



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Estudios ecotoxicológicos para la gestión sustentable
de efluentes líquidos urbanos y pecuarios***

Tesista: Ing. Ingrid Violeta Poggio Herrero

Director: Dr. Guido Mastrantonio

Codirector: Dr. Andrés Porta

Año: 2020

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Guido Mastrantonio y codirección del Dr. Andrés Porta. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor en el Área Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas.

RESUMEN:

Los efluentes líquidos están compuestos por aguas de descarte y, como consecuencia de la naturaleza y variedad de sus fuentes, constituyen una compleja combinación de sustancias químicas que interactúan entre sí. En particular, en la composición de aquellos de origen urbanos se detectan detergentes, fármacos, metales, COPs, productos del cuidado personal, entre otros. Los antecedentes bibliográficos indican que, entre los fármacos, ibuprofeno y acetaminofeno son detectados en altas concentraciones en efluentes, sin embargo, la información toxicológica de éstos no está completa. Por otro lado, por las particularidades de los efluentes líquidos es necesario no solo conocer sus características fisicoquímicas, sino también los efectos tóxicos que pueden generar en la biota. Su toxicidad se puede determinar mediante bioensayos Y, aplicando un fraccionamiento controlado de las muestras y bioensayos sucesivos, es posible identificar que fracciones del efluente aportan a la toxicidad global. Así, los objetivos generales de esta tesis fueron estudiar la toxicidad de los enantiómeros de ibuprofeno y sus combinaciones con acetaminofeno y caracterizar toxicológicamente dos modelos de efluentes líquidos de diferentes orígenes, los urbanos y, un tipo particular de efluente pecuario, los efluentes de tambo. Para los estudios sobre fármacos se emplearon bioensayos con *D. magna* y para los efluentes líquidos se aplicó una batería de bioensayos integrada por *D. magna*, *H. plagiodesmica* y semillas de *T. aestivum*, junto con un protocolo de fraccionamiento para identificación de las fracciones tóxicas, como herramienta de evaluación para el manejo sustentable y protección de los ecosistemas acuáticos.

AGRADECIMIENTOS:

A mi director y codirector de tesis, Dr Guido Mastrantonio y Dr Andrés Porta. por haber aceptado ser parte de este proyecto, por su dedicación y guía.

Al equipo de toxicología de la FCEyN-UNLPam: Dra Silvia Fanelli, Dra Laura Bartel por todo el asesoramiento brindado y la Lic. Camila Rodríguez por su colaboración en las tareas de laboratorio. A las Lic. Mariela Mariamé y Daniela Ortiz por su ayuda durante el tiempo que integraron el equipo de trabajo.

A la EEA INTA- Anguil. "Ing. Agr. Guillermo Covas", por el espacio que se nos brindó al equipo y al personal, con quienes compartimos muchas jornadas de trabajo.

A Gustavo Bulus por su predisposición y colaboración para la implementación de los bioensayos.

A mis actuales compañeros de oficina de la FCEyN-UNLPam, quienes siempre estuvieron para dar una mano en etapa de redacción Laura y Alberto.

A mi familia por su apoyo durante el tiempo que me llevó cumplir éste objetivo, en especial: Agus, Román y Mauro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo 1-	6
Introducción.....	6
1.1- Efluentes líquidos.....	6
1.1.1 Caracterización de los efluentes líquidos urbanos (ELUs).....	7
1.1.2 Efluentes agropecuarios.....	14
1.1.2.1 Efluentes líquidos de tambo (ELTs).....	15
1.2- Bioensayos como herramienta de evaluación de efluentes.....	18
1.3 Situación en La Pampa.....	23
1.4 Objetivos.....	25
1.5 Bibliografía.....	25
Capítulo 2- Materiales y métodos generales.	33
2.1 Batería de Bioensayos	33
2.2- Toxicidad de mezclas binarias.....	36
2.3 Caracterización fisicoquímica de aguas residuales.....	37
2.4 Tratamientos aplicados a las submuestras.....	42
2.5 Bibliografía.....	43
Capítulo 3- Ecotoxicidad de los enantiómeros del ibuprofeno, y sus mezclas con acetaminofeno	
4.1 Introducción.....	44
4.2 Materiales y métodos.....	47
4.3 Resultados.....	48
4.4 Discusión y conclusiones.....	52
4.5 Bibliografía.....	54
Capítulo 4- Toxicidad de efluentes líquidos urbanos: identificación de fracciones tóxicas y relación con parámetros fisicoquímicos	
4.1 Introducción.....	58
4.2 Materiales y métodos.....	59
4.3 Resultados y discusión.....	63
4.4 Conclusiones.....	84
4.5 Bibliografía.....	86
Capítulo 5- Aplicación de bioensayos en la evaluación ecotoxicológica de efluentes de tambo	
5.1 Introducción.....	89
5.2 Materiales y métodos.....	90
5.3 Resultados y discusión.....	93
5.4 Conclusiones.....	103
5.5 Bibliografía.....	104
Capítulo 6 Conclusiones generales.....	106
Anexo: Glosario de siglas y abreviaturas.....	110

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. EFLUENTES LÍQUIDOS:

El agua, como recurso, resulta indispensable para la vida humana y el desarrollo sostenible del medio ambiente. Hacemos uso de este recurso para un sin número de actividades y, finalizada la actividad, regresamos las aguas resultantes (denominadas efluentes líquidos), con diversos materiales incorporados, al ambiente (Figura 1.1).

Así, las principales vías de entrada de contaminantes al medio son las aguas residuales. El material incorporado dependerá del uso que se le haya dado y permite clasificar las aguas residuales emitidas según su origen en urbanos/comerciales (ELUs), industriales y agropecuarios.

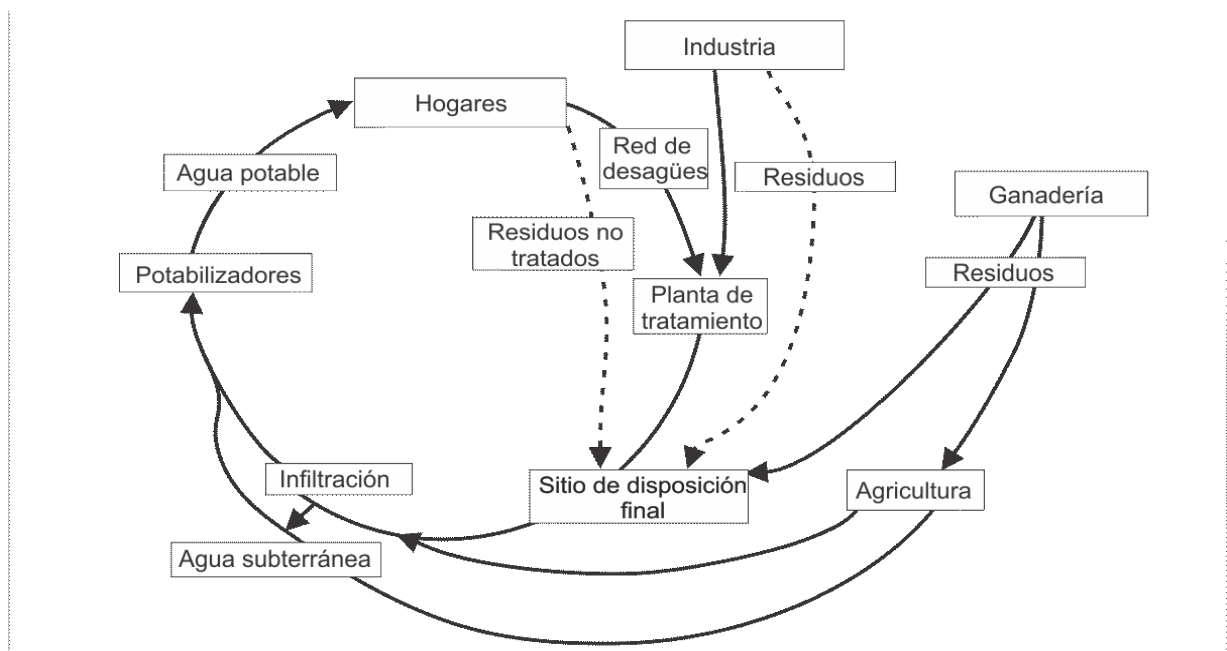


Figura 1. 1- Componentes de un ciclo de agua de uso para consumo/producción. Adaptado de Petrović et al (2003)

Independientemente de la fuente, las aguas residuales generan un impacto en el medio ambiente, ya que modifican las características del medio donde se produce su descarga. La importancia del impacto depende de sus propiedades, cuali y cuantitativas. En virtud de esto, la caracterización de los residuos líquidos es fundamental para la implementación de sistemas de gestión adecuados. En este trabajo se abordan problemáticas asociadas a los ELUs y a un tipo particular efluente líquido de origen agropecuario emitidos por las salas de ordeño.

1.1.1 Caracterización de los efluentes líquidos urbanos (ELUs)

Los ELUs están constituidos por una mezcla compleja y variable de sustancias químicas. En ellos convergen los residuos líquidos de diferentes fuentes: domicilios, comercios, hospitales, desagües pluviales y muchas veces también aquellos de origen industrial, lo que ha llevado a considerarlos mezclas complejas de composición desconocida (Aguayo et al., 2004; Dalzell et al., 2002; Farre et al., 2002) integrada por una gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas (Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003), las cuales interaccionan entre sí (Dalzell et al., 2002; Farre et al., 2002; Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003; Teijon et al., 2010; Terzić et al., 2008). Así, las aguas residuales constituyen una importante fuente de contaminantes (Brown et al., 2006; Clara et al., 2011, 2005; Miège et al., 2009; Oberholster et al., 2008; Smital et al., 2011; Teijon et al., 2010) y, en países en desarrollo, donde son vertidas al medio con escaso tratamiento, su aporte de contaminante es especialmente alto (Fernandez Cirelli and Ojeda, 2008; Oberholster et al., 2008; Smital et al., 2011; Terzić et al., 2008).

Estos efluentes suelen presentar una composición dinámica, cuyos componentes y concentraciones cambian constantemente influenciados por la actividad humana y por factores ambientales (Clara et al., 2005; Garcia-Reyero et al., 2011; Üstün, 2009), y la biodisponibilidad de las sustancias del efluente pueden ser fuertemente variables por degradación o la interacción química de los componentes de dicho efluente (materia orgánica, microflora) o los sistemas de procesamiento de los mismos (Aguayo et al., 2004; Manusadžianas et al., 2003; Wong et al., 2001). Estudios actuales acerca de su composición han identificado gran variedad de sustancias entre sus componentes.

Tradicionalmente el manejo de las Plantas de tratamiento de residuos líquidos incluye registro de algunos parámetros tales como: DBO, DQO, COT, COD, SST, NT, PT, SSe, Recuento de colonias de coliformes, conductividad y pH, principalmente. Los reportes para DBO en ELUs sin tratamiento varían dentro del rango 17 a 884 mg/L y con tratamiento de 5 a 350 mg/L. Para DQO en efluentes líquidos antes y después del tratamiento se informan niveles de 31 a 2135 mg/L y 5 a 468 mg/L, respectivamente. Mientras que para el contenido de SST se indican concentraciones de 13 a 1100 mg/L para ELUs sin tratamiento y 6 a 350 mg/L para los tratados. El rango de pH informado está entre 6,8 y 8,3 (Di Marzio et al., 2005; Karvelas et al., 2003; Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003; Muñoz et al., 2007; Pratts, 2011; Principi et al., 2006; Santos et al., 2009).

En los últimos años diversos autores han evaluado la presencia y/o la concentración de componentes de la fracción inorgánica, como metales y nutrientes, y de una amplia variedad de compuestos orgánicos incluidos fármacos, hormonas, agroquímicos, surfactantes, entre otras sustancias, en efluentes de diversas partes del mundo, ayudados por técnicas analíticas modernas. Algunas de las investigaciones han trabajado sobre un amplio espectro de compuestos, mientras otras se han limitado a un grupo determinado.

Respecto a la fracción inorgánicas, los compuestos de fósforo y nitrógeno se consideraban como los principales contaminantes en las aguas residuales urbanas e industriales (Liberti et al., 1988) junto a la presencia de metales pesados y, por esto, han sido objeto de estudio. La figura 1.2 resume concentraciones de metales pesados detectadas en aguas residuales.

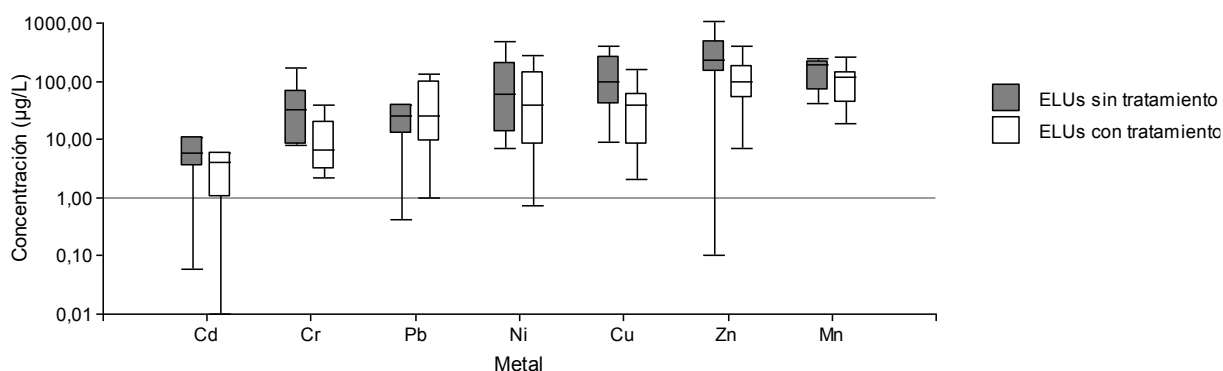


Figura 1. 2- Concentración de metales en efluentes líquidos urbanos con y sin tratamiento. Información sumaria de Chipasa (2003) ;Chung et al. (2011), Drozdova et al. (2015); Karvelas y Samara (2003); Mansourri and Madani (2016); Manusadzianan et al.(2003); Marín Galvín (2016); Pérez Díaz et al. (2016); Pratts (2011) ;Principi et al. (2006); Rezapour et al. (2019); Teijon et al. (2010); Üstün (2009).

La fracción orgánica de los residuos líquidos urbanos está teniendo actualmente mucho interés, debido a la alta diversidad de los compuestos que pueden hallarse en los efluentes y las consecuencias que pueden ocasionar algunos de éstos al ingresar a los sistemas ambientales. Muchos de éstos comenzaron a considerarse como problemáticos para el medio ambiente en los últimos años, ya sea porque antes eran desconocidos o simplemente porque no se los consideraba problemáticos. Así, se los denominó contaminantes emergentes y su presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias.

En efluentes municipales e industriales de España, Aguayo *et al.* (2004) determinaron la presencia de más de 49 compuestos en su fracción orgánica, mediante procedimientos de SPE y GC/MS. Los compuestos identificados con mayor frecuencia fueron BPA y octilfenol (100% de detección) y N, N-dimetil-benzamina y ftalatos (86% de detección). Otras sustancias identificadas con menor frecuencia y cuyas concentraciones no fueron cuantificadas por estos autores incluyen: pesticidas organoclorados, compuestos fenólicos (nitro y cloro fenoles) e

hidrocarburos aromáticos policíclicos, todas ellas de gran interés ambiental (Aguayo et al., 2004).

En la mayor planta de tratamientos de efluentes de Croacia, Smital et al. (2011) evaluaron la composición de los efluentes que ingresaron a ella. Las determinaciones las realizaron mediante SPE y GC/MS, para las fracciones no polar y media polaridad, y UHPLC, para la fracción polar. Entre los compuestos no polares que identificaron 19 hidrocarburos (principalmente alquibencenos lineales, di-isopropil ftalatos e HAPs), entre los de mediana polaridad identificaron 4 esteroides (entre ellos colesterol y coprostanol), 2 fragancias (galatoxide y vesalide), 6 ácidos y ésteres (principalmente ftalatos), 10 pesticidas (acetacloro el más abundante) y otros 25 compuestos. La fracción polar estuvo compuesta por 12 fármacos y 4 surfactantes. Los fármacos con mayores concentraciones fueron acetaminofeno, propifenazona, cafeína y azitromicina. Los surfactantes fueron los compuestos con mayor concentración en el efluente, con niveles superiores a los 10 µg/L en general y con concentraciones máximas por encima de 1 mg/L para sulfonatos de alquibencenos lineales y polietoxilatos de alcohol lineales.

En la evaluación de afluentes y efluentes de la planta de tratamiento de Thessaloniki, Grecia, Katsoyiannis and Samara (2007) determinaron las concentraciones de 26 COPs, de los cuales 22 fueron detectados en varias muestras. Los más abundantes fueron los congéneres de PCBs-52; PCB-101; PCB-180 y, la concentración conjunta de los siete PCBs detectados en el afluente fue de 1 µg/L y a 0,3 µg/L en el efluente. Para cada par de muestras, afluente-efluente, las concentraciones fueron siempre mayores en el líquido sin tratamiento.

En estudios de aguas residuales domiciliarias de Croacia, Bosnia y Serbia realizados por Terzić et al. (2008) se analizaron mediante GC/MS y LC/MS las concentraciones de 76 contaminantes de los cuales 56 fueron detectados en al menos un muestreo. Los contaminantes más abundantes fueron los surfactantes, con concentraciones entre 0,2 y 9450 µg/L para los sulfonatos de alquibenceno lineales, entre 5 y 392 µg/L para nonilfenoles en concentraciones entre 0,5 y 4,4 µg/L. Los productos farmacéuticos y fragancias les siguieron en abundancia. Particularmente las concentraciones medias excedieron 1 µg/L para ibuprofeno (máx: 11,9 µg/L), sulfametoxazol (máx: 11,6 µg/L) y atenolol (máx: 7,6 µg/L). Diclofenac y norfloxacina presentaron concentraciones medias superiores a 0,8 µg/L. Otros compuestos presentes en menores concentraciones fueron: sulfapiridina, ciprofoxacina, azitromicina, eritromicina, metoprolol y gemfibrozil. Dentro de los residuos de productos de cuidados personal las fragancias fueron detectadas en más del 90 % de las muestras, y el repelente N- dietil-m-toluamida fue detectado en el 67 % de las muestras. También fueron determinados en la mayoría de los casos retardantes

de llamas (tri(cloroisopropil) fosfato y tri(2-cloroetil)fosfato). Entre los pesticidas estudiados para estos ELUs, atrazina presentó las mayores concentraciones con una media de 3,3 µg/L y fue detectado en más del 30 % de las muestras.

