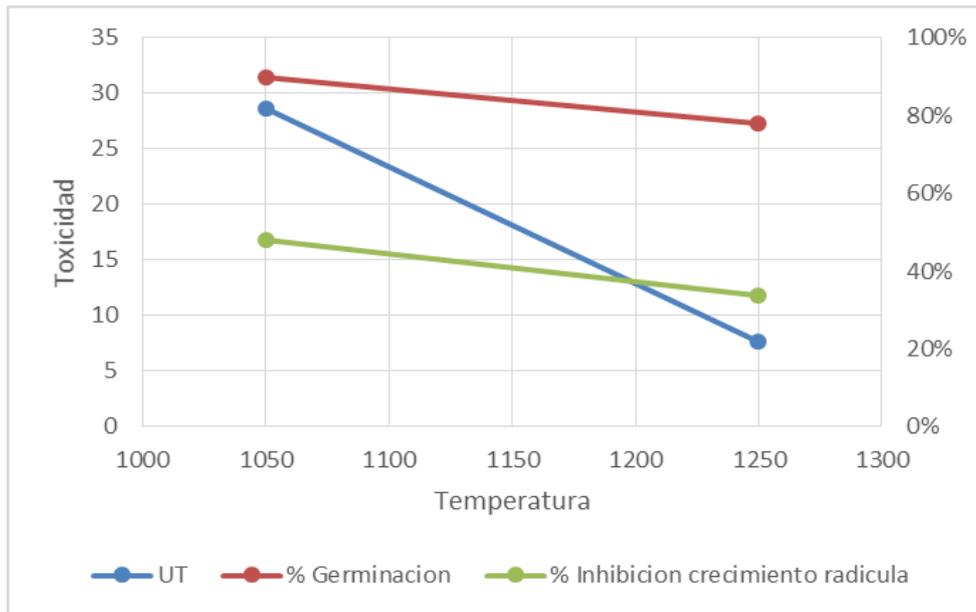


Figura 31. Comparativa UT y Germinación. Electrodo cerámico. E=cte. Tª variable

En la misma línea que el valor de UT, se aprecia una mayor eliminación del contaminante a mayor temperatura de sinterizado, acompañado de un aumento en la disminución del valor de su DQO (Figura 32).

Haría falta al menos un ensayo más a una temperatura bien inferior, intermedia o superior a las mostradas para poder corroborar la tendencia en todas las variables (UT, inhibición crecimiento, p-value, DQO, etc.).

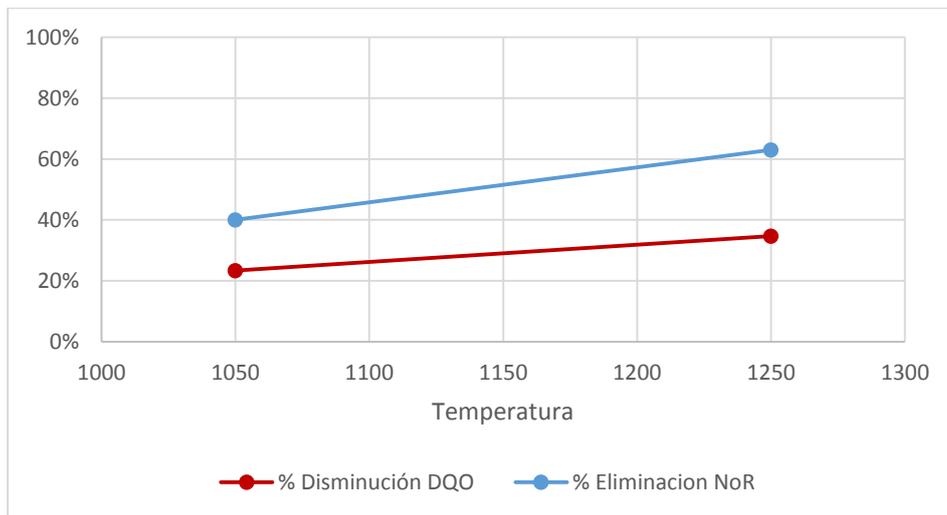


Figura 32. Variación en la concentración de DQO y NoR. Electrodo cerámico. E=cte. Tª variable

6.3.3 - Trabajo a $T^a=cte.=1200^{\circ}C$ (R20). Variable Intensidad (mA)

Electrodo	Método trabajo	NoR final (ppm)	% eliminación NoR	DQO final (ppm)	% eliminación DQO	% germinación	% inhibición crecimiento radícula	p-value
R20	5	50,00%	50,00%	36,67%	36,67%	90%	29,03%	0,01
R20	15	72,61%	72,61%	38,67%	38,67%	93%	66,67%	0,0001762

Tabla 27. Datos obtenidos. Electrodo cerámico R20. $T^a=cte.$ I variable

Como se aprecia en la Tabla 27 y en la Figura 33, la germinación es igual o superior al 90% en ambos casos, por lo que estadísticamente no son tóxicas ninguna de las muestras.

No obstante, la inhibición en el crecimiento de la radícula aumenta a más del doble de su valor inicial, superando el umbral de EC50. Si bien el valor de p-value en este punto es también estadísticamente tóxico, también lo era en el punto inicial, pese a que su inhibición no alcanzaba el EC50. Ya que frente a discrepancia es el p-value el que tiene predominancia, podemos decir que la muestra tratada es tóxica bajo ambas condiciones de trabajo del electrodo.

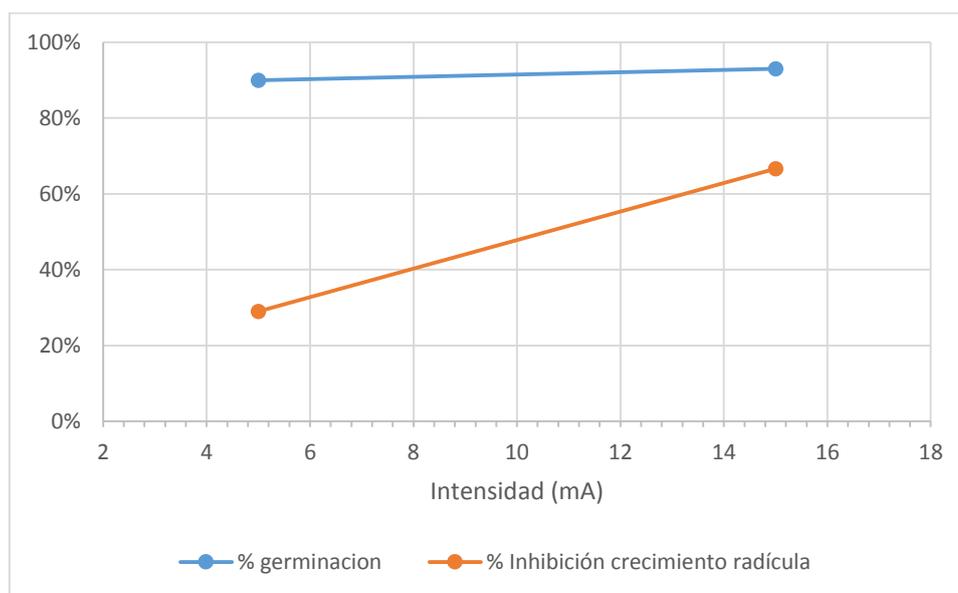


Figura 33. Comparativa en la Germinación. Electrodo cerámico. $E=cte.$ I variable