En ELUs de España, Teijon et al. (2010) evaluaron la presencia de 170 contaminantes. Las sustancias elegidas pertenecen a diferentes categorías, pero todas ellas con posibles efectos sobre el medio ambiente y/o la salud humana, entre ellos: 100 fármacos y productos de cuidado personal, 44 pesticidas, 16 HAPs y dioxinas, 4 metales pesados y 6 compuestos volátiles. Los productos farmacéuticos fueron el grupo de mayor frecuencia de detección y mayor concentración, la frecuencia de detección fue similar en afluentes y efluentes de la planta, pero la concentración disminuyó a la mitad ($> 25 \mu\text{g/L}$ en el afluente y $< 15 \mu\text{g/L}$ en el efluente). De los fármacos y productos de cuidado personal estudiados, 36 fueron detectados en al menos una muestra del afluente en concentraciones superiores a $0,1 \mu\text{g/L}$, y las mayores concentraciones correspondieron a: metabolitos de dipirona, N-formyl-4-amino-antipirina ($1,0\text{-}22,0 \mu\text{g/L}$) y N-acetil-4-amino-antipirina ($0,9\text{-}7,1 \mu\text{g/L}$), hidroclorotiazida ($1,9\text{-}9,5 \mu\text{g/L}$), gemfibrozil ($0,3\text{-}5,7 \mu\text{g/L}$), diclofenac ($0,4\text{-}4,5 \mu\text{g/L}$), atenolol ($0,2\text{-}4,5 \mu\text{g/L}$) y galatoxide ($0,2\text{-}9,7 \mu\text{g/L}$). En los efluentes los productos con mayor concentración y detección fueron: hidroclorotiazida ($1,8\text{-}7,7 \mu\text{g/L}$), gemfibrozil ($0,2\text{-}5,7 \mu\text{g/L}$), N-formyl-4-amino-antipirina ($0,5\text{-}4,2 \mu\text{g/L}$), N-acetil-4-amino-antipirina ($0,6\text{-}3,4 \mu\text{g/L}$) y galatoxide ($0,2\text{-}9,7 \mu\text{g/L}$), lo que muestra la baja eficiencia del tratamiento para remover estos productos (Teijon et al., 2010).

En investigaciones realizadas con aguas residuales de diferentes plantas de tratamiento en Austria por Clara et al. (2005) en busca de 8 fármacos, 2 fragancias y 9 disruptores endócrinos se identificaron como los fármacos más abundantes antes del tratamiento a diclofenac ($0,9\text{-}4,1 \mu\text{g/L}$), bezafibrato ($1,5\text{-}7,6 \mu\text{g/L}$) y carbamazepina ($0,3\text{-}1,8 \mu\text{g/L}$). Estos compuestos fueron también los más abundantes luego del tratamiento. Entre los disruptores endócrinos buscados los más abundantes en estos afluentes resultaron ser los surfactantes nonilfenol ($1,3\text{-}4 \text{ ng/L}$) y nonilfenol monoetoxilado ($4,1\text{-}7,3 \text{ ng/L}$) y BPA ($0,7\text{-}2,4 \text{ ng/L}$), mientras que en los efluentes los más abundantes fueron ácido nonilfenol acético ($0,9\text{-}5,2 \text{ ng/L}$) y ácido nonilfenol etoxiacético ($0,2\text{-}8,5 \mu\text{g/L}$). BPA disminuyó su concentración en más del 90 % con el tratamiento. Respecto a las fragancias estudiadas, galatoxide fue encontrada en los líquidos afluentes en concentraciones entre $0,8$ y $4,4 \mu\text{g/L}$ y tonalide entre $0,2$ y $1,1 \mu\text{g/L}$, en general los niveles fueron muy superiores a los correspondientes al efluente y, luego del tratamiento las concentraciones están por debajo de $1 \mu\text{g/L}$ (Clara et al., 2005). Estudios posteriores de estas mismas fragancias arrojaron también concentraciones elevadas en los líquidos sin tratamiento (tonalide: $0,4\text{-}1,8 \mu\text{g/L}$ y galatoxide: $0,9\text{-}13 \mu\text{g/L}$) y niveles muy bajos en los efluentes. Al indagar en este estudio acerca de las

fuentes de estas fragancias en las aguas residuales los autores concluyeron que las mayores concentraciones de estos compuestos correspondieron a los líquidos residuales predominante de origen domiciliario, siendo de esta forma las áreas residenciales el principal emisor, con escaso aporte de los sectores industriales, exceptuando a las industrias cosméticas (Clara et al., 2011). La relevancia ambiental de estas fragancias se debe a su carácter lipofílico con tendencia a la bioacumulación. Otras de las fragancias que han sido evaluadas son: cashmerane, celestoide, phantolide y tresolide, todas ellas detectadas en muy bajas concentraciones (Clara et al., 2011).

Del reducido compendio anterior, es inmediato identificar a los fármacos como un grupo de especial interés, debido a su amplio uso, y existe amplia referencia bibliográfica acerca de la ocurrencia de fármacos en ELUs (Aguayo et al., 2004; Andreozzi et al., 2003; Barnes et al., 2008a; Behera et al., 2011; Boyd et al., 2003; Brown et al., 2006; Carballa et al., 2004; Clara et al., 2005; Cortacans et al., 2007; Gómez et al., 2007; Halling-Sorensen et al., 1998; Han et al., 2006; Lin et al., 2009). En particular se considera a los efluentes urbanos como la mayor fuente de fármacos al medioambiente (Fent et al., 2006; Santos et al., 2010). Varios estudios realizados en diferentes países han identificado entre 80 y 100 fármacos y metabolitos en efluentes y/o aguas superficiales, entre estos ibuprofeno, acetaminofeno y naproxeno (antiinflamatorios), bexafibrato, gemfibrozil (reguladores lipídicos), carbamazepina (anticonvulsionante), trimetoprima, oxitetraciclina y sulfametoxazol (antibióticos) aparecen entre los más comunes (Fent et al., 2006; Jux et al., 2002; Lin et al., 2009, 2008; Mompelat et al., 2009; Santos et al., 2009; Wu et al., 2012). Si bien las concentraciones detectadas suelen ser bajas (ng/L o μ /L), los fármacos son sustancias que, precisamente, se diseñan para ser biológicamente activos a bajas concentraciones.

Los fármacos y sus metabolitos son incorporados a los ELUs e ingresan al medioambiente debido a que, luego de su administración a animales y seres humanos, son excretados a través de heces y orina. Se puede estimar el aporte de fármacos conociendo la fracción no biodisponible y el porcentaje de excreción como fármaco libre de cada droga. Individualmente, los fármacos se vierten en concentraciones que dependen de dos grandes variables. Por un lado, su estabilidad e inercia química, que determinan su metabolismo *in vivo* y su comportamiento durante el tiempo de permanencia en los sistemas de transporte y tratamiento de aguas residuales y finalmente su persistencia ambiental. Por otro lado, la frecuencia y abundancia de uso, que depende de la actividad farmacológica para la que están diseñados y de las políticas sanitarias de cada país o región. En este sentido, los fármacos provistos para dolencias comunes, sin restricciones normativas, y que además son excretados como droga libre en una proporción importante, tienen grandes probabilidades de constituirse en contaminantes de importancia. Finalmente, su impacto

ambiental podría asociarse más a la persistencia y a la ecotoxicidad, que a las cantidades vertidas (Fent et al., 2006, Mompelat et al., 2009, Santos et al., 2010). Es un agravante el hecho de que los sistemas de tratamiento vigentes no están diseñados para el abatimiento de estas sustancias.

En estudios realizados sobre efluentes de Italia, Francia, Grecia y Suecia se detectó, mediante GC/MS y HPLC–MS/MS, más de 20 fármacos entre ellos gemfibrozil, ibuprofeno, naproxeno, diclofenac y carbamazepina presentaron concentraciones superiores a 1 µg/L en al menos 2 plantas de tratamiento (Andreozzi et al., 2003)

En 6 plantas de tratamiento de EE.UU., Brown et al. (2006), examinaron 11 antibióticos de amplio uso en la zona. De las muestras correspondientes a los líquidos sin tratamiento en 4 de las plantas de tratamiento se halló al menos uno y 3 sitios contuvieron 3 o más antibióticos. En este estudio también se indagó acerca de las posibles fuentes de antibióticos en los efluentes de 5 hospitales y diferentes tipos de residencias y comercios que convergen en una planta de tratamiento y hallaron 6 productos presentes en efluentes de hospitales y sólo dos en las demás. Sin embargo, sólo 3 fueron detectados en los ELUs tratados. Esto podría deberse a: procesos de dilución, absorción, degradación o variaciones temporales en los aportes. Respecto a la eficiencia en la remoción se observó que los 3 antibióticos fueron hallados tanto en el afluente como en el efluente, las concentraciones fueron siempre menores en el efluente, pero la eficiencia de la remoción fue diferente para cada compuesto variando entre 20 y 77% (Brown et al., 2006). Los valores son similares a los porcentajes de remoción obtenidos por Santos et al (2007) para fármacos en general (8,1 y 87,5 %).

Las Figuras 1.3a y 1.3b fueron elaborados en función a los reportes de diversas partes del mundo y compendia las concentraciones de fármacos en aguas residuales urbanas con y sin tratamiento.

Este compendio permite identificar a los productos farmacéuticos que presentan las mayores concentraciones en los ELUs. Del compendio de fármacos, el 68% presenta niveles medios por encima del 1µg/L en ELUs sin tratamiento. Mientras que, luego del tratamiento sólo el 24 % se mantiene por sobre este valor. En particular se identifican acetaminofeno e ibuprofeno en altas concentraciones en las aguas sin tratamientos. Luego del tratamiento las concentraciones son menores, siendo el descenso aún mayor para ACF, sin embargo, las medias de ambos fármacos se mantienen por encima de 1µg/L. Este análisis manifiesta la alta probabilidad de la presencia simultánea de diferentes fármacos en los líquidos residuales, y la necesidad de evaluar el riesgo al que están expuestos los organismos presentes en las zonas de vertidos de ELUs.

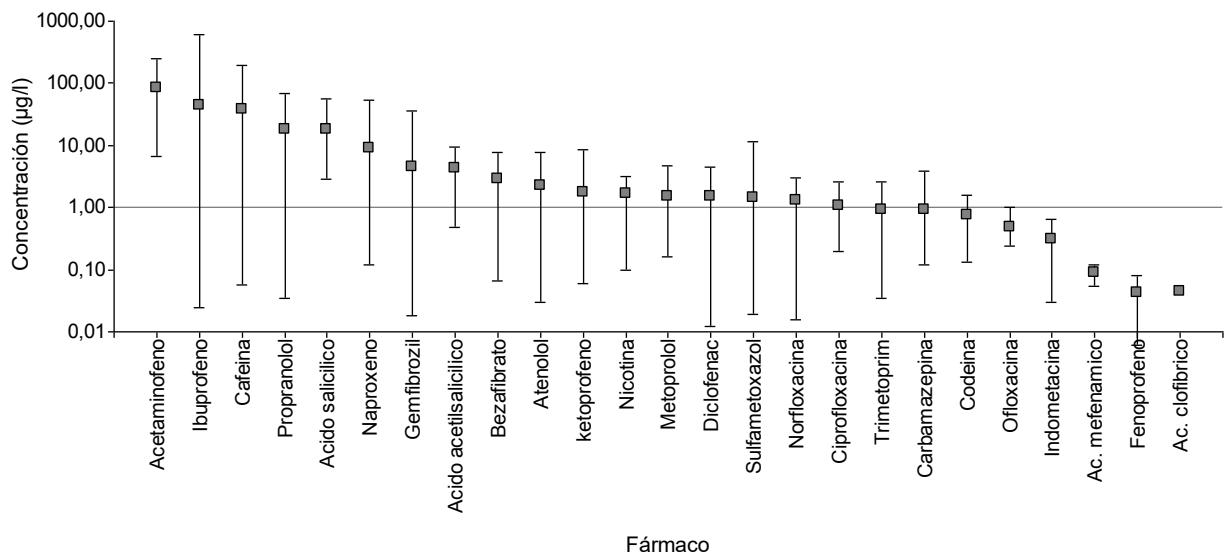


Figura 1.3a

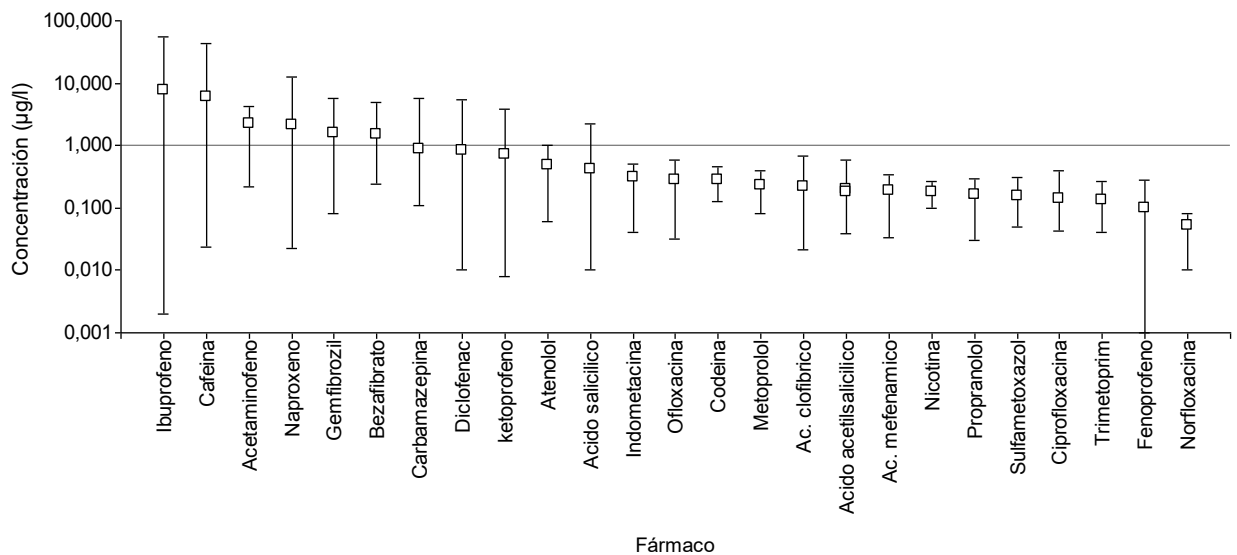


Figura 1.3b

Figura 1.3- Concentración ($\mu\text{g/L}$) de fármacos en efluentes líquidos urbanos sin tratamiento (a) y en efluentes líquidos con tratamiento (b). Elaborados en base a los reportes de Andreozzi et al. (2003), Bendz et al. (2005), Boyd et al. (2003), Brown et al. (2006), Buser et al. (1999), Carballa et al. (2004), Clara et al. (2005), Gomes et al. (2007), Heberer (2002), Hernando et al. (2006a), Koutsouba et al. (2003), Kuster et al. (2008), Lee et al. (2005), Lee et al. (2007), Lindqvist et al. (2005), Lishman et al. (2006), Metcalfe et al. (2003), Nakada et al. (2006), Quintana et al. (2005), Roberts and Thomas (2006), Santos et al. (2007), Santos et al. (2009), Sim et al., (2010), Tauxe-Wuersch et al. (2005), Teijon et al. (2010). Ternes et al. (1998), Terzić et al. (2008), Thomas and Foster (2004) y Verenitch et al. (2006).

Toda esta revisión de la composición de los ELUs de diversas partes del mundo permite ver que existe una alta variabilidad de la composición de los efluentes, aunque también deja a la vista un conjunto de sustancias que aparecen en los efluentes con frecuencias relativamente altas. Muchas de estas sustancias son de gran importancia ya sea por su impacto en el ambiente o en la salud humana. También, existen reportes de presencia de contaminantes en sitios de disposición final de ELUs y de acumulación en los tejidos de los organismos que tienen ciclos de vida asociados a

cuerpos de agua con aportes de aguas residuales (Ashton et al., 2004; Barnes et al., 2008b; Bendz et al., 2005; Bound and Voulvoulis, 2006; Boyd et al., 2003; Brooks et al., 2003; Buser et al., 1999, 1998; Fent et al., 2006; Fram and Belitz, 2011; Gheorghe et al., 2016; Halling-Sorensen et al., 1998; Hernando et al., 2006a; Jux et al., 2002)

La lista de contaminantes detectados y cuantificados en ELUs es extremadamente larga, sin embargo, aún tras un exhaustivo estudio, numerosos componentes pueden aún no ser identificados (Aguayo et al., 2004; Babín et al., 2001) y otros pueden hallarse en concentraciones por debajo de los límites de detección del instrumental utilizado. La presencia de químicos con efectos tóxicos en los efluentes representa un riesgo sobre los sistemas ambientales. Muchos de estos componentes, aun en concentraciones muy bajas, pueden tener un importante efecto en el efluente global (Farré et al., 2007; Farré and Barceló, 2003). Para la mayoría de los componentes no se conoce su naturaleza química o tóxica (Aguayo et al., 2004), y mucho menos aún se tiene información certera acerca de las características tóxica de la mezcla de sustancias, tal como se encuentran presentes en estos efluentes. Los efectos tóxicos en mezclas pueden ser modificados por las interacciones entre sus componentes, lo que podría generar efectos antagónicos o sinérgicos entre sus componentes afectando la toxicidad de la mezcla (Farre et al., 2002; Katsoyiannis and Samara, 2007).

1.1.2. Efluentes agropecuarios:

Los efluentes agropecuarios son aquellos líquidos residuales originados por actividades del sector primario de la economía. Incluyen residuos de ganadería, pesca, actividad forestal, agricultura, actividad cinegética y los producidos por industrias alimenticias (frigoríficos, industrias lácteas y demás industrias alimenticias).

Tipo de efluente	DQO (mg/L)	DBO (mg/L)	pH	SST (mg/L)	ST (mg/L)
Fábrica de leche y productos lácteos	10251	4840	8,34	5802,6	-
Efluente lácteo (con leche)	1900-2700	1200-1800	7,2-8.8	500-740	900 -1350
Agua residual de tambo (con excretas)	2500-3000	1300-1600	7,2-7,5	7200-8000	8000-10000
	1120-3360	320-1750	5,6-8	28-1900	-
Suero lácteo	71526	20000	4,1	22050	56782
	80000-90000	120000-135000	6	8000-11000	-
Aguas residuales de industria láctea	2500-3300	-	6,4-7,1	630-730	1300-1400
	2100	1040	7-8	1200	2500

Tabla 1. 1- Caracterización típica de efluentes de la industria láctea en base a varios autores. Modificado de Raghunath et al (2016).

Al tratarse de una actividad productiva con metodologías suficientemente definidas, es posible establecer valores típicos para los parámetros correspondientes a dichos efluentes. A modo de ejemplos, los correspondientes a la industria láctea se presentan en la Tabla 1.1.

1.1.2.1. Efluentes líquidos de tambo (ELTs).

La producción de leche y derivados es uno de los sistemas agroalimentarios de mayor relevancia en Argentina. En el país existen más de 11000 tambos, emplazados el 35% en Córdoba, el 32% Santa Fe y el 28% en Buenos Aires. La gran mayoría son tambos bovinos, y una pequeña fracción corresponde a tambos ovinos. Según la encuesta realizada por el proyecto “Producción de Leche Ovina” (INTA), en el año 2008 había 48 tambos con casi 4000 ovejas en ordeño. La producción estimada superaba los 500000 litros de leche y los 90.000 kg de quesos. En estos tambos, el 80% de las ovejas en ordeño eran de raza Frisona del Este y PampInta.

En los últimos años, la producción láctea en general ha sufrido un proceso de intensificación. Así, los tamaños de los rodeos han aumentado sin incrementarse del número de tambos ni su superficie. Esta transformación en el sistema productivo genera una mayor producción de residuos, sólidos y líquidos, en las salas de ordeño. En la mayoría de los casos la intensificación del sistema se llevó a cabo sin tener en cuenta la necesidad de implementar o adecuar infraestructura para el tratamiento y la disposición final de los residuos generados (Herrero and Gil, 2008; Taverna et al., 2004).

Durante las operaciones normales de las salas de ordeño se originan líquidos residuales que están constituidos por una componente líquida y una componente sólida. La fase líquida incluye el agua del lavado de instalaciones, equipos y corrales, excretas (heces y orina) recolectadas con agua de lavado, restos de leche y de alimentos, detergentes y otros productos químicos empleados durante el proceso de limpieza (Raghunath et al., 2016). La componente sólida conformada por las heces sólidas que son arrastradas con las aguas de lavado. Esta combinación genera un efluente con alto contenido de sólidos, nutrientes, materia orgánica y microorganismos (M. S. Gutiérrez et al., 2008). El proceso de intensificación de la actividad trae asociado un aumento del riesgo de contaminación local, debido a que una mayor cantidad de residuos, líquidos y sólidos, se concentran en pequeñas superficies destinadas a su disposición y generalmente próximas a las salas de ordeño.

La falta de manejo de los efluentes de tambo constituye una de las principales fuentes de contaminación del agua subterránea en la cuenca lechera argentina (Badino et al., 2015; Brião and Tavares, 2007; Cappellini, 2011; Chandra et al., 2018; Herrero, 2014; Taverna et al., 2004).

La mayor parte de los tambos de Argentina, vierte los residuos a cuerpos de agua artificiales o bajos naturales y, una baja proporción, hace reuso de efluentes para riego, con escasa evaluación de sus propiedades (Herrero, 2014). No existe actualmente una legislación específica que regule las condiciones de vertido de los residuos generados en este tipo de instalaciones.

Indagaciones acerca del manejo de los efluentes de tambos en provincia de Buenos Aires obtuvieron que la mayoría de los establecimientos derivan los desechos a lagunas artificiales para luego verter los líquidos finales a cursos de agua próximos (Nosetti et al., 2002). Por otro lado, Badino et al (2015) realizaron un estudio similar en tambos de Santa Fé y establecieron que sólo el 27% de los establecimientos realiza manejo del efluente. Respecto al destino final, el 56% de los tambos, descargan los efluentes crudos en lagunas artificiales; el 22 % los vierte en cunetas y/o cursos de agua natural; el 11% los aplica al suelo.

Si bien no es una prácticas muy difundida en Argentina, en los últimos años, se incentiva el reuso de ELTs (Diez, 2014, 2012; Gambaudo et al., 2014; Imhoff et al., 2008). El reuso de los efluentes para riego se ha llevado a cabo teniendo en cuenta, principalmente, la productividad vegetal, basados en el aporte de nutrientes que se genera y que pueden reemplazar, en parte, al uso de fertilizantes comerciales. También se ha evaluado su capacidad para mejorar suelos degradados de cultivo o pastoreo. Sin embargo, las evaluaciones generalmente no tienen en cuenta su impacto en la biota, por lo que es necesario conocer su toxicidad en diferentes grupos de organismos.

Evaluaciones del efecto de la aplicación de ELTs sobre la fertilidad del suelo y la productividad y calidad de cultivos identifican una respuesta positiva en la productividad y aumento de calidad de los cultivos. Sin embargo, aunque se incorporaron cantidades elevadas de nitrógeno, no se observaron cambios significativos en las propiedades del suelo, lo que sugiere un movimiento importante de nutrientes por lixiviación/volatilización (Gambaudo et al., 2014). En concordancia con esto, otros resultados presentan que regar con ELTs incrementa la capacidad de infiltración y alertan acerca de la falta de estudios a largo plazo (Imhoff et al., 2014)

Los contaminantes presentes en las excretas pueden ingresar a los cuerpos de agua superficiales por escurrimiento desde corrales o desde potreros fertilizados con estiércol. A su vez, los contaminantes ingresan a las aguas subterráneas por lixiviación profunda desde lagunas de contención/tratamiento/disposición final. De esta manera, los residuos de tambo mal manejados llegarán fácilmente a agua subterránea y se constituirán como fuentes puntuales de contaminación. En Argentina se detectaron altas concentraciones de nitratos (>150 ppm) en aguas subterráneas próximas a lagunas de efluentes de tambos. Estas altas concentraciones hacen

que las aguas subterráneas captadas en perforaciones de las instalaciones de ordeño resulten no aptas para consumo humano (Herrero and Gil, 2008). Andriulo et al (2003) reportaron elevados contenidos de nitrógeno amoniacal (N-NH_3^-) en el agua de un molino próximo a corrales de un establecimiento de engorde a corral (27 mg/L). Posteriormente, hallaron niveles superiores de nitrógeno nítrico (N-NO_3^-) en aguas subterráneas próximas a lagunas de aguas residuales de tambos (>34 mg/L). Es importante tener en cuenta también que la mala calidad del agua empleada en los lavados de las máquinas de ordeño puede afectar la calidad de la producción de leche.

La aplicación de aguas residuales con tratamiento deficientes directamente en el suelo introduce nutrientes, pero también una alta carga de sales, patógenos, antibióticos y hormonas, y esto aumenta el riesgo no solo de contaminación con nitratos y salinización, sino también de presencia de micro contaminantes en suelos y aguas subterráneas. Al igual que en los ELUs, en los efluentes de tambos está creciendo el interés por los residuos de fármacos y niveles de hormonas presentes. Ya sea detectados trazas de fármacos en los líquidos residuales, en los cuerpos de agua y suelos en los que se los dispone (Davis, J., Truman, C., Kim, S., Ascough, J., Carlson et al., 2006; Halling-Sorensen et al., 1998; Jjemba, 2003). Los productos farmacéuticos ingresan al sistema al ser excretados por los animales, ya sea durante el ordeño o en los corrales de espera, dado que, las lagunas de tratamientos no son aptas para su eliminación.

Entre los contaminantes hallados, las drogas antimicrobianas resultan de gran preocupación por los efectos adversos en el ecosistema y por la posibilidad de afectar la salud humana, ya que pueden actuar sobre microorganismos benéficos presentes en suelo y agua, y colaborar en generar resistencia microbiana (Boxall et al., 2004; Burnes, 2003; Kümmerer, 2004; Teuber, 2001). Halling-Sørensen et al. (2002) aislaron bacterias resistentes a antibióticos en aguas subterráneas ubicadas hasta 250 m. de lagunas de efluentes de porcinos. Sin embargo, en los líquidos residuales los antibióticos se mantuvieron por debajo de los límites de detección. Hamscher et al (2005), detectaron varias sulfonamidas en líquidos residuales, suelos irrigadas y aguas superficiales y subterráneas. En particular, identificaron sulfametazina (140 $\mu\text{g/L}$) en agua subterránea de zonas arenosas que fueron fertilizadas con estiércol. Y las máximas concentraciones en suelos correspondieron a tetraciclina (295 $\mu\text{g/k}$), sulfametazina (2 $\mu\text{g/k}$) y clortetraciclina (39 $\mu\text{g/k}$).

Así, la gestión de los residuos lecheros es de gran importancia para la sustentabilidad de los sistemas ya que disminuye el impacto negativo de los efluentes del tambo sobre el medio ambiente y la salud general.

1.2. BIOENSAYOS COMO HERRAMIENTA DE EVALUACIÓN DE EFLUENTES

Cómo se ha descrito en la sección 1.1 los líquidos residuales, en particular los de origen urbano, constituyen mezclas complejas y dinámicas, por lo que la medición de parámetros físicos y químicos por sí solos no permite establecer la ocurrencia de efectos en la biota, ni son un indicador directo de su potencial toxicológico. Así, en los últimos años la comunidad científica ha reconsiderado el uso de estos parámetros por sí solos (Aguayo et al., 2004; Katsoyiannis and Samara, 2007; Oberholster et al., 2008). Algunos protocolos de seguimiento incluyen detecciones de contaminantes específicos, esta metodología presenta algunas limitaciones debido a que: i) se concentra sólo en un limitado número de tóxicos; ii) muchas sustancias pueden generar efectos toxicológicos aún en concentraciones bajas y iii) este tipo de acercamiento ignora las interacciones entre los componentes del efluente (Aguayo et al., 2004; Katsoyiannis and Samara, 2007; U.S. EPA, 1991). Así, aunque la mayoría de los contaminantes pudiesen ser identificados, mediante métodos analíticos, en una mezcla sus propiedades toxicológicas serían aún desconocidas debido a la falta de conocimiento acerca de toxicidad individual de numerosas sustancias y la toxicidad final de muestras complejas tales como los efluentes urbanos (Aguayo et al., 2004). Así, en la actualidad se considera a los ensayos de toxicidad o bioensayos como una herramienta de medición directa de la toxicidad global de un efluente. Esta aproximación compensa algunas limitantes de los análisis tradicionales, al integrar los efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos que tienen lugar entre los contaminantes, inclusive aquellos que no son detectados o considerados durante las evaluaciones químicas (Aguayo et al., 2004; Pandard et al., 2006).

Los bioensayos consisten en la utilización de microorganismos, plantas, invertebrados, peces y/o cualquier otro organismo vivo, que son expuestos a una muestra de interés para determinar el efecto de ésta sobre el organismo. Son herramientas de diagnóstico utilizadas para determinar el efecto tóxico de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (G Castillo Morales, 2004). Los efectos pueden manifestarse y evaluarse a diferentes niveles de complejidad biológica, desde estructuras subcelulares, hasta organismos completos o biocenosis.

La toxicidad de una sustancia es la capacidad que ésta posee para ejercer efectos adversos sobre los organismos y está relacionada con las características del tóxico (composición, concentración), las características de la exposición (duración y frecuencia) y las características del organismo (especie, estado fisiológico, sexo, etc.).

Los ensayos de toxicidad se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su duración. Por un lado, los ensayos que se realizan sobre un periodo corto del ciclo de vida del organismo y por

otro lado están aquellos que se extienden al menos el 30 % del ciclo de vida. Los primeros se denominan ensayos de toxicidad aguda y los segundos son ensayos de toxicidad crónica. Respecto a su aplicación, los bioensayos agudos podrían no ser los más apropiados cuando los tóxicos se encuentran en concentraciones bajas, ya que concentraciones bajas más o menos continuas usualmente causan efectos crónicos en los organismos. A su vez los ensayos pueden centrarse en evaluar efectos letales o subletales, tales como cambios morfológicos, crecimiento, reproducción, entre otros (G Castillo Morales, 2004)

Los bioensayos se realizan bajo protocolos estandarizados. Debido a que la toxicidad resultante del ensayo biológico es el resultado de la interacción de la sustancia y el organismo testeado los resultados varían con las diferentes especies utilizadas, es por ello que se recomienda la implementación de un conjunto de bioensayos que utilicen organismos de diferentes grupos taxonómicos y diferentes niveles tróficos para lograr un mayor acercamiento a la toxicidad del efluente (G Castillo Morales, 2004; Pandard et al., 2006). La implementación de las baterías de bioensayos con organismos variados es de gran importancia si se tiene en cuenta la alta diversidad de organismos capaz de hallarse en un ecosistema.

Las baterías de bioensayos resultan así una herramienta útil tanto para el monitoreo continuo de las plantas de tratamiento de efluentes como para la detección de mezclas tóxicas y, en complemento con análisis químicos, permite una mejor caracterización del efluente y evaluación del riesgo de su descarga al ambiente (Karvelas et al., 2003; Ren, 2004; Smital et al., 2011).

Los ensayos de toxicidad están siendo utilizados en diversas partes del mundo para evaluación de la toxicidad de ELUs. Si bien la literatura se refiere a CE o CI al hablar de estimaciones de toxicidad en efluentes cabe aclarar que no refieren estrictamente a una concentración sino a una dilución del efluente en medio. Rigurosamente no corresponde referirse a concentración siendo que, en muestras complejas con características indeterminadas, se desconoce la concentración real.

En estudios de efluentes de Croacia, se demostró una alta citotoxicidad en los ELUs sin tratamiento, con una viabilidad celular aproximada al 10 %, mientras que luego del tratamiento, mediante lodos activados, la viabilidad celular superó el 60 %. (Smital et al., 2011). Estos mismos efluentes presentaron una alta toxicidad crónica en algas, siendo la CI50 para *Desmodesmus subspicatus* del 12% previa al tratamiento y del 15% luego del tratamiento.

Para ELUs de España la CE50 para inmovilización de *Daphnia magna* varió entre 8,1 y 65%, y la CE50 para la inhibición del crecimiento de algas dulceacuícolas de la especie *Chlorella vulgaris* fue siempre superior al 60% (Aguayo et al., 2004) Estos resultados ejemplifican la

variabilidad que existe respecto a la sensibilidad entre especies y la importancia de la utilización de una batería de bioensayos.

En ELUs de Grecia, Katsoyiannis & Samara (2007) evaluaron toxicidad aguda por medio de la inhibición de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (bacterias planctónicas), y detectaron en todos los ELUs estudiados, sin tratar y con tratamiento, inhibición de la bioluminiscencia. En este caso el tratamiento consistía en: cribado, rejillas de remoción, sedimentación primaria sin uso de coagulantes y tratamiento por medio de lodos activados convencionales con desinfección final aplicando cloro gaseoso. Para los líquidos crudos la inhibición de la luminiscencia varió entre 25 y 60% y para líquidos tratados entre 6 y 20 %. Sus resultados muestran que durante el tratamiento dado a estos líquidos residuales su toxicidad resulta disminuida, sin embargo, los lodos residuales mostraron elevada toxicidad con niveles de inhibición de luminiscencia entre el 35 y 85%. La remoción de toxicidad generada por el tratamiento varió entre el 48 y el 79%. La mayor toxicidad de los lodos respecto a los líquidos residuales se debe a que, durante el tratamiento, parte de los tóxicos son removidos del efluente y acumulado en el lodo. En este trabajo se observó una correlación positiva entre la toxicidad y los parámetros DBO, DQO y SS, lo cual sugeriría que una parte importante de carga tóxica corresponde a materia orgánica suspendida.

En dos plantas de tratamiento de Barcelona, España, se comparó la toxicidad de los líquidos sin tratamiento, con líquidos intermedios del proceso (después del tratamiento con productos químicos para lograr precipitación de los sólidos disueltos, pero antes de tratamiento biológico) y el efluente final en *V. fischeri*. El resultado mostró un incremento de la toxicidad en el líquido intermedio respecto al afluente crudo, la cual se debería a que los productos químicos utilizados resultarían tóxicos para el organismo de prueba. Al final del tratamiento se observó una disminución significativa de la toxicidad respecto a los líquidos aún no tratados biológicamente, sin embargo, el porcentaje de inhibición se mantuvo entre 35 y 45% lo que indica que aún se conserva una importante carga tóxica (Farré et al., 2002).

En general las grandes industrias incorporan sistemas propios de tratamiento de sus efluentes, pero es muy común que las pequeñas y medianas industrias incorporen sus efluentes a aquellos de origen municipales, esto aumenta la probabilidad de presencia de sustancias tóxicas de diversos orígenes.

En plantas de tratamiento de Lituania y Estonia se evaluó la toxicidad de efluentes de origen urbano e industrial antes y después del tratamiento, por medio de una batería compuesta por 5 bioensayos. Los resultados que obtuvieron, en UT, corresponden a los siguientes rangos: para *D.*

magna 0-13,2 UT., para *Thamnocephalus platyurus* (crustáceo) 0-4 UT; para *Tetrahymena thermophila* (protozoo) 0-6,9 U.T., *Nitellopsis obtusa* (alga) 0 a 12 U.T. y *V. fisheri* 0 a 8,3 U.T. La toxicidad fue removida significativamente durante el tratamiento aplicado y *T. platyurus* y *N. obtusa* resultaron ser los organismos más sensibles a los efluentes urbanos tratados (Katsoyiannis and Samara, 2007)

Los ELUs pueden contener una amplia variedad de compuestos con actividad estrogénica (surfactantes, fenoles, hormonas, etc.) los cuales actúan en conjunto determinando un efecto estrogénico que puede medirse en mg/L equivalentes de 17 β -estradiol. Bioensayos realizados con peces de la especie *Pimephales promelas* con una duración de 3 semanas muestran que la exposición a efluentes de EEUU, los cuales cuentan con tratamiento primario y secundario antes de verterse al Río Mississippi, fue suficiente para inducir la expresión de un gen específico y para afectar el comportamiento sexual en los peces (Garcia-Reyero et al., 2011). Dicho efluente mostró un efecto claramente estrogénico. En Croacia se ha medido estrogénicidad en afluentes equivalente a 10,8 ng/L de 17 β -estradiol y 2,9 ng/L luego del tratamiento con lodos activados, lo que indica una importante remoción de compuestos con actividad estrogénica durante el tratamiento (Smital et al., 2011). La interferencia de las hormonas, naturales o artificiales, en los sistemas endócrinos se ha observado aún a nivel de unos pocos ng/L (Auriol et al., 2006)

Botts (1988) evaluó toxicidad ELUs de la planta Patapsco e indicó altos niveles de toxicidad de los afluentes para en *Ceriodaphnia dubia*, *Mysidopsis bahía* y *V. fisheri*. Y, de estos bioensayos, *C. dubia* fue el indicador más sensible a la toxicidad.