De la Figura 34 podemos ver que aunque el contenido en materia orgánica no varía a penas, sí se elimina más contaminante en el segundo caso. Se puede decir en este caso que pese al aumento en la eliminación de Norfloxacin, los productos intermedios de la oxidación formados son si cabe más tóxicos que en el punto inicial (mayor EC50).

Haría falta al menos un ensayo más a una temperatura bien inferior, intermedia o superior a las mostradas para poder corroborar la tendencia en todas las variables (UT, inhibición crecimiento, p-value, DQO, etc.).

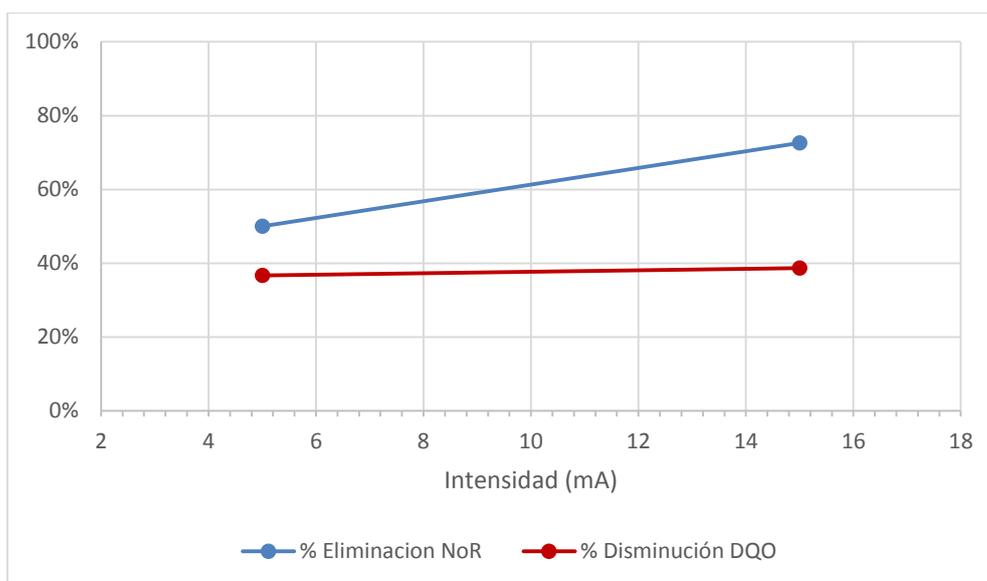


Figura 34. Variación en la concentración de DQO y NoR. Electrodo cerámico. $T^a=cte$. I variable

6.3.4 - Trabajo a $T^a=cte.=1250^{\circ}C$ (R30). Variable potencial de electrodo (E)

Electrodo	Potencial del electrodo	NoR (ppm)	% eliminación NoR	DQO (ppm)	% eliminación DQO	COT (ppm)	% eliminación COT	% germinación	% inhibición crecimiento radícula	p-value
R30	2,5	37	63,00%	98	34,67%	51,22	12,53%	78,00%	33,75%	0,066
R30	3	10,78	89,22%	55,77	62,82%	29,65	49,37%	92,00%	70,93%	0,0001761

Tabla 28. Datos obtenidos. Electrodo cerámico R30. $T^a=cte$. E variable

En la Figura 35 se puede apreciar que pese al ligero aumento en la germinación (no tóxico en ningún caso), la inhibición en el crecimiento de la radícula experimenta un crecimiento de un 70%. Esto, sumado al cambio en el p-value (Tabla 28), inicialmente no tóxico estadísticamente para pasar a serlo ($<0,05$) en el caso del potencial a $3V_{Ag/ClAg}$.

Comparando los resultados con la Figura 36, se puede ver que las tres variables siguen una clara tendencia a disminuir su valor (la disminución de sus valores aumenta).

Así pues, pese a que se ha eliminado gran parte del contaminante y la materia orgánica total se ha visto reducida, los productos intermedios de la oxidación que se obtienen en el caso de $3V_{Ag/ClAg}$ son mucho más tóxicos que la muestra originalmente tratada con la electro-oxidación, como ocurría con el electrodo cerámico R20 a intensidad variable. En este caso, la toxicidad aumenta al aumentar el potencial de trabajo del electrodo.

Haría falta al menos otro ensayo más así como conocer su valor de UT para cruzarlo con los resultados de p-value, inhibición, eliminación de contaminante, etc.

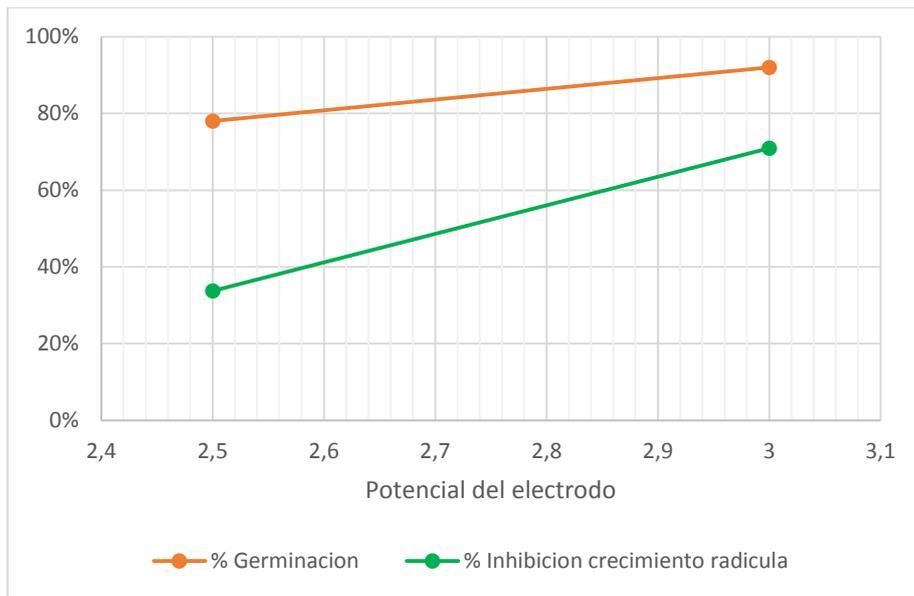


Figura 35. Comparativa en la Germinación. Electrodo cerámico. $T^a=cte$. E variable

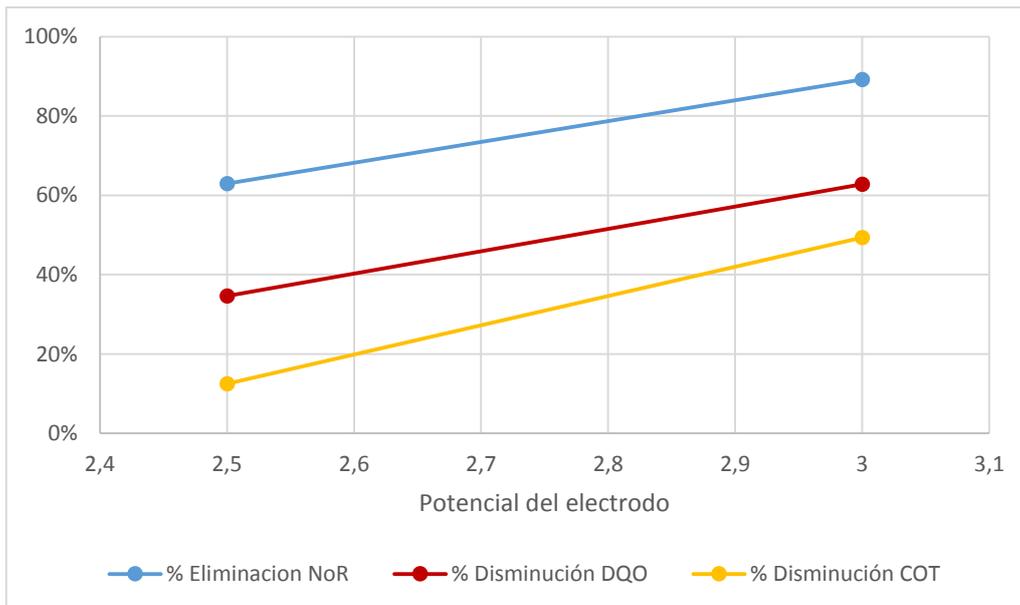


Figura 36. Variación en la concentración de DQO, COT y NoR. Electrodo cerámico. $T^a=cte$. E variable

6.3.5 - Electrodo BDD. Variable Potencial de electrodo (E)

Electrodo	Voltaje	UT	% eliminación NoR	% eliminación DQO	% eliminación COT	% germinación	% inhibición crecimiento radícula	p-value
BDD	2,5	3,8	78,00%	44,67%	39,58%	93,00%	16,46%	0,4811
BDD	3	11,11	88,40%	66,67%	51,37%	97,00%	42,50%	0,022

Tabla 29. Datos obtenidos. Electrodo BDD. E Variable

Como se puede ver en la Figura 37, en ambos casos se han obtenido porcentajes de germinación del 90%, lo que nos indica que tendremos que evaluar el resto de indicadores para saber si las muestras son tóxicas.

El valor de la toxicidad, pese a ser menor de 25 en ambos casos, experimenta un gran aumento entre el electrodo tratado a $2,5V_{Ag/ClAg}$ y el tratado a $3V_{Ag/ClAg}$. El p-value, acorde a ello, pasa de no ser estadísticamente notorio a ser menor a 0,05, lo cual nos indica que se trata de una muestra tóxica (Tabla 29).

De acuerdo a estos datos, y pese a no llegar al 50% establecido como umbral del EC50, la inhibición en el crecimiento de la radícula asciende a más del doble del valor inicial, acorde al cambio en el p-value también. Podemos afirmar en este caso que la toxicidad aumenta de acuerdo al aumento del potencial de electrodo.

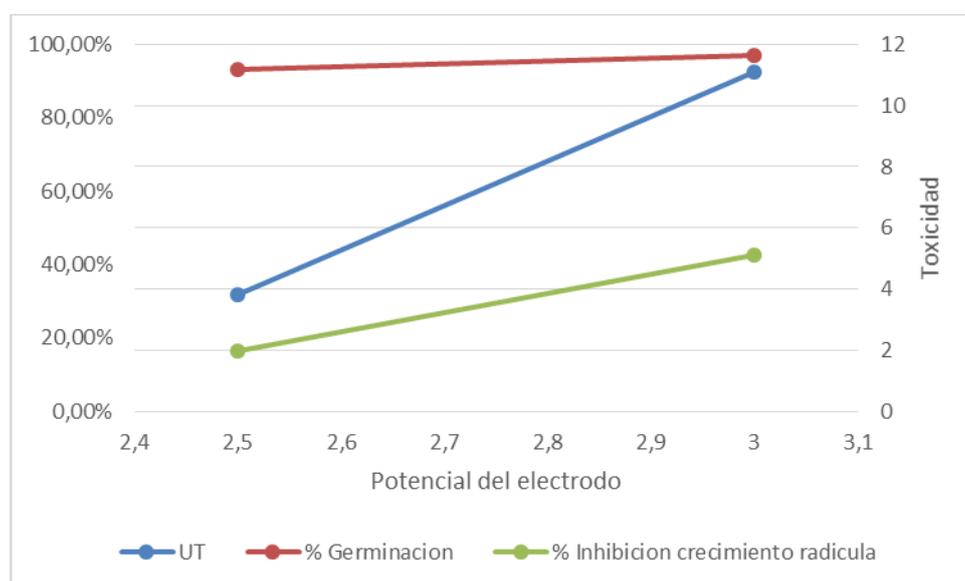


Figura 37. Comparativa UT y Germinación. Electrodo BDD. E variable

En ambos casos (Figura 38), el porcentaje de eliminación del medicamento es muy alto, así como la disminución del COT y la DQO. Todas ellas aumentan ligeramente su valor al aumentar E.