Existen escasas referencias respecto de la toxicidad de líquidos residuales pecuarios y en particular para salas de ordeño. Herrero (2014) evaluó la toxicidad de los efluentes de 8 tambos mediante ensayos con *Lactuca sativa* y halló que la mayoría de los efluentes sin tratamiento eran tóxicos, mientras que luego del tratamiento solo el 37% presentó toxicidad. Mishra et al (2000) evaluaron la toxicidad a corto plazo para efluentes lácteos crudos y tratados con *Labeo rohita* (pez). La CL50-96 h del efluente sin tratamiento fue del 25,5%. Una vez realizado el tratamiento el efluente mostró una disminución de la toxicidad y la CL50- 96 h fue 73,5%. Roche (1998) evaluó la factibilidad de emplear aguas residuales de tambo, que recibieron un tratamiento avanzado, como medio de cultivo para *D. magna*. Los resultados les permitieron considerar al agua residual como potencial medio de cultivo para *D. magna*, sin embargo, detectaron que los efluentes intermedios del tratamiento permitían menores crecimientos. Esto se atribuyó a la menor concentración de oxígeno disuelto y la mayor concentración de compuestos tóxicos en efluentes no estabilizados como amoníaco, sulfuro de hidrógeno y ácidos orgánicos. A su vez indicaron que *D. magna* no habita en la laguna de disposición final y esto puede deberse al bajo

nivel de oxígeno disuelto, y a que el bajo volumen de ensayo empleado puede haber favorecido la aireación.

Evaluaciones de la toxicidad de efluentes lácteos mediante el test de inhibición de la respiración en lodo activado concluyeron que los efluente sin tratamiento causan efecto inhibitorio sobre los lodos activados (Sivrioğlu and Yonar, 2015). La toxicidad fue tal que estos efluentes resultaron no aptos para aplicarles tratamientos biológicos convencionales y requieren de un manejo diferencial.

TIE: Es posible realizar evaluaciones de la toxicidad con el objetivo de identificar las fracciones de la muestra responsables de la toxicidad, aún sin conocer la composición de la muestra, esto fue descrito en reportes de la Agencia Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. EPA, 1993, 1991) para la Evaluación de la Identidad de la Toxicidad. La identificación de las fracciones tóxicas es posible mediante evaluaciones toxicológicas sucesivas realizadas sobre muestras manipuladas. El cambio en la toxicidad que se origina por la manipulación, da indicios de cuáles son las fracciones responsables de la toxicidad.

La variabilidad en los parámetros que se aplican tradicionalmente al monitoreo puede no coincidir con la variabilidad de la respuesta tóxica. La toxicidad es una respuesta genérica, no hay forma de determinar si la toxicidad observada es causada a un componente simple o a una combinación de componentes que aparecen en forma alternativa para generar la toxicidad. Por esto es importante que, durante el estudio de efluentes, se apliquen tanto métodos químicos como biológicos y que las caracterizaciones se realicen a largo plazo para establecer la variabilidad en la toxicidad.

Un protocolo TIE permite caracterizar la naturaleza fisicoquímica de los componentes que causan la respuesta tóxica. Tales características, como filtrabilidad, solubilidad y volatilidad son determinadas sin identificar específicamente los tóxicos. La caracterización de tóxicos en las muestras es llevada a cabo mediante varias manipulaciones de las muestras en laboratorio y el uso de bioensayos para rastrear los cambios en la toxicidad que las manipulaciones generan. Las características fisicoquímicas de los constituyentes que son responsables de la toxicidad son indicadas por la comparación resultados de los bioensayos aplicados antes y después de las manipulaciones. TIE propone manipulaciones que afectan la disponibilidad biológica o extraen grupos de tóxicos, tales como orgánicos no polares, metales complejables, oxidantes, sustancias degradables, volátiles, filtrables. Así provee evidencia de las características de grupos químicos que son responsables de parte de la respuesta tóxica local. (Botts et al., 1989; Carr et al., 2001;

Deng et al., 2017; Hutchings et al., 2004; Maya et al., 2018; Pessala et al., 2004; Smital et al., 2011)

En sus estudios aplicando TIE en aguas residuales de origen doméstico, Bolts (1998) señaló a los compuestos orgánicos polares como los responsables del mayor aporte a la toxicidad. En menor medida, se asoció toxicidad con compuestos orgánicos volátiles, amoníaco, y compuestos orgánicos polares. Este caso representa uno de los primeros casos históricos de programa de manejo de la toxicidad en una planta de tratamiento de ELUs.

En función de los antecedentes señalados y la disponibilidad de equipamiento e infraestructura de nuestro instituto, para éste trabajo de tesis se seleccionaron como organismos de pruebas a *D. magna*, *H. plagiodesmica* y *T. aestivum* para aplicar una adaptación del método TIE a efluentes líquidos. Esta batería de bioensayos incluye organismos de diversos grupos taxonómicos y con nichos muy diferentes. *D. magna* es ampliamente utilizado a nivel mundial y también existe abundantes referencias de ensayos biológicos con *T. aestivum*, sin embargo, son escasos los registros para *H. plagiodesmica*, un *cnidario* dulceacuícola de la región pampeana. La propuesta de organismos alternativos para los bioensayos normalmente se enfrenta a impedimentos asociados a la falta de información biológica para interpretar las respuestas tóxicas observadas y a dificultades para el mantenimiento de organismos de ensayo. Sin embargo, es necesario proponer especies alternativas, que proporcionen información adecuada y sencilla de interpretar, acordes a las condiciones ambientales locales. Para el caso de *H. plagiodesmica* hay reportes de que responde positivamente a las condiciones de cultivo y ensayo desarrolladas para *H. attenuata* (Bulus Rossini et al., 2005).

1.3. SITUACIÓN EN LA PAMPA

A continuación, se describe la situación en la provincia de La Pampa respecto a los ELUs y los ELTs.

ELUs: En los años 90 se comenzó con el tendido de redes de desagüe para los ELUs y construcción de plantas de tratamiento en la Provincia de la Pampa. Así, 15 localidades poseen red cloacal y existen 12 plantas de tratamiento de ELUs, la mayoría de ellas consisten en sistemas de tipo lagunar. Estos sistemas están formados por un conjunto de cuencos independientes, en los que se opera de forma de aeróbica, anaeróbica y facultativa. En algunas localidades el sistema funciona con únicamente una o dos lagunas. En particular para la ciudad de Santa Rosa el sistema consta de dos plantas de tratamiento independientes.

Otros sistemas utilizados son los filtros fitoterrestres (carrizales) y una planta compacta constituida por un tanque ecualizador, una zona de clarificación, y un laberinto de cloración previo a una laguna de estabilización final.

A partir del año 2005 se implementó un plan de monitoreo provincial, a cargo de la Administración Provincial del Agua, que cubrió todas las plantas activas. Los parámetros seleccionados para el control del funcionamiento fueron DBO₅, DQO, SSe, y número de colonias de coliformes (Muñoz et al., 2007).

Para el caso de las plantas de tratamiento por sistemas lagunares (Toay, Macachín, General Acha, Alpachiri, Santa Rosa, General Pico e Intendente Alvear) los resultados mostraron para los líquidos previos al tratamiento DBO₅ bajas con valores dentro del rango 300-350 mg/L y una DQO media de 450 mg/L y, para los casos de las localidades de Alpachiri y Macachín, se observaron máximos que alcanzaron los 1000 y 1800 mg/L respectivamente. La eficiencia de los tratamientos fue baja y, en la mayoría de las determinaciones realizadas sobre los ELUs tratados, los niveles superaron los límites establecidos por la normativa provincial (Decreto Reglamentario N° 2793/06 de la Ley 1194- Pcia de La Pampa).

La situación para las localidades con tratamiento por filtro fitoterrestre (Uriburu, Eduardo Castex y Quemú Quemú) fue similar, con picos de DQO y DBO₅ que evidencian una posible inyección al sistema de líquidos no domiciliarios. La remoción de la DQO fue del orden del 20 al 68%, y no fue suficiente para alcanzar los niveles de referencia.

En términos generales los líquidos crudos presentaros niveles bajos para los parámetros evaluados, pero los sistemas de tratamiento presentaron eficiencias tan bajas que los parámetros de vertido al menos duplican los valores máximos permitidos. También en los estudios realizados por Pratts (2011) sobre los canales de descargar se evidencia que las plantas de tratamiento de la ciudad de Santa Rosa no funcionan de manera óptima.

Entre los problemas detectados por Muñoz et al (2007) se encuentra: i) distorsión entre la dimensión de los sistemas diseñados y el volumen de líquidos recibidos, lo que afecta los tiempos de residencia por sobre o sub dimensionamiento; falta general de mantenimiento asociada a falta de recursos económicos y falta de capacitación del personal.

En particular para la localidad de Santa Rosa la problemática derivada del tratamiento de las aguas residuales es de relevancia debido a que la ciudad cuenta con un abastecimiento de agua potable dual: agua subterránea de perforaciones y agua superficial del Río Colorado.

Actualmente no se cuenta con antecedentes de estudios de contenidos de compuestos prioritarios ni datos acerca de la toxicidad, sólo determinación de las concentraciones de metales pesados de interés (Pratts, 2011) en los canales de descarga de las plantas de tratamiento de Santa Rosa.

ELTs: La provincia de la Pampa participa en forma minoritaria en la producción láctea nacional. La actividad láctea se distribuye en tres cuencas, que se diferencian por las características agroecológicas de las zonas que definen la forma de producción de los tambos, especialmente por la alimentación. La cuenca de mayor relevancia es la Sur, esta cuenca es la que ha presentado el mayor crecimiento en los últimos años, tanto en número de tambos, como en número de animales y productividad. Para el año 2016, la Provincia de La Pampa contaba con casi 30000 animales de ordeño, considerando los 186 tambos ovinos y bovinos (Gobierno de La Pampa, 2017)

Como ocurre a nivel nacional, también en La Pampa, el desarrollo de la producción ovina lechera está en manos de pequeños y medianos productores. Varios de los establecimientos son tambos-fábricas donde se elaboran productos derivados de la leche (Buseti and Suárez, 2008).

La Estación Experimental Agropecuaria INTA Anguil (La Pampa) posee un rodeo de la raza PampInta, para producción de leche, con más de 300 madres, de las cuales aproximadamente 150 entran en ordeño al año. Para estos fines, la EEA instaló un tambo experimental. Los efluentes generados son almacenados en una laguna sin realizarse ningún tratamiento. Debido a que no se cuenta con antecedentes de estudios locales se seleccionó éste tambo como sitio de estudio.

1.4 OBJETIVOS

En función de los antecedentes planteados y la situación descrita para La Pampa, se plantearon los siguientes objetivos:

Capítulo 3- i) Generar información acerca de la toxicidad combinada de los dos fármacos más detectados en ELUs: ibuprofeno y acetaminofeno

ii) Generar información toxicológica para el enantiómero S-IBP.

Capítulo 4- i) Caracterizar toxicológicamente los ELUs de un sector de Santa Rosa, La Pampa, Argentina-

ii) Identificar fracciones que aportan a la toxicidad global.

iii) Indagar acerca de las relaciones entre parámetros fisicoquímicos y toxicidades de las muestras y de las submuestras manipuladas.

Capítulo 5- i) Caracterizar toxicológicamente los ELTs de un tambo de La Pampa, Argentina.

- ii) Identificar las fracciones que aportan a la toxicidad global del ELT.
- iii) Indagar acerca de las relaciones entre parámetros fisicoquímicos y toxicidades en los ELTs y de las submuestras manipuladas.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, S., Munoz, M., De La Torre, A., Roset, A.J., De La Peña, E., Carballo, M., Muñoz, M.J., De La Torre, A., Roset, J., De La Peña, E., Carballo, M., 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci. Total Environ.* 328, 69–81. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.02.013
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330. doi:10.1016/S0045-6535(02)00769-5
- Andriulo, A., Sasal, C., C., A., Rimatori, F., 2003. Impacto de un sistema intensivo de producción de carne vacuna sobre algunas propiedades del suelo y del agua. *Rev. Investig. Agropecu.* 32, 27–56.
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K. V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167–184. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.04.062
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525–539. doi:10.1016/j.procbio.2005.09.017
- Babín, M.M., García, P., Fernández, C., Alonso, C., Carbonell, G., Tarazona, J. V., 2001. Toxicological characterisation of sludge from sewage treatment plants using toxicity identification evaluation protocols based on in vitro toxicity tests. *Toxicol. Vit.* 15, 519–524. doi:10.1016/S0887-2333(01)00057-1
- Badino, O., Schmidt, E., Ramos, E., Herrero, M.A., Weidmann, R., Giraudo, F., 2015. Uso del agua, manejo de efluentes y residuos en tambos del noreste de la provincia de Santa Fé (Argentina). *Rev. FAVE - Ciencias Agrar.* 14, 7–16.
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008a. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* 402, 201–216. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.021
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008b. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* 402, 192–200. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.04.028
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.E., Park, H.S., 2011. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.015
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195–204. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.012
- Botts, J.A., Braswell, J.W., Goodfellow, W.L., 1989. Toxicity Reduction Evaluation Protocol for Municipal Wastewater Treatment Plants.
- Bound, J.P., Voulvoulis, N., 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Res.* 40, 2885–2892. doi:10.1016/j.watres.2006.05.036
- Boxall, A., Fogg, L., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E., Croxford, A., 2004. Review of Veterinary medicines in the environment: Technical report. *Environ. Contam. Toxicol.* 180,

- 1–91.
- Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S., 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 311, 135–149. doi:10.1016/S0048-9697(03)00138-4
- Brião, V.B., Tavares, C.R.G., 2007. Effluent generation by the dairy industry: Preventive attitudes and opportunities. *Brazilian J. Chem. Eng.* 24, 487–497. doi:10.1590/S0104-66322007000400003
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. doi:10.1016/S0378-4274(03)00066-3
- Brown, K.D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T.H., Mawhinney, D.B., 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* 366, 772–783. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.10.007
- Bulus Rossini, G., Taborda, V., Peluso, L., Larran, G., Ronco, A., 2005. Efectos letales y subletales del Cu (II) sobre *Hydra pladiodésmica* (hydroydea: hydridae). Congreso: VI Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental y XIV Congreso Argentino de Toxicología.
- Burnes, B., 2003. Antibiotic resistance analysis of fecal coliforms to determine fecal pollution sources in a mixed-use watershed. *Environ. Monit. Assess.* 85, 97–108.
- Buser, H.R., Poiger, T., Müller, M.D., 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3449–3456. doi:10.1021/es980301x
- Buser, H.R., Poiger, T., Müller, M.D., Müller, M.D., 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2529–2535. doi:10.1021/es981014w
- Busetti, M., Suárez, V., 2008. Situación actual de los tambos en Argentina. *INTA* 6.
- Cappellini, O.R., 2011. Dairy development in Argentina, *Fao*.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llombart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926. doi:10.1016/j.watres.2004.03.029
- Carr, R.S., Nipper, M., Biedenbach, J.M., Hooten, R.L., Miller, K., Saepoff, S., 2001. Sediment toxicity identification evaluation (TIE) studies at marine sites suspected of ordnance contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 298–307. doi:10.1007/s002440010252
- Castillo Morales, G. (Ed.), 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Delgado, P., Parra-Saldívar, R., 2018. A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index. *J. Clean. Prod.* 183, 1184–1196. doi:10.1016/j.jclepro.2018.02.124
- Chipasa, K., 2003. Accumulation and fate of selected heavy metals in a biological wastewater treatment system. *Waste Manag* 23, 135–145.
- Chung, B.Y., Song, C.H., Park, B.J., Cho, J.Y., 2011. Heavy Metals in Brown Rice (*Oryza sativa* L.) and Soil After Long-Term Irrigation of Wastewater Discharged from Domestic Sewage Treatment Plants. *Pedosphere* 21, 621–627. doi:10.1016/S1002-0160(11)60164-1
- Clara, M., Gans, O., Windhofer, G., Krenn, U., Hartl, W., Braun, K., Scharf, S., Scheffknecht, C., 2011. Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment. *Chemosphere* 82, 1116–1123. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.041
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* 39, 4797–4807.

- doi:10.1016/j.watres.2005.09.015
- Cortacans, J., Hernández Lehmann, A., Del Castillo, I., Montes, E., Hernández Muñoz, A., 2007. Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación. *Inst. Tecnológico Chetumal* 1–13.
- Dalzell, D.J.B., Alte, S., Aspichueta, E., de la Sota, A., Etxebarria, J., Gutierrez, M., Hoffmann, C.C., Sales, D., Obst, U., Christofi, N., 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assesment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47, 535–545.
- Davis, J., Truman, C., Kim, S., Ascough, J., Carlson, K., Davis, J., Truman, C., Kim, S., Ascough, J., Carlson, K., 2006. Antibiotic transport via run off and soil loss. *J. Environ. Qual.* 35, 2250–2260.
- Deng, M., Zhang, Y., Quan, X., Na, C., Chen, S., Liu, W., Han, S., Masunaga, S., 2017. Acute toxicity reduction and toxicity identification in pigment-contaminated wastewater during anaerobic-anoxic-oxic (A/A/O) treatment process. *Chemosphere* 168, 1285–1292. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.144
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., Silvana, G., 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 380–391. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.10.002
- Diez, M., 2014. Respuesta del maíz a la aplicación de efluentes de tambos en entisoles y molisoles de la planicie medanosa. *FCEyN-UNLPam*.
- Diez, M., 2012. Efluentes de tambo, mucho más que residuos. *Sitio Argentino Prod. Anim.* 20, 1–4.
- Drozdova, J., Raclavska, H., Skrobankova, H., 2015. A survey of heavy metals in municipal wastewater in combined sewer systems during wet and dry weather periods. *Urban Water J.* 12, 131–144. doi:10.1080/1573062X.2013.831913
- Farré, M., Barceló, D., 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22, 299–310. doi:10.1016/S0165-9936(03)00504-1
- Farre, M., Kloter, G., Petrovic, M., Alonso, M.C., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2002. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal. Chim. Acta* 456, 19–30. doi:10.1016/S0003-2670(01)00908-4
- Farré, M., Martínez, E., Barceló, D., 2007. Validation of interlaboratory studies on toxicity in water samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 283–292. doi:10.1016/j.trac.2006.10.009
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Fernandez Cirelli, A., Ojeda, C., 2008. Wastewater management in Greater Buenos Aires, Argentina. *Desalination* 218, 52–61. doi:10.1016/j.desal.2006.10.040
- Fram, M.S., Belitz, K., 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci. Total Environ.* 409, 3409–3417. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.053
- Galvín, R.M., 2016. Contaminantes emergentes y metales pesados en aguas residuales : un caso de estudio 68–75.
- Gambaudo, S., Imhoff, S., Carrizo, M.E., Marzetti, M., Racca, S., 2014. Uso de efluentes líquidos de tambo para mejorar la productividad de cultivos anuales y la fertilidad del suelo. *Cienc. del Suelo* 32, 197–208.
- García-Reyero, N., Lavelle, C.M., Escalon, B.L., Martinović, D., Kroll, K.J., Sorensen, P.W., Denslow, N.D., 2011. Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 101, 38–48. doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.014
- Gheorghe, S., Petre, J., Lucaciu, I., Stoica, C., Nita-Lazar, M., 2016. Risk screening of pharmaceutical compounds in Romanian aquatic environment. *Environ. Monit. Assess.* 188. doi:10.1007/s10661-016-5375-3
- Gobierno de La Pampa, 2017. Anuario Estadístico de La Pampa.

- Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66, 993–1002. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.051
- Gutiérrez, M.S., Cabrera, M.N., Benítez, A., Gutiérrez, A., 2008. Manual para el manejo de Efluentes de Tambo, 1ra edició. ed. Proyecto Producción Responsable - M.G.A.P, Montevideo, Uruguay.
- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H.C., S.E., J., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. *Chemosphere* 36, 357–393. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., 2005. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 861–868. doi:10.1897/04-182R.1
- Han, G.H., Hur, H.G., Kim, S.D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 263–271. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.013
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17.
- Hernando, M.D., Heath, E., Petrovic, M., Barceló, D., 2006a. Trace-level determination of pharmaceuticals residues by LC–MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Anal. Bioanal. Chem.* 385 985–991.
- Herrero, M.A., Gil, S.B., 2008. Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Sección Espec. Ecol. Austral Diciembre* 18, 273–289. doi:http://www.scielo.org.ar/pdf/ecoaus/v18n3/v18n3a03.pdf
- Hutchings, M., Johnson, I., Hayes, E., Girling, A.E., Thain, J., Thomas, K., Benstead, R., Whale, G., Wordon, J., Maddox, R., Chown, P., 2004. Toxicity reduction evaluation, toxicity identification evaluation and toxicity tracking in direct toxicity assessment. *Ecotoxicology* 13, 475–484. doi:10.1023/B:ECTX.0000035297.90620.73
- Imhoff, S., Carrizo, M.E., Martel, R., Lotto, V., Zen, O., 2014. Efluentes líquidos de tambo: Efectos de su aplicación sobre las propiedades físicas de un argiudol. *Cienc. del Suelo* 32, 177–187.
- Imhoff, S., Ghiberto, P., Carrizo, M.E., Charlón, V., Zen, O., Gambaudo, S., 2008. Uso alternativo de efluentes de tambo para disminuir el impacto ambiental 153–164.
- Jjemba, P., 2003. The potencial impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93: 267-27.
- Jux, U., Baginski, R.M., Arnold, H.-G., Krönke, M., Seng, P.N., 2002. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205, 393–398. doi:10.1078/1438-4639-00166
- Karvelas, M., Katsoyiannis, A., Samara, C., 2003. Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. *Chemosphere* 53, 1201–1210. doi:10.1016/S0045-6535(03)00591-5
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. *J. Hazard. Mater.* 141, 614–621. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.038
- Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A., 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51, 69–75. doi:10.1016/S0045-6535(02)00819-6
- Kümmerer, K., 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311–320.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the

- Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J. Hydrol.* 358, 112–123. doi:10.1016/j.jhydrol.2008.05.030
- Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L., 2007. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1139, 45–52. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.068
- Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L., 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1094 122–129.
- Liberti, L., Limoni, N., Longobardi, C., Lopez, A., Passino, R., Kang, S.J., Horvatin, P.J., 1988. Field demonstrations of the rim-nut process for nutrients recovery from municipal wastewater. *Nucl. Chem. Waste Manag.* 8, 83–86. doi:10.1016/0191-815X(88)90011-3
- Lin, A.Y.C., Yu, T.H., Lateef, S.K., 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J. Hazard. Mater.* 167, 1163–1169. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.108
- Lin, A.Y.C., Yu, T.H., Lin, C.F., 2008. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 74, 131–141. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.08.027
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2005. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Res.* 39, 2219–2228.
- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P., 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 367, 544–558. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.03.021
- Mansourri, G., Madani, M., 2016. Examination of the Level of Heavy Metals in Wastewater of Bandar Abbas Wastewater Treatment Plant. *Open J. Ecol.* 06, 55–61. doi:10.4236/oje.2016.62006
- Manusadzianas, L., Balkelyte, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Pöllumaa, L., Kahru, A., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: Selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat. Toxicol.* 63, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(02)00132-7
- Maya, N., Evans, J., Nasuhoglu, D., Isazadeh, S., Yargeau, V., Metcalfe, C.D., 2018. Evaluation of wastewater treatment by ozonation for reducing the toxicity of contaminants of emerging concern to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 274–284. doi:10.1002/etc.3952
- Metcalfe, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R., 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2872–2880.
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants-conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 157, 1721–1726. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.045
- Mishra, S., Barik, S.K., Ayyappan, S., Mohapatra, B.C., 2000. Fish bioassays for evaluation of raw and bioremediated dairy effluent. *Bioresour. Technol.* 72, 213–218. doi:10.1016/S0960-8524(99)00124-8
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803–814. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008
- Muñoz, M.Á., Buitrón, E.B., de Ormaechea, J.A., 2007. Eficiencia En Los Sistemas De Tratamiento De Líquidos Cloacales En La Provincia De La Pampa, II Congreso Pampeano del Agua.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H., 2006. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during

- activated sludge treatment. *Water Res.* 40, 3297–3303.
- Nosetti, L., Herrero, M.A., Pol, M., Maldonado May, V., Iramain, M.S., Flores, M., 2002. Cuantificación y caracterización de agua y efluentes en establecimientos lecheros I. Demanda de agua y manejo de efluentes 1. *In Vet - Investig. y Vet.* 4, 37–43. doi:1514-6634
- Oberholster, P.J., Botha, A.M., Cloete, T.E., 2008. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. *Environ. Pollut.* 156, 184–192. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.028
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A.M., Poulsen, V., Jourdain, M.J., Féraud, J.F., Grand, C., Bispo, A., 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.* 363, 114–125. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.12.016
- Pérez Díaz, J.P., Peña Cervantes, E., López Cervantes, R., Hernández Torres, I.M., 2016. Metales pesados y calidad agronómica del agua residual tratada. *Idesia (Arica)* 34, 19–25. doi:10.4067/s0718-34292016000100003
- Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A., Herve, S., 2004. Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 263–272. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.10.002
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal. Chem.* 22, 685–696. doi:10.1016/S0165-9936(03)01105-1
- Pratts, P., 2011. Evaluación del Impacto Antrópico sobre la Dinámica e Hidroquímica de la Laguna del Bajo Giuliani, Santa Rosa, La Pampa (Tesis de Maestría). UNLPam.
- Principi, P., Villa, F., Bernasconi, M., Zanardini, E., 2006. Metal toxicity in municipal wastewater activated sludge investigated by multivariate analysis and in situ hybridization. *Water Res.* 40, 99–106. doi:10.1016/j.watres.2005.10.028
- Quintana, J.B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39, 2654–2664. doi:10.1016/j.watres.2005.04.068
- Raghunath, B. V, Punnagaiarasi, A., Rajarajan, G., Irshad, A., Elango, A., Mahesh, G., 2016. Integrated Waste Management in India. doi:10.1007/978-3-319-27228-3
- Ren, S., 2004. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: Recent research and developments. *Environ. Int.* 30, 1151–1164. doi:10.1016/j.envint.2004.06.003
- Rezapour, S., Atashpaz, B., Moghaddam, S.S., Damalas, C.A., 2019. Heavy metal bioavailability and accumulation in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) irrigated with treated wastewater in calcareous soils. *Sci. Total Environ.* 656, 261–269. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.288
- Roberts, P.H., Thomas, K. V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 356, 143–153. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.04.031
- Roche, K.F., 1998. Growth potential of *Daphnia magna* Straus in the water of dairy waste stabilization ponds. *Water Res.* 32, 1325–1328. doi:10.1016/S0043-1354(97)00272-8
- Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2007. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ. Int.* 33, 596–601. doi:10.1016/j.envint.2006.09.014
- Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E., 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J. Hazard. Mater.* 164, 1509–1516. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.073
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Sim, W.J., Lee, J.W., Oh, J.E., 2010. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environ. Pollut.* 158, 1938–1947. doi:10.1016/j.envpol.2009.10.036

- Sivrioğlu, Ö., Yonar, T., 2015. Determination of the acute toxicities of physicochemical pretreatment and advanced oxidation processes applied to dairy effluents on activated sludge. *J. Dairy Sci.* 98, 2337–2344. doi:10.3168/jds.2014-8278
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K.E., Thomas, K. V., Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 844–851. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.010
- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.* 39, 1761–1772. doi:10.1016/j.watres.2005.03.003
- Taverna, M., Charlón, V., Panigatti, C., Castillo, A., Serrano, P., Giordano, J., 2004. Manejo de los residuos originados en las instalaciones de ordeño. (Ed.).
- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina Díaz, A., Fernández Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.* 408, 3584–3595. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.041
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260. doi:10.1016/S0043-1354(98)00099-2
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, F., Jovančić, P., Jabučar, D., 2008. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Sci. Total Environ.* 399, 66–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.003
- Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 493–499.
- Thomas, P.M., Foster, G.D., 2004. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, caffeine, and triclosan in wastewater by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. A* 39, 1969–1978.
- U.S. EPA, 1993. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. US EPA.
- U.S. EPA, 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase Toxicity Characterization Procedures. US EPA.
- Üstün, G.E., 2009. Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 172, 833–838. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.073
- Verenitch, S.S., Lowe, C.J., Mazumder, A., 2006. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1116, 193–203.
- Wong, J.W., Li, K., Fang, M., Su, D.C., 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environ. Int.* 27, 373–380. doi:10.1016/S0160-4120(01)00088-5
- Wu, S., Zhang, L., Chen, J., 2012. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 875–884. doi:10.1007/s00253-012-4414-4

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

En este capítulo se detallan los materiales y métodos generales aplicados en los capítulos 3,4 y 5.

2.1. BATERÍA DE BIOENSAYOS

En el año 2012 se instaló en la provincia de La Pampa una batería de bioensayos compuesta por *Daphnia magna*, *Hydra plagiodesmica* y semillas *Triticum estivum* como organismos de prueba. Durante el 2013 se realizó la puesta a punto de los ensayos, luego de la adaptación y estabilización de los cultivos y la implementación de las correspondientes cartas de control, para luego iniciar con la evaluación de toxicidad de muestras ambientales.

Se detallan las metodologías aplicadas en cada caso.

Bioensayo de toxicidad aguda con *D. magna* (48 h)

Daphnia magna es un crustáceo planctónico del orden *Cladocera*. Es uno de los organismos más utilizado en ensayos ecotoxicológicos debido a su cultivo sencillo, su ciclo de vida corto y su reproducción partenogenética que garantiza la homogeneidad de los cultivos. *D. magna* representa en estudios los ecotoxicológicos de manera ideal al zooplancton y ha sido ampliamente utilizada como especie indicadora a nivel global.

El cultivo de *D. magna* se realizó bajo protocolos estandarizados (G. Castillo Morales, 2004; US-EPA, 1996a). Los cultivos se mantuvieron en recipientes de 3 litros con una densidad media de 10 individuos por litro. Los organismos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en agua dura reconstituida a 21 ± 2 °C. El medio de cría contenía 124 mg/L de MgSO₄, 8,2 mg/L de KCl, 198 mg/L de NaCO₃H y 48 mg/L de CaSO₄. El pH se estabilizó en $7,6 \pm 0,4$, y el medio se mantuvo bajo aireación constante hasta su uso. Todos los medios de cultivo fueron controlados, previo a su utilización, para asegurar que no se afectara la supervivencia de los organismos.

Como tareas generales, se retiraron a diario los neonatos, ya sea que fueran a destinarse a ensayos o solo para eliminarse con el fin de mantener la densidad de cultivo prevista. Se

acompañó esta tarea con la limpieza de los recipientes, remoción de mudas y restos de alimento del fondo. Finalmente se realiza la renovación de medio con aproximadamente 1/3 del medio fresco recientemente aireado y controlado, para luego proceder a la alimentación. Para la alimentación de los cultivos se emplearon cultivos algales de *Chlorella sp.*

Dependiendo las condiciones y volúmenes de cultivo, estas actividades se realizaron con diferente periodicidad.

El día previo a realizar ensayos se extraían los neonatos presentes en el cultivo. De esta forma se puede garantizar que los neonatos encontrados al día siguiente, y que serán utilizados en los ensayos, cumplieran con el requerimiento de tener menos de 24 horas de vida.

La sensibilidad de los cultivos se controló mensualmente con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia. El resultado del ensayo se contrastó con la $LC_{50} \pm 2\sigma$ obtenida de la carta de control *D. magna*- $K_2Cr_2O_7$ -48 horas que se realizó en la etapa de instalación de los cultivos (G. Castillo Morales, 2004).

El ensayo de toxicidad con *D. magna* consiste en la exposición de neonatos (<24 horas) a diferentes concentraciones de la muestra o tóxico durante un periodo de 48 horas. Las muestras a ensayar se diluyen en medio de cultivo. Las pruebas se efectuaron, en general, en cinco diluciones/concentraciones más un control negativo (medio de cría utilizado como medio de dilución). Los ensayos se realizan por triplicado, en tubos de ensayo con un volumen de 20 mL. Se utilizaron 5 a 10 neonatos (<24 horas) por réplica y se mantuvieron bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura durante 48 horas. Se registró el número de organismos inmóviles (considerados muertos) a las 24 y 48 horas. Se descartaron los ensayos que presentaron una mortalidad superior al 10% en los controles negativos (blancos).

Una vez finalizado el ensayo se estimó CE_{50} o la CE_x mediante el método Probit

Bioensayo de toxicidad aguda con *H. plagiodesmica* (96 h)

Las hidras (Filo *Cnidaria*, Clase *Hidrozoa*) son organismos sésiles que habitan en cuerpos de agua dulce. Miden unos pocos milímetros y son depredadores, capturando presas pequeñas utilizando tentáculos con células urticantes (cnidocitos). Son hermafroditas y tienen una alta tasa de reproducción asexual (gemación). La clorohidra *H. plagiodesmica* aloja células de la clorofita *Chlorella sp.* y habita cuerpos de agua de la región pampeana y, por esta razón, fue reciente incluida como organismo de prueba regional (Bulus Rossini et al., 2005; Demetrio et al., 2009). Su cultivo se realizó bajo protocolos estandarizados elaborados para *H. attenuata* (G. Castillo Morales, 2004; Trottier et al., 1997). Consistente con el hecho que ambas especies pertenecen al

mismo género, *H. plagiodesmica* respondió bien a los métodos de cultivo estandarizados para *H. attenuata*, lo que es acorde con los estudios previos de Bulus Rossini (2005) y Demetrio et al. (2009),.

Los organismos se mantuvieron en medio preparado con 147 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9,8 mg/L NaHCO_3 y 4 mg/L de EDTA, ajustando el pH a $7,0 \pm 0,1$. Este mismo medio, pero sin agregado de EDTA, se utilizó como medio de dilución para los ensayos.

Los cultivos se mantuvieron en recipientes de vidrio de aproximadamente 20 cm de diámetro con 3 cm de medio. Se los mantuvo a 20 ± 2 °C, bajo una intensidad lumínica de 800 lux y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Los cultivos se alimentaron tres o cuatro veces a la semana con nauplios recién eclosionados de *Artemia sp.*, y se realizó limpieza y cambio de medio cuatro a cinco horas posterior a la alimentación. El cultivo de *Artemia sp.* se realizó siguiendo los lineamientos de Castillo Morales (2004)

La sensibilidad de los cultivos se controló mensualmente con dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) como tóxico de referencia. El resultado del ensayo se contrastó con la $\text{LC}_{50} \pm 2\sigma$ obtenida de la carta de control *H. plagiodesmica*- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -96 horas, que se realizó en la etapa de instalación de los cultivos (G. Castillo Morales, 2004)

Los ensayos se realizan en placas multipocillo, sobre una serie de diluciones/concentraciones, un control positivo (con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ como tóxico de referencia) y un control negativo (con medio de cultivo sin EDTA). Para las pruebas se utilizaron organismos con 24 horas de ayuno y que presentaban un único hidrante. El volumen de ensayo fue de 3 mL, y se trabajó por triplicado con 3 hidras por replica. El tiempo de exposición fue de 96 horas y, finalizado ese periodo, se evaluó la presencia de cambios morfológicos letales y subletales en cada individuo. Para la evaluación de los cambios se aplicó la escala de Trottier et al (1997)



Figura 2.1: Diferentes estadios morfológicos. Modificado de Trottier *et al.* (1997)

Con los datos obtenidos de presencia de cambios letales se estimó la CL_{50} y para presencia de cambios subletales la CE_{50} . Ambos puntos finales se determinaron mediante el método Probit.

Bioensayo de toxicidad aguda: crecimiento de semillas de *Triticum aestivum* (120 h)

El bioensayo de toxicidad con semillas es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) que se utiliza para evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y/o en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotíleo. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotíleo se constituye como un indicador subletal muy representativo en la evaluación de efectos biológicos, útil para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

Los ensayos se realizaron mediante la adaptación del ensayo estandarizado de toxicidad aguda para semillas de *L. sativa* (G. Castillo Morales, 2004; US-EPA, 1996b) La sensibilidad de las semillas se controló mensualmente con sulfato de zinc como tóxico de referencia. El resultado del ensayo se contrastó con la $CI_{50} \pm 2\sigma$ obtenida de la carta de control *T. aestivum*- SO_4Zn -120 horas que se realizó en la etapa de instalación de los cultivos (G. Castillo Morales, 2004)

Los ensayos se efectuaron sobre papel de filtro en placas de Petri por triplicado, con 10 semillas por placa. Como medio de dilución se utilizó agua dura reconstituida (G. Castillo Morales, 2004). Las placas se mantuvieron protegidas de la luz por un periodo de 120 horas. Se evaluó la elongación de hipocotíleo y radícula, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento respecto del blanco y la CI_{50} .