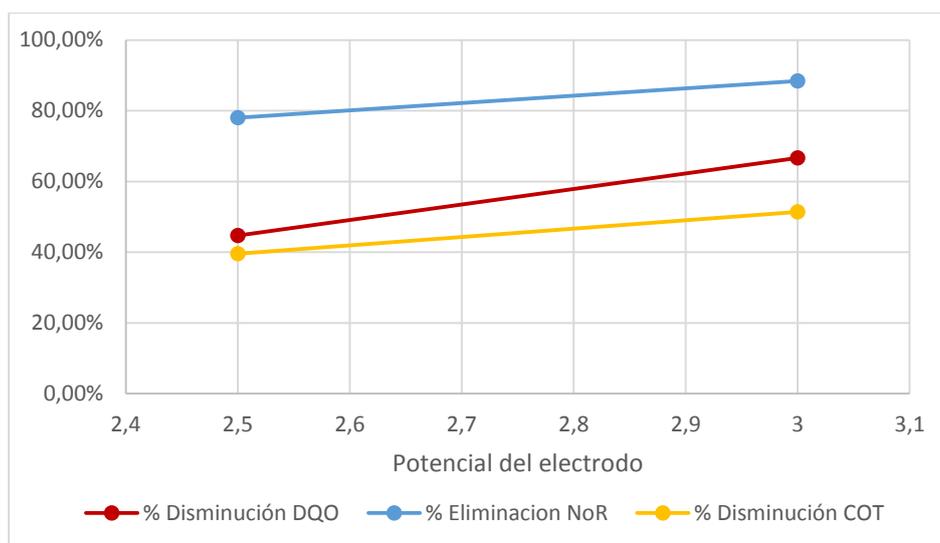


Figura 38. Variación en la concentración de DQO, COT y NoR. Electrodo BDD. E variable

De forma similar a lo que ocurría cuando se ha evaluado a temperatura constante el electrodo cerámico R30, obtenemos una muestra final tratada en el que los productos intermedios de la oxidación son más tóxicos que la muestra inicial, si bien para el caso de 2,5V_{Ag/ClAg} no llega a ser estadísticamente tóxico, sí cuando se aumenta el voltaje de trabajo hasta los 3V_{Ag/ClAg}.

Haría falta al menos otro ensayo más (tanto de semillas como mediante el Microtox) para cruzarlo con los resultados de p-value, inhibición, eliminación de contaminante, UT, etc. Y poder corroborar las conclusiones.

6.3.6 – Comparativa entre electrodo cerámico y electrodo BDD

Electrodo	Voltaje	% eliminación NoR	% eliminación DQO	% eliminación COT	% germinación	% inhibición crecimiento radícula	p-value
R30	2,5	63,00%	34,67%	12,53%	78,00%	33,75%	0,066
BDD	2,5	78,00%	44,67%	39,58%	93,00%	16,46%	0,4811
R30	3	89,22%	62,82%	49,37%	92,00%	70,93%	0,0001761
BDD	3	88,40%	66,67%	51,37%	97,00%	42,50%	0,022

Tabla 30. Datos obtenidos. Electrodo R30 y BDD. E Variable

Como se puede apreciar en la Tabla 30 así como en la Figura 39, el electrodo BDD obtiene una germinación mayor tanto a 2,5 como a 3V_{Ag/ClAg}. Además su inhibición del crecimiento es menor también cuando crece el potencial, al igual que su valor inicial.

Ambos p-value a 2,5V_{Ag/ClAg} (Tabla 30) son mayores a 0,05, por lo que inicialmente se podría considerar no tóxicas las muestras, aunque de acuerdo a los datos anteriores, el p-value del R30 está mucho más cerca de ser tóxico que el BDD.

Pese a ello, las muestras tratadas con ambos electrodos son tóxicas al potencial de $3V_{Ag/ClAg}$, si bien es cierto que el p-value de BDD está mucho más cerca de 0,05 que el valor del R30, así como el valor de la inhibición, que no llega a alcanzar el EC50.

Analizando la Figura 40, la tendencia con ambos electrodos es la misma, si bien el electrodo cerámico (R30) tiene una mayor pendiente (aumento en la eliminación de NoR, menor DQO y COT final), en el caso del BDD encontramos una muestra a $2,5V_{Ag/ClAg}$ con mejores rendimientos de eliminación del contaminante.