Unidades Tóxicas:

El concepto de unidades tóxicas (UT) es útil durante la aplicación de una evaluación integral de la toxicidad. Las UT del efluente global se calcularon según la expresión:

$$UT_i = \frac{100\%}{CL_{50i} \text{ o } CE_{50i}}$$

2.2. TOXICIDAD DE MEZCLAS BINARIAS:

Se consideraron los modelos acción independiente (AI) y adición de concentraciones (AC) de acuerdo a las siguientes formulas (Escher and Leusch, 2012):

$$\text{Para AI} \rightarrow EFC1+C2 \text{ (AI)} = EFC1 + EFC2 - (EFC1 \times EFC2)$$

Donde:

$EFC1+C2$ (AI) es efectos de la mezcla de los componentes C1 y C2 con AI
 $EFCx$ es el efecto individual del componente x.

$$\text{Para AC} \rightarrow 1 = \sum_{i=1}^n Ci/CExi$$

Donde:

C_i es concentración de un componente en la mezcla.

C_{Exi} es concentración del componente simple que podría causar individualmente el mismo efecto x que se observa en la mezcla.

Junto con la CE₅₀, se calcularon las CE₁₀, CE₂₅ y CE₇₅. Una vez establecidas las C_{Ex} para los compuestos de interés, se estudió la toxicidad de las combinaciones binarias utilizando las C_{Ex}/2. Para cada mezcla ensayada también se estimó el efecto de las concentraciones individuales (C_{Ex}/2) y de la mezcla si ésta presentara únicamente mecanismos de AI.

2.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE AGUAS RESIDUALES:

Los sitios de muestreo se describen en cada unidad. En forma genérica, las muestras fueron tomadas en envases de polipropileno y se conservaron a 4° C hasta su utilización y sin agregado de conservantes. Cuando por razones operativas fue necesario postergar alguna determinación las muestras se mantuvieron a -10° C.

Se realizaron las siguientes determinaciones:

Sólidos sedimentables (S_{Se}): Se denomina S_{Se} al material que se desprende de la suspensión en un período determinado.

Procedimiento: Se completó un cono de Imhoff con muestra homogeneizada hasta la marca de 1000 mL y se dejó sedimentar. Se leyó el volumen del sedimento a los 10, 120 minutos y 24 horas (APHA, 1998). El resultado se expresó en mL de S_{Se}/L de muestra en el tiempo.

Sólidos totales a 103 – 105°C (ST): Son los residuos resultantes luego de evaporar y secar una muestra en estufa a 103 – 105°C.

Procedimiento: Se calentó una placa de evaporación limpia a 103 – 105°C y se conservó en desecador hasta el momento de uso. Antes de utilizarla se registró su peso. A continuación, se midieron 100 mL de muestra, se los colocó en la placa y se dejó evaporar en una estufa a 103 – 105°C hasta peso constante. Se guardó la placa en un desecador para enfriar y luego se pesó. Se determinó el contenido de ST por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{ST(mg)}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}}$$

donde:

A= peso del residuo seco + placa (mg)

B = peso de la placa (mg)

Sólidos suspendidos totales (SST): Son los materiales retenidos por un filtro estándar de fibra de vidrio (1 µm), secado a 103 – 105°C.

Procedimiento: Se secaron los filtros de fibra de vidrio en estufa a 103 – 105°C durante una hora, se dejaron enfriar en desecador y se pesaron al momento de ser utilizados.

Se filtraron 100 mL de muestra mediante vacío, luego se colocaron los filtros utilizados en una placa y se los secó hasta peso constante a 103 – 105°C. Se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron (APHA, 1998).

Los SST se calcularon con la siguiente relación:

$$\frac{\text{mg de SST}}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}}$$

donde:

A = peso del filtro + residuo seco (mg)

B = peso del filtro (mg)

Sólidos Suspendidos Fijos (SSF): Son los materiales retenidos por un filtro estándar de fibra de vidrio (1 µm) que permanecen luego de un secado a 550°C.

Procedimiento: se trabajó sobre las muestras de la determinación de SST, se llevó a calcinar los crisoles a una mufla a 550°C. Al retirar, se guardó la placa en un desecador para enfriar y luego se pesó. Los SSF se calcularon con la siguiente fórmula

$$\frac{\text{mg de SSF}}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}}$$

donde:

A = peso del filtro + residuo seco (mg) después de la calcinación

B = peso del filtro (mg)

Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV): Son los materiales retenidos por un filtro estándar de fibra de vidrio (1 µm), que volatilizan al secar la muestra a 550°C.

Procedimiento: Se determinó con los pesajes realizados durante la determinación de SSF mediante la siguiente relación:

$$\frac{\text{mg de SSV}}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}}$$

donde:

A = peso del filtro + residuo seco (mg) antes de la calcinación

B = peso del filtro + residuo seco (mg) después de la calcinación

Sólidos Disueltos Totales (SDT): Son los residuos resultantes luego de evaporar y secar, en estufa a 103 – 105°C, una muestra filtrada con un filtro estándar de fibra de vidrio (1 µm).

Procedimiento: Se calentó una placa de evaporación limpia a 103 – 105°C y se conservó en desecador hasta el momento de uso. Antes de utilizarla se registró su peso. A continuación, se midieron 100 mL de muestra, se filtró mediante vacío, se los colocó en la placa y se dejó evaporar en una estufa a 103 – 105°C hasta peso constante. Se guardó la placa en un desecador para enfriar y luego se pesó (APHA, 1998). Se determinó el contenido de STD por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{STD(mg)}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{volumen\ de\ muestra\ (mL)}$$

donde:

A= peso del residuo seco + placa (mg)

B = peso de la placa (mg)

Sólidos Disueltos Fijos (SDF): Son los residuos resultantes luego de evaporar y secar, en mufla a 550°C, una muestra filtrada con un filtro estándar de fibra de vidrio (1 µm).

Procedimiento: Se tomó las muestras de la determinación de SDT, se llevó a calcinar las placas a una mufla a 550°C. Al retirar, se guardó la placa en un desecador para enfriar y luego se pesó. Los SDF se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\frac{mg\ de\ SDF}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{volumen\ de\ muestra\ (mL)}$$

donde:

A = peso de la placa + residuo seco (mg) después de la calcinación

B = peso de la placa (mg)

Sólidos Disueltos Volátiles (SDV): Son los residuos que volatilizan luego de evaporar y secar, en mufla a 550°C, una muestra filtrada con un filtro estándar de fibra de vidrio (1 µm).

Procedimiento: Se determinó con los pesajes realizados durante la determinación de SDF, mediante la siguiente formula

$$\frac{\text{mg de SDV}}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}}$$

donde:

A = peso de la placa + residuo seco (mg) antes de la calcinación

B = peso de la placa + residuo seco (mg) después de la calcinación

pH: Para su determinación se utilizó un pHmetro Adma, con una precisión de 0,01 unidades de pH.

Demanda Química de Oxígeno (DQO) – Índice de Oxidabilidad

Se selección de método se realizó de acuerdo a la capacidad instalada en los laboratorios de la FCEyN-UNLPam. La determinación se realizó mediante una volumetría por retorno, utilizando KMnO_4 y $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ como reactivos en medio ácido (H_2SO_4). Se debe obtener una coloración rosada persistente en el punto final debida a la actividad del KMnO_4 como autoindicador. De esta forma se mide, en medio ácido, la cantidad de oxígeno utilizado para la reducción del KMnO_4 por la materia orgánica contenida en la muestra.

La determinación de DQO se realizó de acuerdo a métodos normalizados con el siguiente procedimiento: Se prepararon diluciones de cada una de las muestras (en matraces de 100 mL) y se trasvasaron a Erlenmeyer de 250 mL. A cada muestra se le agregaron 5 mL de H_2SO_4 diluido (1:3) y 20 mL de KMnO_4 (0,0125 N). Se colocaron a baño María a 60° C durante 30 minutos y se añadieron 20 mL de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (0,0125 N), lo que debe generar una decoloración completa. Finalmente se valoró el $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en exceso con KMnO_4 (0,0125 N) hasta viraje a rosado débil. La titulación se consideró válida si el gasto de KMnO_4 en la titulación se encuentra entre 2 y 6 mL.

Los resultados se expresan en mg/L de oxígeno consumido según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg}}{L} \text{ oxígeno} = \frac{[(V^1 * N^1) + (V^2 * N^2)] - (V^3 * N^3) * \text{Peq}(\text{mg}) * 1000}{V_m (\text{meq})}$$

donde:

V_1 = volumen del KMnO_4 adicionado a la muestra (mL)

V_2 = volumen del KMnO_4 gastado en la titulación (mL)

V_3 = volumen de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ adicionado a la muestra (mL)

N_1 = normalidad del KMnO_4

N_2 = normalidad del KMnO_4

N_3 = normalidad del $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$

Peq = peso equivalente del O_2

V_M = volumen de muestra (mL)

Dureza

Se define como dureza del agua, a la capacidad que tienen los cationes presentes en una muestra para desplazar a los iones sodio o potasio de los jabones y formar productos insolubles, y se expresa como la concentración de carbonato de calcio que equivale a la concentración total de todos los cationes multivalentes presentes en la muestra.

Procedimiento: Se determinó mediante titulación volumétrica de calcio y magnesio. Se tomaron 50 mL la muestra y se colocaron en un Erlenmeyer, luego se agregó: 1 mL de la solución buffer pH 10,0, para elevar el pH a $10,0 \pm 0,1$ y una punta de espátula de negro de eritocromo T y se agitó hasta lograr un color rojo vinoso uniforme. Finalmente se tituló con una solución de EDTA 0,01 M hasta obtener un color azul. La titulación se consideró válida si el volumen gastado fue menor de 15 mL.

El resultado se expresa en mg de CaCO_3/L y se calcula mediante la siguiente formula:

$$\text{Dureza (mg } \frac{\text{CaCO}_3}{\text{L}}) = \frac{V1 \text{ (mL)} * F * 1000}{V3 \text{ (mL)}}$$

donde:

$V1$ = volumen en ml de EDTA 0,01M gastados en la titulación de la muestra

$V3$ = volumen de la muestra (50 mL)

F = cm^3 de CaCO_3 equivalente a 1,00 cm^3 de EDTA, determinado por titulación con la solución valorada de calcio.

Determinación de metales:

Las determinaciones se realizaron en los laboratorios de la Unidad PlaPiMu-LaSeiSiC-CIC-UNLP. La determinación y cuantificación de metales de interés se realizó por Espectroscopia de Plasma ICP-OES. Las muestras fueron tratadas según las Norma EPA 3051 (US-EPA, 1994) , la cuantificación de los elementos se realizó según Norma EPA 6010 (US-EPA, 2000). Se cuantificó Aluminio (Al), Niquel (Ni), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Manganeso (Mn), Cadmio (Cd), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe) y Arsénico (As).

2.4. TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS SUBMUESTRAS DE EFLUENTES LÍQUIDOS:

A continuación, se describen todas las manipulaciones aplicadas, basadas en los recomendados por US-EPA(1991) en los protocolos para el estudio de la identidad de la toxicidad. No todas las manipulaciones se aplicaron a cada uno de los tipos de efluentes trabajados y los tratamientos aplicados.

Aireación: se airearon 200 mL de efluente con compresor durante 2 horas. Al sistema se le incorporó un filtrado con poro de 0,22 μm . El agua de dilución también fue aireada, en idénticas condiciones, para utilizarla como control. Se les aplicó una aireación moderada. Con la muestra aireada se prepararon diluciones seriadas y se procedió a realizar el bioensayo correspondiente.

Filtrados sucesivos: se filtró mediante bomba de vacío. Para preparar los filtros se los lavó con 25 mL agua destilada. Luego se preparó el blanco para control del test de filtrado_i, para esto se filtraron 50 mL de agua de dilución, se colectó y se reservó para ensayar. A continuación, se filtraron 500 mL de muestra. Una fracción de la muestra filtrada se reservó y fue utilizada para el ensayo de toxicidad post filtrado_i, el resto del volumen filtrado fue utilizado para continuar la secuencia de filtrados. Con la muestra filtrada se prepararon diluciones seriadas y se procedió a realizar el bioensayo correspondiente. Los tamaños de filtros utilizados fueron 1 μm ; 0,8 μm ; 0,42 μm y 0,22 μm . Luego de cada filtrado una fracción de la muestra fue reservada para testear y la otra parte continuó la secuencia de filtrado.

SPE: se trabajó con columnas de extracción en fase sólida C₁₈ (Bond Elut- Agilent) de 5 mL. Las columnas se prepararon mediante los siguientes pasos: i) pasaje a través de la columna, y posterior descarte, de 15mL de metanol calidad HPLC, ii) lavado con 15 mL agua de máxima pureza (miliQ), iii) pasaje de 30 mL de agua de dilución, se colectan los últimos 10 mL para utilizarlos como blanco del tratamiento, iv) pasaje de 100 mL de efluente previamente filtrado con 1 μm , se descartan los primeros 25 mL y se colectan el resto. Los ensayos biológicos se realizan sobre este último volumen colectado.

Quelación: La incorporación de EDTA se debe realizar de forma tal que exceda la concentración necesaria para quelar el Ca y Mg y quede EDTA disponible para quelar otros cationes. Por esta razón es necesario conocer la concentración de Ca y Mg a los fines de establecer la concentración de EDTA a agregar. A su vez el EDTA excedente puede ejercer toxicidad sobre los organismos de prueba. Así se establecen tres niveles de agregado de EDTA a tres series de diluciones del efluente. La selección de tres niveles de EDTA se basa en que al incorporar EDTA

éste puede no alcanzar a quelar todos los cationes metálicos y, de esta manera, no remover la toxicidad asociada o, puede exceder la cantidad necesaria y causar toxicidad por sí mismo.

Previo al ensayo de determinó dureza del efluente aplicando un método estándar (APHA, 1998). La concentración de EDTA que produjo el punto final en la titulación de dureza de la muestra de efluente es la cantidad de EDTA necesaria en la adición para el test. Para minimizar la dilución, esta cantidad de EDTA se concentró en 0,2 mL. Se prepararon cuatro sets de diluciones del efluente. A un set se le incorpora 0,4 mL de solución de EDTA, 0,2 mL al segundo, 0,05 mL al tercero y 0,0125 mL al cuarto. La complejación de metales no es inmediata, por lo tanto, se dio tiempo a que la complejación ocurra antes de dar inicio al ensayo de toxicidad.

2.5. BIBLIOGRAFÍA:

- APHA, 1998. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington, DC, DC.
- Bulus Rossini, G., Taborda, V., Peluso, L., Larran, G., Ronco, A., 2005. Efectos letales y subletales del Cu (II) sobre *Hydra pladiodésmica* (hydroydea: hydridae). Congreso: VI Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental y XIV Congreso Argentino de Toxicología.
- Castillo Morales, G. (Ed.), 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Demetrio, P., Bulus, G., Bonetto, C., Ronco, A., 2009. Comparación del efecto del Roundup Max® y sus componentes (glifosato y POEA) sobre *Hydra attenuata*, *Hydra plagiodesmica* y su aposimbionte. Congreso: IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina.
- Escher, B.I., Leusch, F., 2012. Bioanalytical Tools in Water Quality Assesment. IWA Publishing, London.
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T., Johnson, E.M., 1997. Technical Methods Section: Acute Toxicity Assessment of Aqueous Samples Using a Microplate-Based *Hydra attenuata* Assay.
- U.S. EPA, 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase Toxicity Characterizatidn Procedures. US EPA.
- US-EPA, 2000. Norma EPA 6010 - Inductively Couple Plasma-Atomic Emission spectrometry.
- US-EPA, 1996a. Ecological Effects Test Guidelines - OPPTS 850.1010 - Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test , Freshwater Daphnids, Prevention, Pesticides and Toxic substances.
- US-EPA, 1996b. Ecological Effects Test Guidelines - OPPTS 850.4200 - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test.
- US-EPA, 1994. Method 3051- Microwave assisted acid digestion of sediments, sludge, soils and oils.

Capítulo 3

ECOTOXICIDAD DE LOS ENANTIÓMEROS DEL IBUPROFENO, Y SUS MEZCLAS CON ACETAMINOFENO

3.1. INTRODUCCIÓN:

Los productos farmacéuticos y sus metabolitos humanos se emiten constantemente al medio ambiente en todas las aguas residuales urbanas. La frecuencia y dosis de uso y su estabilidad química son los principales factores que determinan las concentraciones ambientales de estos productos. En este sentido, los productos farmacéuticos que se administran con frecuencia para enfermedades comunes y se excretan como biomoléculas activas tienen más probabilidades de convertirse en contaminantes. Sin embargo, el riesgo ambiental de estos productos está relacionado en gran medida con su persistencia y toxicidad. Varios estudios realizados en diferentes países han identificado una amplia variedad de productos farmacéuticos en aguas residuales y en aguas superficiales que reciben las aguas residuales. (Fent et al., 2006; Hernando et al., 2006b; Mompelat et al., 2009; Ortiz de García et al., 2014; Santos et al., 2010)

En aguas residuales urbanas, el ibuprofeno (IBP) y el acetaminofeno (ACF) son identificados con frecuencia (Andreozzi et al., 2003; Barnes et al., 2008a; Clara et al., 2005; Ebele et al., 2017; Elorriaga et al., 2013; Fent et al., 2006; Gómez et al., 2007; Gros et al., 2006; Han et al., 2006; Hernando et al., 2006b; Jux et al., 2002; Kolpin et al., 2004; Lin et al., 2009, 2008; Mayer and Testa, 1997; Mompelat et al., 2009; Ortiz de García et al., 2014; Roberts and Thomas, 2006; Santos et al., 2009, 2007, 2010; Teijon et al., 2010; Ternes, 1998; Terzić et al., 2008)

Los sistemas actuales de tratamiento de aguas residuales no están diseñados para la disminución óptima de estas sustancias, además, no hay pautas de emisión. Y, aunque sus concentraciones en el ambiente son generalmente bajas (ng/L a µg/L), los productos farmacéuticos son sustancias diseñadas para ser biológicamente activas en dosis bajas.

El ibuprofeno (IBP: ácido (R/S)-2-(4-isobutilfenil) propanoico) es un antiinflamatorio no esteroideo de venta libre ampliamente utilizado en el mundo entero desde unos 50 años atrás, con una relativamente alta dosis terapéutica (600-1200 mg/día). Ha sido comercializado y utilizado durante la mayor parte del tiempo como mezcla racémica (R/S-IBP), es decir, como una mezcla equimolar de los dos enantiómeros. El enantiómero S (S-IBP) inhibe la síntesis de prostaglandinas, mientras que el enantiómero R (R-IBP) no. Así, se asocia el efecto analgésico y antiinflamatorio al S-IBP. Sin embargo, una vez administrada la

dosis, una fracción de R-IBP (60-70%) es sometido a inversión quiral y transformado a S-IBP (Evans, 2001; Gabard et al., 1995). En los primeros años del siglo XXI, se ofreció una nueva forma comercial constituida únicamente por éste enantiómero (S-IBP), y el otorgamiento de licencias de fármacos enantioméricos puros, hasta entonces ofrecidos como mezcla racémica, contribuyó a incrementar el comercio/uso del S-IBP (Ribeiro et al., 2012)

En humanos la biodisponibilidad del IBP es del 80%, con un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas del 90-99%. Es metabolizado parcialmente en el hígado y excretado principalmente por orina dentro de las 24 horas de la administración. Se elimina mayoritariamente en la forma de metabolitos inactivos conjugados con ácido glucurónico, siendo sólo un 10% eliminado como droga libre (Álamo, 2005).

Se ha detectado IBP en aguas residuales urbanas en numerosos estudios (Andreozzi et al., 2003; Clara et al., 2005; Elorriaga et al., 2013; Jux et al., 2002; Mayer and Testa, 1997; Santos et al., 2009, 2007; Teijon et al., 2010; Terzić et al., 2008). Entre los valores más altos están los reportados por Santos et al. (2009), quienes detectaron hasta 603 µg/L en líquidos sin tratamiento. Existen también abundantes reportes de detección de IBP en cuerpos de agua que reciben aportes de líquidos residuales (Ashton et al., 2004; Barnes et al., 2008a; Buser et al., 1999; Ebele et al., 2017; Jux et al., 2002; Kolpin et al., 2002; Möder et al., 2007; Wiegel et al., 2004). Kolpin et al. (2002) identificaron este fármaco en el 10% de los cursos de agua estudiados y Barnes et al. (2008) hallaron concentraciones de hasta 3,1 µg/l en cursos de agua.

Buser et al. (1999) estudiaron la composición quiral del IBP detectado en aguas residuales, encontrando una mayor presencia de S-IBP en relación a R-IBP. Sin embargo, al evaluar la persistencia en el ambiente hallaron que el S-IBP se disipa más rápido.

El acetaminofeno (ACF: N-(4-hidroxifenil) acetamida) es un fármaco con propiedades analgésicas, sin propiedades antiinflamatorias, de venta libre en la Argentina y con amplio uso popular desde hace 50 años. Al administrarse en seres humanos en forma oral, su biodisponibilidad es del 75 al 90%. Es metabolizado en el hígado y eliminado, mayoritariamente por orina como glucuronoconjugado y sulfoconjugado, y sólo un 5% se elimina en su forma inalterada (Álamo, 2005).

Existen reportes de presencia de ACF en aguas residuales urbanas (Ebele et al., 2017; Gómez et al., 2007; Gros et al., 2006; Han et al., 2006; Kolpin et al., 2004; Roberts and Thomas, 2006; Ternes, 1998) con concentraciones máximas de 65 µg/L para líquidos sin tratamiento (Ternes, 1998).

Al tener alta solubilidad en agua y ser hidrófilo, se dispersa fácilmente en los ecosistemas acuáticos. Así, se ha reportado presencia de ACF en cuerpos de aguas en que se vierten aguas residuales (Bound and Voulvoulis, 2006; Gros et al., 2006; Kolpin et al., 2004, 2002; Wiegel et al., 2004) con valores máximos en el orden de los 10 µg/L (Kolpin et al., 2002).

Aunque su persistencia en el ambiente no es alta, IBP y ACF son detectados en concentraciones más altas que otros contaminantes emergentes. Esto es posible debido a sus gran uso, lo que genera un continuo

vuelco de éstos fármacos al ambiente, que supera las tasas de degradación (Löffler et al., 2005; Petrović et al., 2003). A su vez, en tanto productos farmacéuticos polares, el IBP y el ACP están biodisponibles para los organismos filtrantes, tales como *D.magna*, lo que sugiere la existencia de un riesgo ecotoxicológico relevante. La Tabla 4.1 ejemplifica esto, proporcionando los valores de CE50 para *D. magna* informados para IBP y ACF.

En general, las evaluaciones ecotoxicológicas suelen efectuarse sobre un compuesto particular, sin tener en cuenta que, salvo vertidos excepcionales, éstos llegan al ambiente como parte de una mezcla compleja. En la mezcla los componentes son susceptibles de diferentes tipos de interacciones que van a modificar la toxicidad final del efluente. No hace muchos años se ha comenzado a indagar acerca de la toxicidad de mezclas de fármacos (Cleuvers, 2005, 2004, 2003; Dietrich et al., 2010; Gómez Oliván et al., 2014; S. Gutiérrez et al., 2008; Sung et al., 2014).

Los efectos en una mezcla pueden clasificarse en cuatro clases teniendo en cuenta si los componentes interactúan químicamente o no, y si los componentes poseen el mismo mecanismo de acción o no. Si no existe interacción química y los componentes poseen el mismo modo de acción el efecto de mezcla se denomina adición de concentraciones/dosis (AC), mientras que si los componentes poseen diferentes modos de acción se denomina acción independiente (AI). Aquellos casos en los que se presentan interacción entre componentes son denominados acción compleja y acción dependiente y pueden generar efectos sinérgicos o antagónicos (Escher and Leusch, 2012).

En el modelo AI los componentes actúan independientemente en forma acorde a sus modos de acción y producen efectos independientes, por lo tanto, para la estimación del efecto combinado se considera el concepto estadístico de sucesos aleatorios independientes, así su efecto final responde a la siguiente fórmula:

$$EF_{C1+C2} (AI) = EF_{C1} + EF_{C2} - (EF_{C1} \times EF_{C2})$$

Donde:

$EF_{C1+C2} (AI)$ es efectos de la mezcla de los componentes C1 y C2 con AI

EF_{cx} es el efecto individual del componente x.

En cambio, para AC los componentes poseen el mismo mecanismo de acción, así sus efectos se suman y el efecto tóxico se describe mediante la siguiente fórmula:

$$1 = \sum_{i=1}^n C_i / CE_{xi}$$

Donde:

C_i es concentración de un componente en la mezcla.

CE_{xi} es concentración del componente simple que podría causar individualmente el mismo efecto x que se observa en la mezcla.

La comparación entre la respuesta observada en los organismos expuestos a la mezcla y la respuesta estimada que considera únicamente AC o AI permite establecer si existen otro tipo de interacciones (Cleuvers, 2004, 2003; Escher and Leusch, 2012), ya que de haber interacción química entre los componentes la respuesta podría ser inferior a la de AI (antagonismo) o superior a la de AC (sinergismo). *A priori* se asume que la mezcla tendrá un efecto apolar narcótico inespecífico, de manera que el modelo que mejor debería predecir el efecto tóxico de la mezcla es AC. La toxicidad de la combinación de IBP y ACF fue reportada por Sung et al. (2014) para *N. denticulata*. Sin embargo, en este reporte los autores solo consideraron la mezcla racémica de R/S-IBP, sin distinguir la toxicidad de cada uno de los dos enantiómeros.

El objetivo de este capítulo fue generar información acerca de la toxicidad del enantiómero de S-IBP, comparar el efecto tóxico del S-IBP con el de la mezcla racémica R/S-IBP y, por otro lado, evaluar la toxicidad y el modo de acción de las combinaciones de ACF con R/S-IBP y ACF con S-IBP, mediante bioensayos de toxicidad aguda con *D. magna*, (*Phylum: Arthropoda, Subphylum: Crustacea*).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

Los organismos de cultivo se mantuvieron en agua reconstituida preparada siguiendo las recomendaciones para ensayos de toxicidad aguda con *D. magna* de Castillo Morales (2004). R/S-IBP, S-IBP y ACF usados para los ensayos fueron muestras, con calidad de farmacopea, provistas por Bagó (Argentina). Para realizar los ensayos los fármacos se solubilizaron en medio de cultivo de *D. magna*.

Se realizaron 13 ensayos con cada fármaco (R/S-IBP, S-IBP y ACF). Los ensayos se realizaron en tubos de vidrio con un volumen de 20 mL., por triplicado, con 15 neonatos (<24h) por concentración. Se testearon los siguientes rangos de concentraciones: 1 a 250 mg/L para R/S-IBP y S-IBP, y 1 a 60 mg/L para ACF. El rango se definió teniendo en cuenta reportes previos de toxicidad (Tabla 1). Durante las 48 h del ensayo los organismos permanecieron bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A las 24 y las 48 h se cuantificó el número de organismos inmóviles. Con éstos resultados se estimó la concentración efectiva 50 (CE_{50}) a las 24 h. y las CE_{10} , CE_{25} , CE_{50} y CE_{75} para las 48 h aplicando el método PROBIT (G Castillo Morales, 2004).

Una vez establecidas las CE_x para R/S-IBP, S-IBP y ACF, se estudió la toxicidad de las combinaciones S-IBP con ACF y R/S-IBP con ACF. Las combinaciones se realizaron utilizando las $CE_x/2$. Los ensayos se realizaron en tubos de ensayo de 20 ml, por triplicado y con 10 neonatos por réplica. Las combinaciones elegidas se ensayaron 10 veces.

Para cada mezcla ensayada también se estimó el efecto de las concentraciones individuales (CE_{x/2}) y de la mezcla si ésta presentara únicamente mecanismos de AI.

Los análisis estadístico se realizaron mediante el software Infostat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011).

3.3. RESULTADOS:

En las figuras 3.1 y 3.2 se representan las curvas de toxicidad generadas para R/S-IBP y S-IBP respectivamente. La figura 3.3 muestra las curvas de toxicidad para ACF. Los ensayos de toxicidad aguda con *D. magna* arrojaron una CE_{50-48h} dentro del rango 50,6 a 79,2 mg/L para R/S-IBP, 39,6 - 54,6 mg/L para S-IBP y 10,6 - 28,2 mg/L para ACF.

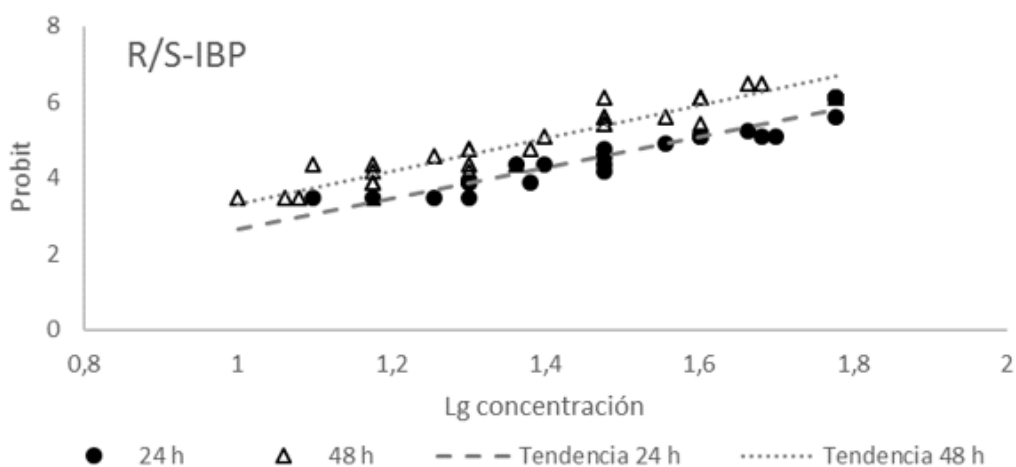


Figura 3. 1: Curva de tóxicidad donde se representa inmovilidad (%) de *D.magna*, transformado a unidades Probit, en función del logaritmo del porcentaje de la concentración de S/R-IBP. Concentración máxima testeada 250 mg/L. NOAEL-48h 22,5 mg/L y LOAEL-48h 25 mg/L.

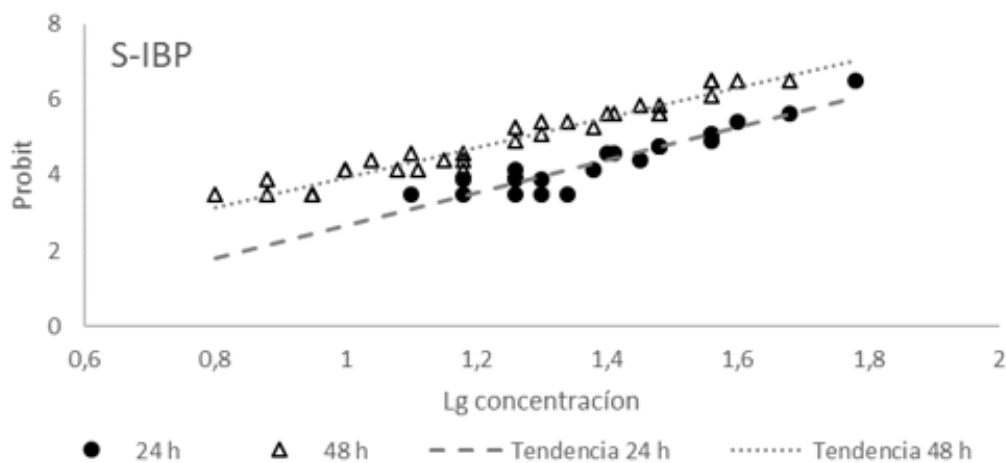


Figura 3. 2- Curva de tóxicidad donde se representa inmovilidad (%) de *D.magna*, transformado en unidades Probit, en función del logaritmo del porcentaje de la concentración de S-IBP. Concentración máxima testeada 250 mg/L. NOAEL-48h 12,5 mg/L y LOAEL-48h 15,75 mg/L

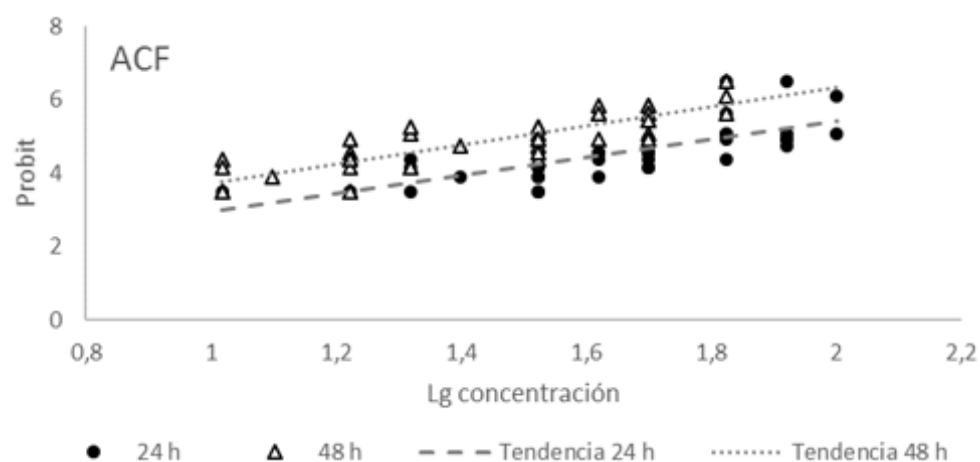


Figura 3. 3- Curva de toxicidad donde se representa inmovilización (%) de *D.magna*, transformado a unidades Probit, en función del logaritmo del porcentaje la concentración de ACF. Concentración máxima testeada 60 mg/L. NOAEL-48h 0,1 mg/L y LOAEL-48h 1 mg/L.

En la tabla 3.1 se resumen las CE50 estimadas para las 24 y 48 h con sus correspondientes SD y se indican las CE10, CE25, CE75 estimadas para las 48 h.

	24h		48h			EC50 Referencia bibliográfica
	EC50	EC10	EC25	EC50	EC75	
R/S-IBP	97,5±8,8	31,8±6,4	43,3±6,8	61,7±8,1	88,0±14,7	89,2-114,9 (1) 40,2-62,7 (2) 132 (3)
S-IBP	87,4±4,6	22,5±3,4	31,7±3,6	46,6±4,3	68,7±7,4	Sin referencias
ACF	39,8±9,7	6,1±3,0	10,0±4,1	20,1±5,9	32,2±12,4	20,1 (3) 50 (4) 23,2-39 (5)

Tabla 3.1- Concentración efectivas (CE10; CE25; CE25; CE50; CE75, en mg/L, y desvío estándar (SD) calculado por exposición de *D.magna* a R/S-IBP, S-IBP y ACF durante 24 y 48 h. Las referencias bibliográficas corresponden a (1) Han et al. (2010), (2) Cleuvers (2004), (3) Han et al. (2006), (4) Henschel et al. (1997), (5) Kim et al. (2007)

Mediante el análisis estadístico se indicaron diferencias significativas entre las CE50 para R/S-IBP y S-IBP (24h exposición: $p=0.0012$ y 48h de exposición: $p<0.0001$). S-IBP es más tóxico para *D. magna* que R/S-IBP y la diferencia de toxicidad se incrementa con el tiempo de exposición (Figura 3.4)

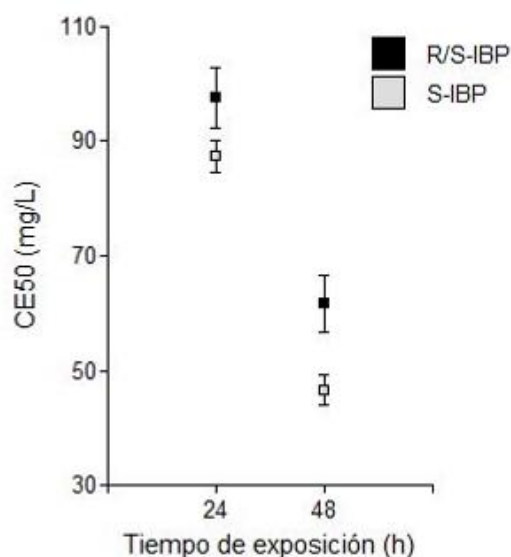


Figura 3.4- Comparación de las CE50 estimadas para *D. magna* por exposición a R/S-IBP y S-IBP durante 24 y 28 h de exposición. Se representa el intervalo de confianza del 95%.