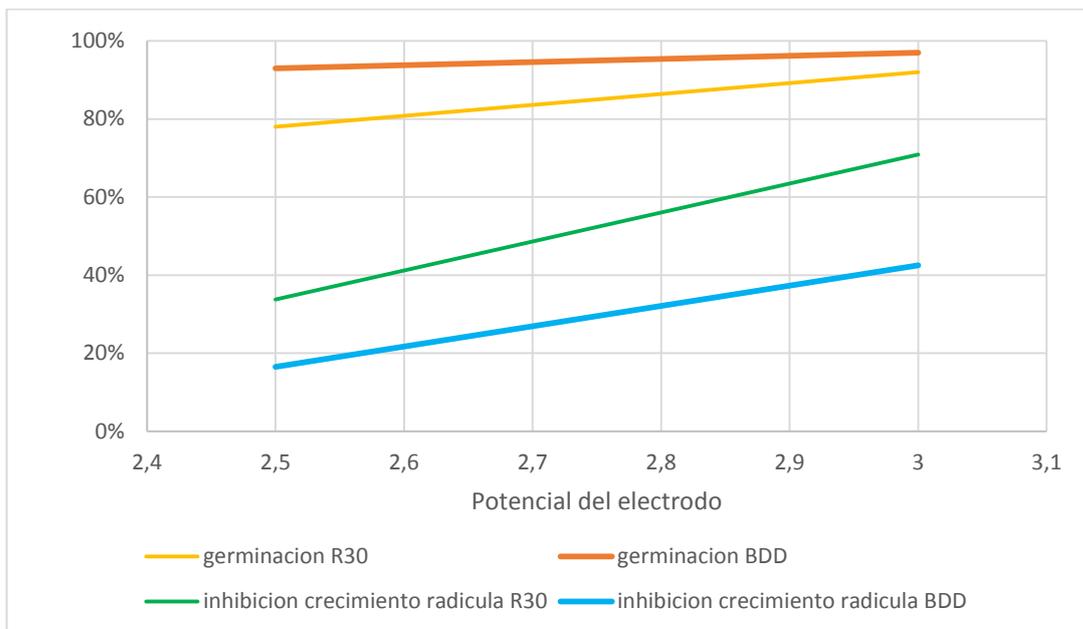


Figura 39. Comparativa UT y Germinación. Electrodo R30 y BDD. E variable

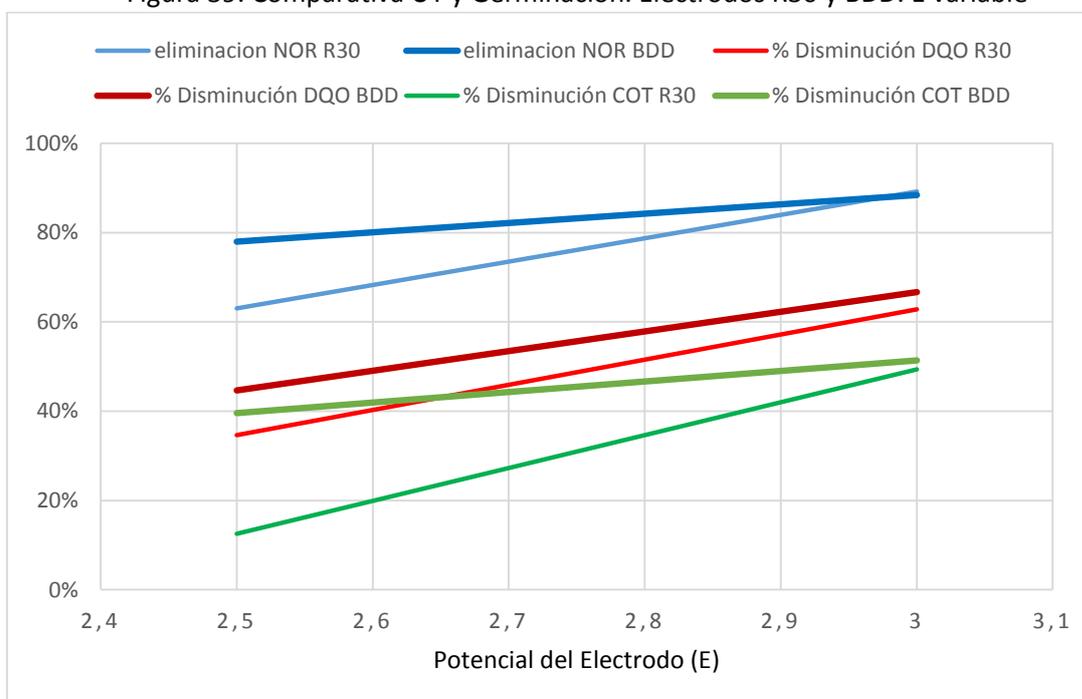


Figura 40. Comparativa en la variación en la concentración de DQO, NoR y COT. Electrodo R30 y BDD. E variable

Haría falta al menos otro ensayo con cada electrodo para poder corroborar las tendencias al alza en la disminución de los valores de NoR, COT y DQO, así como en el aumento de la toxicidad a partir de $3V_{Ag/ClAg}$.

No obstante, comparando ambos electrodos, trabajando a $2,5V_{Ag/ClAg}$ se obtiene una muestra menos tóxica en el caso del BDD, además a un potencial mayor ($3V_{Ag/ClAg}$), se aprecia una menor inhibición en el crecimiento de las radículas de las semillas. Aun así, en ambos casos los productos intermedios de la oxidación son más tóxicos que la muestra inicial, hecho que se pone de manifiesto cuando se trabaja a $3V_{Ag/ClAg}$.

7. CONCLUSIONES

En el presente TFG, tras varios ensayos de prueba y error, se ha logrado poner a punto una metodología para determinar la toxicidad de efluentes líquidos de una forma sencilla y económica utilizando semillas de lechuga.

Los resultados obtenidos se han contrastado con otro método de determinación de la toxicidad, el método Microtox, llegando a la conclusión que son fiables.

Por otro lado, se ha aplicado la metodología a la determinación de la toxicidad de muestras que contienen un contaminante emergente, en concreto, un antibiótico (Norfloxacino) que han sido tratadas mediante un proceso de oxidación avanzada.

De acuerdo con el análisis previo realizado para cada método de trabajo en el proceso de oxidación avanzada para cada uno de los electrodos empleados (BDD o cerámicos), se pueden establecer una serie de conclusiones a nivel global.

En el caso de los electrodos cerámicos con T variable:

- A mayor temperatura de sinterizado del electrodo, menor es la toxicidad de la muestra tratada, independientemente de si se ha efectuado el ensayo a potencial o intensidad constante. A medida que aumenta la T (°C) de sinterizado, disminuye en contenido en materia orgánica de la muestra y, la eliminación del contaminante, aunque prácticamente es constante para todas las temperaturas de sinterizado, es alta. Por ello, su toxicidad sí disminuye.
- No obstante, a temperaturas de sinterizado mayor, aunque con un valor inferior, seguimos hablando de muestras (tras el tratamiento de oxidación avanzada) estadísticamente tóxicas.
- Únicamente en el caso de trabajo a potencial constante y a la mayor temperatura de sinterizado de las trabajadas se puede apreciar la obtención de una muestra estadísticamente no tóxica.

En el caso de los electrodos cerámicos con T^a de sinterizado constante:

- Cuando la variable de trabajo es el potencial, a medida que éste aumenta, también lo hace la toxicidad de la muestra.
- Para el caso en que la variable de trabajo es la intensidad, de igual forma se aprecia que a mayor intensidad de trabajo, más tóxico es el resultado final.

- Para ambos casos, no obstante, aumenta la eliminación del contaminante a mayor potencial (o intensidad), así como la cantidad de materia orgánica de la muestra, por lo que los productos intermedios de la oxidación formados en el proceso son más tóxicos que el NoR de la muestra inicial.

Para el caso del electrodo BDD, trabajando con variación del potencial:

- De igual forma a lo que ocurría en el caso del electrodo cerámico a T (°C) de sinterizado constante y potencial variable, aunque se elimina más contaminante y materia orgánica a mayor potencial, la solución obtenida es más tóxica.
- Comparando ambos métodos, en el caso del BDD se obtienen valores de toxicidad menores que en el caso del electrodo cerámico.

Por todo lo anterior, se pueden establecer unas conclusiones generales en relación a los valores obtenidos con ambos tipos de electrodos así como una valoración entre ambos de modo que se pueda establecer con cuál se ha conseguido una muestra final menos tóxica, objetivo secundario a establecer del presente TFG:

- Se recomienda trabajar con el electrodo BDD a potenciales bajos ($2,5V_{Ag/ClAg}$), pues la muestra final obtenida después del proceso de oxidación avanzada muestra una gran eliminación del contaminante además de no ser una solución tóxica.
- En el caso de que no se pudiese disponer de las condiciones de trabajo anteriores (BDD a $2,5V_{Ag/ClAg}$), sería recomendable el trabajar con el electrodo cerámico con la mayor temperatura de sinterización de las mostradas ($1250^{\circ}C$) también a este mismo potencial ($2,5V_{Ag/ClAg}$), pues de todas las muestras tratadas mediante la electro-oxidación con un electrodo cerámico, ha sido ésta la única que ha presentado una gran eliminación del NoR y una muestra final no tóxica.
- En el caso de no poder ajustar el potencial a $2,5V_{Ag/ClAg}$ de acuerdo a lo indicado en los puntos anteriores, si se tuviese que trabajar con electrodos cerámicos, sería recomendable hacerlo con la mayor temperatura de sinterización del electrodo posible, al menor potencial posible o a la menor intensidad posible, pues ha quedado demostrado que a intensidades o potenciales mayores, pese a que se consigue el objetivo de eliminar el contaminante de las muestras, los productos intermedios de la oxidación obtenidos presentan valores de toxicidad superiores a los iniciales.

8. SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS

8.1 - Medición y ajuste del pH

Para conseguir un ajuste del pH más rápido, menos contaminante y más preciso, se recomienda el empleo de ácidos o bases con concentración reducida, pues con el NaOH y el H₂SO₄ a 1M, dado que el espectro de pH buscado se encuentra cerca de la zona de sensibilidad, incluso con la adición de una única gota de solución, las variaciones obtenidas, tanto en aumento como en disminución del valor del pH, situaban a éste en un rango de valores no admisible pero en el lado opuesta de la escala de medida, pasando de ácido a básico con un leve ajuste.

Además, es importante no intentar ajustar la muestra en numerosas ocasiones, especialmente si se dispone de poca cantidad de muestra, pues cada vez es más complicado y ésta se puede ver contaminada por la cantidad de ácido y de base que se le introduce en su seno, además de modificar sustancialmente su volumen, con lo que se alteran las concentraciones.

No obstante y por ese casi constante que se ha tenido que realizar, no se recomienda otro medidor de pH que no sea el electrónico.

8.2 – Microtox

Como consejo o sugerencia para un mejor desempeño en la realización del método del Microtox, se recomienda diluir de inicio las muestras si se es conocedor de que la muestra previa al tratamiento que se quiere evaluar (en este caso, si el proceso de oxidación avanzada conseguía que la muestra disminuyese o no su valor de toxicidad en caso de mantenerse positivo en función del electrodo empleado en el proceso) tiene una alta concentración de algún contaminante figurablemente tóxico *a posteriori*, al menos con factor de dilución 1:2.

Esto es debido a que una vez abierto un vial, se dispone de cierta cantidad únicamente, concretamente para alrededor de unas 15 muestras diferentes. Tener que diluir constantemente las muestras supone una gran pérdida de tiempo, cosa que afecta negativamente a las bacterias porque como se ha comentado anteriormente sus características bioluminiscentes se ven afectadas, cosa que podría alterar los resultados. Además de limitar la cantidad de muestras tratables dentro de la carga de trabajo que supone el desarrollo de un TFG.

Además se recomienda la revisión del buen funcionamiento del Microtox en cuestión, pues aunque se obtuvieron resultados correctos en un primer momento, más tarde en otro intento de realizar el ensayo, el aparato dio problemas, con la consiguiente nulidad de los resultados como se ha comentado.

8.3 - Método de las semillas

En el caso del análisis de la toxicidad empleando el ensayo con las semillas de *Lactuca sativa*, hay varias recomendaciones que se pueden realizar:

En primer lugar, se debería trabajar en la totalidad del desarrollo del método en un espacio o laboratorio con temperatura controlada o regulable, de modo que se evite el efecto de la termodormancia.

Además, para evitar una posible contaminación cruzada, se debería optar por esterilizar todos los materiales con los que se trabaje, en especial las pipetas, vasos de precipitados y sobre todo, las pinzas.

En el caso de optar por una esterilización también de las semillas, se debería valorar el empleo de una solución menos agresiva o la disminución de su tiempo de contacto, pues no tenemos forma de saber si los peores resultados se obtuvieron después del proceso de esterilizado debido a la agresividad del método (probado y comprobado en otras ocasiones) o debido a la alta temperatura a la que se veían sometidas las placas de Petri en el traslado desde el Instituto hasta el frigorífico donde se almacenaban durante las 120h.

11. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. J. Zhang, D.L. Mauzerall, T. Zhu, S. Liang, M. Ezzati, J. V. Remais, Environmental health in China: progress towards clean air and safe water, *Lancet*. 375 (2010) 1110–1119. doi:10.1016/S0140-6736(10)60062-1.
- [2]. N. Bolong, A.F. Ismail, M.R. Salim, T. Matsuura, A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal, *Desalination*. 238 (2009) 229–246. doi:10.1016/j.desal.2008.03.020.
- [3]. International team consulting. El crecimiento del sector farmacéutico. 30/11/2015 <http://www.int-team.com/el-sector-farmacaceutico-en-el-mundo/5>.
- [4]. K.Chen, J.L.Zhou, Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. Volume 95, January 2014, Pages 604-612
- [5]. Carrera-Lasfuentes, P., Aguilar-Palacio, I., Medicine consumption in the adult population: Influence of self-medication. *Atención Primaria*. Volume 45, Issue 10, December 2013, Pages 528-535
- [6]. Guillem Sáiz, Patricia, Francès Bozal, Francesc, Gimenez Fernández, Francisco, & Sáiz Sánchez, Carmen. (2010). Study on self-medication in the Spanish university population. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(2), 99-103. Recuperado en 02 de septiembre de 2017. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2010000200008&lng=es&tlng=en.
- [7]. Moya Rodríguez, S. (2012). Estudio-prevalencia de automedicación en consultantes a un centro de atención ambulatorio adosado a un hospital de una comuna de Santiago. Disponible en <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/111220>
- [8]. Castruonovo, Cintia, Chiclana, Francisco, Giosso, Laura. Automedicación en Estudiantes de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina). *Latin American Journal of Pharmacy*. Vol. 26, no. 6. p. 937-944. 2017
- [9]. Niclós G, Rodilla V, Olivar T. Prescripción o automedicación: estudio del consumo de medicamentos y factores asociados a la automedicación a partir de la Encuesta Europea de Salud 2009 y 2014. *Farmacéuticos Comunitarios*. 2016 May 26; 8(Suplemento 1)

- [10]. Blenkinsopp, A., & Bradley, C. (1996). Patients, society, and the increase in self-medication. *BMJ : British Medical Journal*, 312(7031), 629–632.
- [11]. De OLIVEIRA, A. V. C., ROCHA, F. T. R., & ABREU, S. R. de O. (2014). Acute liver failure and self-medication. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva : ABCD = Brazilian Archives of Digestive Surgery*, 27(4), 294–297. <http://doi.org/10.1590/S0102-67202014000400016>
- [12]. Instituto de Estudios sobre Políticas de Salud. Revista 05/2015. Disponible en: http://www.ieps.com.ar/es/informes/Revista-IEPS_2015-05.pdf
- [13]. Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 25–64. <http://doi.org/10.4137/PMC.S14459>
- [14]. WHO/HSE/WSH/11.05. Pharmaceuticals in Drinking-water. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals_20110601.pdf
- [15]. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Toxicity What Standards and Regulations Exist for PCB Exposure. Course: WB 2460. CE Renewal Date: May 14, 2016. Available at: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=30&po=8>
- [16]. Israel, Brett. Pharmaceutical Waste Seeping into Environment. *Live Science.com*, Planet Earth. June 4, 2010. Disponible en: <https://www.livescience.com/10682-pharmaceutical-waste-seeping-environment.html>
- [17] Unión Europea. DOUE-L-2013-81677. DIRECTIVA 2013/39/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO. «DOUE» núm. 226, de 24 de agosto de 2013, páginas 1 a 17 (17 págs.) https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=DOUE-L-2013-81677
- [18] European Commission. Environmental Quality Standards Directive - Watch list. Directive 2008/105/EC. 2015/495 of 20 March 2015. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32008L0105>
- [19]. Katzung et al., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 11th ed by Brunton et al, and *Basic & Clinical Pharmacology* 11th ed.
- [20]. Comunidades Europeas. Directiva 2001/59/CE de la Comisión de 7 de agosto de 2001. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2001-82016>
- [21]. EPA. United States Environmental Protection Agency. Disponible en: <https://www.epa.gov/hw/learn-basics-hazardous-waste>
- [22]. Unión Europea. DOUE-L-2014-83741. Reglamento UE nº1357/2014 de la Comisión. «DOUE» núm. 365, de 19 de diciembre de 2014, páginas 89 a 96 (8 págs.). https://boe.es/diario_boe/txt.php?id=DOUE-L-2014-83741
- [23]. Unión Europea. DOUE-L-2008-82319. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. «DOUE» núm. 312, de 22 de noviembre de 2008, páginas 3 a 30 (28 págs.). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-82319>
- [24]. Reglamento (UE) 2016/1179 de la Comisión. C/2016/4484. Commission Regulation (EU) 2016/1179 of 19 July 2016.

- [25]. Yang Deng, Renzun, Zhao. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Water Pollution* (S Sengupta, Section Editor). 09/2015. Volume 1, Issue 3, pp 167–176
- [26]. Ficha técnica. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad de España. Disponible en: <http://e-lactancia.org/media/papers/Norfloxacin-FT2011.pdf>
- [27]. U.S National Library of Medicine. Norfloxacin. MeSH Descriptor Data 2017. Disponible en: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Norfloxacin>
- [28]. Plump, Wendy. Study shows significant increase in antibiotic use across the world. Princeton Environmental Institute. July 10, 2014. Available at: <https://www.princeton.edu/news/2014/07/10/study-shows-significant-increase-antibiotic-use-across-world>
- [29]. Herman Goossens, Matus Ferech, Robert Vander Stichele, Monique Elseviers. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365: 579–87.
- [30]. S. Vasudevan, M.A. Oturan, Electrochemistry: As cause and cure in water pollution-an overview, *Environ. Chem. Lett.* 12 (2014) 97–108. doi:10.1007/s10311-013-0434-2.
- [31]. Celiz, MD, Tso, J, Aga, DS. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. 2009 Dec; 28(12):2473-84. doi: 10.1897/09-173.1.
- [32]. Persoone, Guido, Janssen, Colin. *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. University of Ghent. 31 may. 2000 - 550 páginas.
- [33]. Unión Europea. Reglamento (CE) nº 440/2008 de la Comisión. «DOUE» núm. 142, de 31 de mayo de 2008, páginas 1 a 739 (739 págs.). <https://www.boe.es/doue/2008/142/L00001-00739.pdf>
- [34]. Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo. Orden de 13 de octubre de 1989. BOE-A-1989-26488. «BOE» núm. 270, de 10 de noviembre de 1989, páginas 35216 a 35222 (7 págs.). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1989-26488>
- [35]. Cristiano V.M. Araújo, Renato B. Nascimento, Carla A. Oliveira, Uwe J. Strotmann, Eduardo M. da Silva, The use of Microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil), *Chemosphere*, Volume 58, Issue 9, 2005, Pages 1277-1281, ISSN 0045-6535, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.036>.
- [36]. Matias, WG, Flohr, L. (2015). Toxicological risk assessment of complex mixtures through the WTox model. *Modelling in Science Education and Learning*. 8(1):45-69. <http://hdl.handle.net/10251/70004>.
- [37]. RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research*, v. 45, n. 15, p. 4311–4340, 2011.
- [38]. Pastor Torín, José. ESCALA DE pH. Blog Químicatorin. 01/2012. Disponible en: <http://quimicatorin.blogspot.com.es/2012/01/escala-de-ph.html>
- [39]. Helen Kollias. How do pH strips work? Precision nutrition's web: <http://www.precisionnutrition.com/ie-how-ph-strips-work>

- [40]. Sciencing Team. How to adjust pH Levels. Sciencing.com web. 04/2017. Available at: <http://sciencing.com/adjust-ph-levels-5144744.html>
- [41]. Ferrer-Polonio, E.; Mendoza Roca, JA.; Alonso Molina, JL.; Pastor Alcañiz, L.; Iborra Clar, A. (2015). Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry. *Chemical Engineering Journal*. <http://hdl.handle.net/10251/77229>
- [42]. Arqués Sanz, A.; Avetta, P.; Bella, F.; Prevot, AB.; Laurenti, E.; Montoneri, E.; Carlos, L. (2013). Waste cleaning waste: Photodegradation of monochlorophenols in the presence of waste-derived photosensitizer. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 1:1545-1550. <http://hdl.handle.net/10251/37244>
- [43]. Montañés Sanjuan, MT.; Sánchez Tovar, R.; Roux, MSB. (2014). The effectiveness of the stabilization/solidification process on the leachability and toxicity of the tannery sludge chromium. *Journal of Environmental Management*. 143:71-79. <http://hdl.handle.net/10251/49869>
- [44]. Blaise, Christian & Féraud, J.-F. (2005). Small-scale freshwater toxicity investigations volume 1 - Toxicity test methods. 10.1007/1-4020-3120-3.
- [45]. Navarro, Enrique. La Hormesis. Web [enriquenavarro.com](http://www.enriquenavarro.com). Disponible en: <http://www.enriquenavarro.com/downloads/La%20hormesis.pdf>
- [46]. P. Bohórquez-Echeverry, C. Campos-Pinilla. Evaluación de *Lactuca Sativa* y *Selenastrum Capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM. Revista de la Facultad de Ciencias*. Vol. 12 N° 2, 83-98.
- [47]. Castillo, Gabriela. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad en aguas. México, IMTA, 2004. ISBN 968-5536-33-3. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- [48]. Greene, J., C. Bartels, W. Warren-Hicks, B. Parkhurst, AND G. Linder. PROTOCOLS FOR SHORT TERM TOXICITY SCREENING OF HAZARDOUS WASTE SITES. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/3-88/029 (NTIS PB88235510), 1988.
- [49]. D.G. Joakim Larsson. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 148 (2007) 751–755.
- [50]. W. Fountain, David, Derek Bewley, J. *Plant Physiol*. Lettuce Seed Germination: Modulation of Pregermination protein synthesis by gibberellic acid, abscisic acid, and cytokinin' (1976) 58, 530-536.
- [51]. L. WHITE, H. (2008). The sterilization of lettuce seed. *Annals of Applied Biology*. 25. 767 - 780. 10.1111/j.1744-7348.1938.tb02352.x.
- [52] S, Baker, Samuel, Warren-Hicks, William. Ecological assessment of hazardous waste sites. EPA/600/3-89/013. University of Minnesota. March 1989.
- [53]. Sandeep, Dhiman. Isopropyl alcohol as disinfectant. *Microbiology solutions blog*. 02/2015.
- [54]. University of Hohenheim. https://pflanzenphysiologie.uni-hohenheim.de/fileadmin/_migrated/content_uploads/oberflaechensterilisation_von_arabidopsis_samen_en_01.pdf
- [55]. Choudary, Ankur. Isopropyl alcohol used as a disinfectant in Pharmaceuticals. *Pharmaguideline.com blog*. 2013.

[56]. [57] Cecilio, Maria, Ronco, Alicia. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap4.pdf>

[57] Øyvind Hammer, David A.T. Harper, and Paul D. Ryan. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica. Palaeontological Association, 22 June 2001. National University of Ireland.

[58] Hammer, Øyvind. Reference manual. Natural History Museum, University of Oslo. 1999-2017. Available at: <https://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>

DOCUMENTO II

PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN

En los siguientes apartados se realizará un desglose del coste total de la realización del trabajo anteriormente descrito, dividiendo por un lado el coste de los equipos y materiales y por otro lado el coste de la mano de obra que lo lleve a cabo. Éstos presupuestos parciales se calcularán entendiendo el propio trabajo como si de un encargo a una consultora se tratase, por lo que se han incluido todos los equipos o materiales para el desarrollo del mismo, aunque la Universidad Politécnica de Valencia ya dispusiese de estos equipos en el proceso de redacción de este trabajo.

2. PRESUPUESTOS PARCIALES

2.1 – Equipos y material

En este primer apartado se expondrá, para cada uno de los procesos anteriormente descritos, el coste del material empleado. Previamente se ilustrará el coste de aquellos materiales comunes a todo el desarrollo del proyecto y por ende, reutilizados en cada uno de los métodos de trabajo descritos. Las muestras de agua residual contaminada con Norfloxacino y tratadas con electro-oxidación se presuponen entregadas por el Departamento de Ing. Química, por lo que no se incluyen en el presupuesto.

<i>Material común</i>	<i>Total (Uds.)</i>	<i>Coste (€/unidad)</i>	<i>Coste total (€)</i>
Ordenador portátil Asus	1	520	520
Vasos de precipitados	10	9	90
Cuentagotas	2	2	4
Material de oficina	-	-	30
Pipetas micrométricas	2	50	100
<i>Subtotal (€)</i>			744

Tabla 31. Presupuesto parcial del material común

<i>Medición y ajuste de pH</i>	<i>Total (Uds.)</i>	<i>Coste (€/unidad)</i>	<i>Coste total (€)</i>
Medidor electrónico de pH	1	235	235
Agitador magnético	1	65	65
Imán de mezcla	1	4	4
NaOH (Botella 1L)	1	24	24
H2SO4 (Botella 1L)	1	8	8
<i>Subtotal (€)</i>			336

Tabla 32. Presupuesto parcial del material para la medición y ajuste del pH

<i>Método de las semillas</i>	<i>Total (Uds.)</i>	<i>Coste (€/unidad)</i>	<i>Coste total (€)</i>
Pinzas	1	3	3
Film transparente (Rollo)	1	1,50	1,50
Cajas de placas PETRI	20	2,5	50
Papel de filtro (Caja 50 Uds.)	2	5	10
Alcohol del 70% y 96% (Botella 1)	4	1,25	5
Pipetas de laboratorio	2	15	30
Agua destilada (garrafa 10L)	1	4	4
Semillas (Bolsa 10.000 Uds.)	1	1	1
<i>Subtotal (€)</i>			104,50

Tabla 3320. Presupuesto parcial del material para el método de las semillas

<i>Método del Microtox</i>	<i>Total (Uds.)</i>	<i>Coste (€/unidad)</i>	<i>Coste total (€)</i>
Microtox 500	1	20.475	20.475
Solución reconstitución (botella 50mL)	1	26	26
Solución ajuste osmótico (botella 50mL)	1	64	64
Solución acuosa diluyente (botella 1L)	1	132	132
Estante para puntas eppendorf	1	9	9
Cubetas (caja 50 Uds.)	2	200	400
Puntas de pipeteado (caja 100 Uds.)	1	33	33
Bacterias (vial)	1	650	650
<i>Subtotal (€)</i>			21.789 €

Tabla 34. Presupuesto parcial para el método del Microtox

2.2 - Mano de obra

La elaboración del presupuesto para la mano de obra se ha realizado entendiendo la realización de este Trabajo de Final de Grado como si de una propuesta profesional se tratara.

De este modo, el técnico encargado de la realización del proyecto contará con la ayuda de un auxiliar de laboratorio que le brindará soporte en las tareas de mantenimiento y preparación de los equipos y materiales, así como de un auxiliar administrativo encargado del apoyo en la realización de las instrucciones y redacción del propio trabajo.

<i>Mano de obra</i>	<i>Total horas (h)</i>	<i>Coste (€/h)</i>	<i>Coste total (€)</i>
Técnico	300	35,00	10.500,00
Auxiliar de laboratorio	40	20,00	800,00
Auxiliar administrativo	10	15,00	150,00
<i>Subtotal (€)</i>			11.450,00 €

Tabla 35. Presupuesto parcial de la mano de obra

3. PRESUPUESTO TOTAL

De acuerdo al desglose anterior de los presupuestos parcial y sumando cada parte, se obtiene el coste total para la realización de nuestro proyecto. Al valor obtenido, habrá que sumar un valor añadido del 13% correspondiente a gastos generales (mantenimiento del laboratorio, luz, etc.) así como el 21% de IVA.

<i>Desglose</i>	<i>Coste total (€)</i>
Material común	744
Método de las semillas	104,50
Medición y ajuste de pH	336
Método del Microtox	21.789
Mano de obra	11.450
<i>Presupuesto acumulado (€)</i>	34.423,5 €
<i>+Gastos Generales (13%) (€)</i>	4.475,05
<i>Presupuesto total sin impuestos (€)</i>	38.898,55 €
<i>+ IVA (21%) (€)</i>	8168,69
Presupuesto Total	47.067,25 €

Tabla 36. Presupuesto total

El presupuesto total asciende a **CUARENTA Y SIETE MIL SESENTA Y SIETE EUROS CON VEINTICINCO CÉNTIMOS.**