En la tabla 3.2 se presenta la estimación del efecto individual de las concentraciones (CE_x/2) utilizadas para realizar las mezclas binarias. Estas estimaciones se emplearon para calcular el efecto de la mezcla si los componentes presentaran efectos independientes (AI)

	CE10/2	CE25/2	CE50/2	CE75/2
R/S-IBP	1,1 ± 2,4	3,0 ± 3,5	9,7 ± 6,5	27 ± 8,3
S-IBP	0,7 ± 0,8	3,2 ± 2,2	10,9 ± 4,9	28,6 ± 6,2
ACF	2,2 ± 2,6	5,7 ± 3,9	19,3 ± 9	39,3 ± 10,9

Tabla 3. 2- Efectos individuales (%) esperados de las CE_x/2 utilizadas para realizar las mezclas binarias. Los efectos se estimaron mediante el método Probit

En las figuras 3.5 y 3.6 se representa los resultados obtenidos luego de ensayar las mezclas i) R/S-IBP con ACF y ii) S-IBP con ACF respectivamente. También se comparan gráficamente con la inmovilización esperada al aplicar los conceptos de AC, AI y los efectos individuales esperados para las concentraciones de fármacos adicionadas (CE_x/2).

En la evaluación de ambas mezclas las concentraciones de R/S-IBP y S-IBP adicionadas en los test de EC10/2 y EC25/2 fueron menores o similares al NOAEL y la toxicidad de las mezclas se mantuvo por debajo de la predicción para AC y cercano al de AI. Los efectos fueron cercanos a la predicción con AC para la CE50/2. Sin embargo, los efectos fueron superiores a los esperados en los ensayos de CE75/2, con un porcentaje de inmovilización del 89,6±7,0 % para la mezcla de ACF con R/S-IBP y 92,0±5,1 % para la mezcla de ACF con S-IBP).

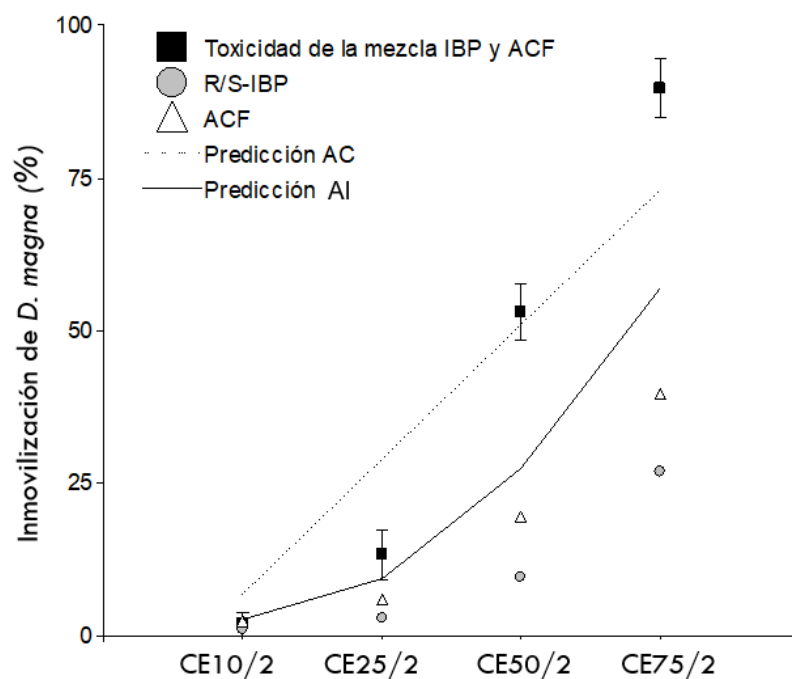


Figura 3. 5- Curva de toxicidad de la mezcla de R/S-IBP y ACF generada mediante ensayos de toxicidad aguda de *D. magna* en comparación con la toxicidad predicha aplicando los modelos de concentración adición (CA) y acción independiente (AI) y la toxicidad esperada para los fármacos individuales. Para las mezclas se utilizó las CEx/2

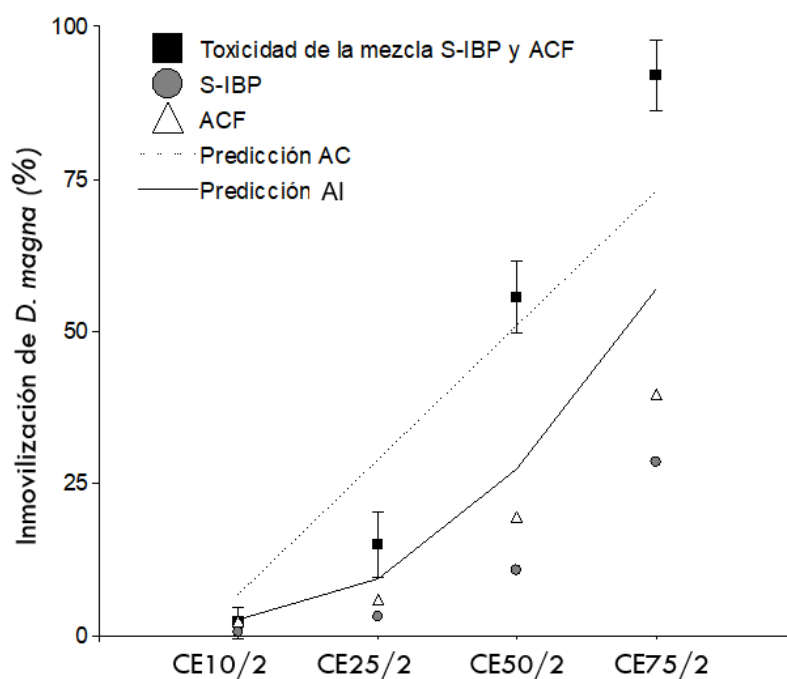


Figura 3. 6- Curva de toxicidad de la mezcla de S-IBP y ACF generada mediante ensayos de toxicidad aguda de *D. magna* en comparación con la toxicidad predicha aplicando los modelos de concentración adición (CA) y acción independiente (AI) y la toxicidad esperada para los fármacos individuales. Para las mezclas se utilizó las CEx/2

3.4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La toxicidad de R/S-IBP ha sido reportada para diversas especies, incluidas *Chlorella vulgaris* (Geiger et al., 2016), *Desmodesmus subspicatus* (Cleuvers, 2004), *Hydra attenuata* (Quinn et al., 2008), *Lemna minor* (Pomati et al., 2004), *Moina macrocopa* (Han et al., 2010), *N. denticulata* (Sung et al., 2014), *Orizias latipes* (Han et al., 2010; Kim et al., 2009), *Planor biscarinatus* (Pounds et al., 2008), *Thamnocephalus platyurus* (Kim et al., 2009), *Danio rerio* (Song et al., 2018) y *D. magna* (Cleuvers, 2004; Du et al., 2016; Han et al., 2006, 2010; Henschel et al., 1997; Kim et al., 2007). La CE50-48h para *D. magna* fue reportada dentro del rango de 40 a 132 mg/L (Tabla 3.1). El único reporte con distinción de enantiómeros, previo a éste trabajo, es para *D. rerio* (Song et al., 2018). Nuestros resultados para R/S-IBP son consistentes con aquellos reportados por otros autores, en los cuales no se aclara la composición enantiomérica. Así, éste trabajo es el primer dato reportado acerca de la toxicidad del enantiómero S-IBP en *D. magna*.

La toxicidad del ACF ha sido reportada para diferentes especies, entre ellas: *D. rerio* (Henschel et al., 1997), *D. subspicatus* (Henschel et al., 1997), *N. denticulate* (Sung et al., 2014), *O. latipes* (Kim et al., 2007), *Tetrahymena pyriformis* (Henschel et al., 1997), *T. aestivum* (An et al., 2009), *Vibrio fischeri* (Henschel et al., 1997; Kim et al., 2007) y *D. magna* (Du et al., 2016; Han et al., 2006; Henschel et al., 1997; Kim et al., 2007). Los valores de CE₅₀₋₄₈ reportados para *D. magna* están en el rango de 9 a 50 mg/L.(Tabla 3.1). Los resultados obtenidos en éste trabajo son consistentes con aquellos reportados previamente por otros autores.

De los tres fármacos testeados, acorde a los datos reportados en la literatura, el ACF fue el más tóxico para *D. magna*. Sin embargo, todos los compuestos presentaron CE50-48h en el rango 10 -100 mg/L, lo que implica considerarlos como fármacos nocivos para los organismos acuáticos acorde a la categorización publicada por Commission of the European Communities (1996).

Los resultados muestran que S-IBP es más tóxico que R/S-IBP para *D. magna*. Esto concuerda con un registro actual que indica que los enantiómeros S(+) y R(-) no son ecotoxicológicamente equivalentes (Song et al., 2018). Así mismo, el efecto terapéutico en humanos se asocia con S/IBP, en *D. magna* es éste mismo enantiómero el que muestra la mayor toxicidad. A pesar de que la persistencia ambiental para S-IBP es menor que R-IBP (Buser et al., 1999) esto puede contrarrestarse debido al incremento de la descarga de S-IBP al ambiente asociada a su comercialización en forma pura. Las CE50 obtenidas son valores muy superiores a las concentraciones reportadas tanto para aguas residuales como cuerpos de aguas, sin embargo, es necesario resaltar que estos valores corresponden a exposiciones agudas por un periodo de tiempo máximo de 48 h y que, al aumentar la exposición de 24 a 48 h, las CE50 se redujeron un 51% para ACF, 47% para S-IBP y 36% para IBP.

Du et al. (2016) reportó que IBP y ACF generan diferentes efectos subletales sobre *D. magna* y que los efectos dependen de la concentración a la fueron expuestos. Los autores detectan efectos sobre la

reproducción en concentraciones 30 veces menores que la CE_{50-48h} establecidas para IBP y ACF al usar inmovilización como punto final del ensayo. Además, es importante tener en cuenta el hecho de que estos datos solo consideraron la presencia de compuestos únicos y este contexto es improbable en la realidad, donde los compuestos que entran al ambiente a través de los ELUs formando una mezcla compleja.

En la evaluación de la toxicidad de las mezclas correspondientes al 50% de efectos los valores obtenidos tanto para la mezcla de R/S-IBP con ACF como para S-IBP con ACF se ajustaron a lo estimado con el modelo de AC. Sin embargo, se observaron diferencias entre el efecto observado y el efecto predicho considerando únicamente AC para las concentraciones de prueba más altas ($CE_{75/2}$) y las más bajas ($CE_{10/2}$ y $CE_{25/2}$).

Al analizar las concentraciones empleadas para realizar las mezclas se observa que R/S-IBP y S-IBP, en combinación con ACF, causaron inmovilización de *D. magna* en concentraciones menores o iguales a los NOEC individuales. De hecho, la $CE_{25/2}$ de R/S-IBP fue inferior al NOEC y la $CE_{25/2}$ de S-IBP igual al NOEC, no obstante, en combinación con ACF generaron efectos tóxicos. Así, la inmovilización observada al ensayar la concentración correspondiente a la $CE_{25/2}$ de R/S-IBP con ACF fue de 13% y de S-IBP con ACF fue de 15%). Estos efectos tóxicos se mantuvieron debajo de la predicción para AC y podría ser predicha por el modelo de AI. A su vez, los efectos observados para ambas mezclas para la $CE_{75/2}$ fueron superiores a los esperados para AC, esto permite considerar la existencia de interacciones entre los componentes que aumentan su toxicidad más allá de los niveles estimados para el modelo AC.

Teniendo en cuenta lo anterior, la curva de respuesta observada, para las combinaciones de fármacos testeadas, no se corresponde con ninguno de los modelos considerados. Este análisis indica que no hay un modo de acción específico que explique la toxicidad de la mezcla. Así las diferentes mezclas parecen presentar efectos sinérgicos, cuando se encuentran a altas concentraciones, pero responde al modelo AI a bajas concentraciones. Si bien la metodología empleada para las mezclas difiere en los trabajos, estas diferencias de la respuesta ante los distintos niveles de mezclas se condice con los resultados de Sung et al. (2014) que expuso a *N. denticulata* a mezclas desbalanceadas de IBU e ACF. En ese trabajo los autores concluyeron que las mezclas testeadas se asociaban a diferentes efectos tóxicos y que la toxicidad se asociaba a la proporción de IBP y ACF incorporados. Además, se observaron tanto efectos sinérgicos como antagónicos para las mezclas, con la particularidad que las muestras con mayor concentración relativa de ACF fueron más tóxicas que aquellas mezclas que contenían una mayor proporción de IBP (Sung et al., 2014).

Las relaciones entre efecto y concentración reportadas por Du et al. (Du et al., 2016)(2016) y Sung et al. (2014) pueden explicar parcialmente el hecho de que la toxicidad de las mezclas no puede ser predicha aplicando los modelos AI ni AC. Las fallas en la predicción al emplear un único modelo revelan la importancia de los estudios de toxicidad de mezclas y la necesidad de considerar éste tipo de datos en las estimaciones de riesgo de matrices complejas tales como los ELUs (Hernando et al., 2005; Ortiz de García et al., 2014). El cociente de riesgo ambiental es un método utilizado internacionalmente para la

elaboración de normas ambientales (EC, 1996; Hernando et al., 2006b; Ortiz de García et al., 2014). Para evaluar el riesgo de la presencia simultánea de productos farmacéuticos, es necesario incluir en la estimación del coeficiente de riesgo la CE50/2 (concentraciones incorporadas en las mezclas binarias: R/S-IBP = 30,8, S-IBP = 23,3 y ACP = 0,1 mg / L), las concentraciones máximas de los productos farmacéuticos reportados en aguas superficiales (ACP = 0,01 y S / R-IBP = 0,003 mg/L) y un factor estándar (1000). Entonces, el riesgo considerando la presencia simultánea para R/S-IBP está en el límite entre bajo y medio (0,1) y, para ACP, está en el límite entre riesgo medio y alto (1). Si bien no hay reportes actuales de concentraciones de S-IBP en ecosistemas acuáticos, si consideramos los reportes para IBP como referencia, el riesgo podría ser medio para S-IBP (0,13). Estos niveles de riesgo ambiental alcanzados para una mezcla binaria de fármacos evidencian que el riesgo está fuertemente relacionado con las mezclas complejas. Aunque hay información disponible sobre toxicidad de los fármacos en la literatura, y también se poseen numerosos registros de la presencia de varios productos farmacéuticos en simultáneo en aguas superficiales, aún hay una gran escasez de estudios que muestren toxicidad de la mezcla, y esto debe ser priorizado en los futuros estudios.

Finalmente, de acuerdo con la evidencia clínica disponible, el S-IBP presenta ventajas terapéuticas ligeramente más altas en comparación con su mezcla racémica (Evans, 2001; Gabard et al., 1995), con diferencias que, aunque experimentalmente significativas y considerando las variaciones biológicas habituales de las poblaciones humanas, son finalmente irrelevantes desde el punto de vista clínico. Esto indicaría que el reemplazo de R/S-IBP en el mercado por S-IBP responde principalmente a razones comerciales y, los resultados del presente estudio sugieren que, desde el punto de vista ambiental, la sustitución de S/R-IBP por S-IBP no es inocua.

Existe un riesgo significativo asociado con la presencia simultánea de enantiómeros de IBP y ACP en el medio ambiente, y el riesgo asociado a S-IBP es mayor que del R/S-IBP. Debido a la introducción continua de IBP y ACP en el medio ambiente, el estudio de su efecto combinado a bajas concentraciones y tiempos de exposición más prolongados debe abordarse con prioridad.

3.5. BIBLIOGRAFÍA:

- Álamo, C., 2005. Guía Farmacológica de Analgésicos. ARÁN Ediciones, Madrid, España.
- An, J., Zhou, Q., Sun, Y., Xu, Z., 2009. Ecotoxicological effects of typical personal care products on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 76, 1428–1434. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.004
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330. doi:10.1016/S0045-6535(02)00769-5
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K. V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167–184. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.04.062
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* 402, 201–216. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.021

- Bound, J.P., Voulvoulis, N., 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Res.* 40, 2885–2892. doi:10.1016/j.watres.2006.05.036
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D., Müller, M.D., 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2529–2535. doi:10.1021/es981014w
- Castillo Morales, G. (Ed.), 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* 39, 4797–4807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three B-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199–205. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.090
- Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 309–315. doi:10.1016/S0147-6513(03)00141-6
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185–194. doi:10.1016/S0378-4274(03)00068-7
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. *Chemosphere* 79, 60–66. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.069
- Du, J., Mei, C.F., Ying, G.G., Xu, M.Y., 2016. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 84–90. doi:10.1007/s00128-016-1806-7
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3, 1–16. doi:10.1016/j.emcon.2016.12.004
- EC, 1996. Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II; Environmental Risk Assessment. Luxembourg.
- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013. Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 397–400. doi:10.1007/s00128-012-0919-x
- Escher, B.I., Leusch, F., 2012. Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment. IWA Publishing, London.
- Evans, A.M., 2001. Clinical Rheumatology Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen. *Clin. Rheumatol.* 20, 9–14.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Gabard, B., Nirnberger, G., Schiel, H., Mascher, H., Kikuta, C., Mayer, J.M., 1995. Comparison of the bioavailability of dexibuprofen administered alone or as part of racemic ibuprofen. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 48, 505–511.
- Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., Saçan, M.T., 2016. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129, 189–198. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.032
- Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66, 993–1002. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.051
- Gómez Oliván, L.M., Neri Cruz, N., Galar Martínez, M., Islas Flores, H., García Medina, S., 2014. Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. *Environ. Monit. Assess.* 186, 7259–7271. doi:10.1007/s10661-014-3925-0
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based

- on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678–690. doi:10.1016/j.talanta.2006.05.024
- Gutiérrez, M.S., Cabrera, M.N., Benítez, A., Gutiérrez, A., 2008. Manual para el manejo de Efluentes de Tambo, 1ra edició. ed. Proyecto Producción Responsable - M.G.A.P, Montevideo, Uruguay.
- Gutiérrez, S., Fernández, C., Escher, B.I., Tarazona, J.V., 2008. A new hazard index of complex mixtures integrates bioconcentration and toxicity to refine the environmental risk assessment of effluents. *Environ. Int.* 34, 773–781. doi:10.1016/j.envint.2008.01.002
- Han, G.H., Hur, H.G., Kim, S.D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 263–271. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.013
- Han, S., Choi, K.K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K.K., Khim, J.S., Zhang, X., Giesy, J.P., 2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98, 256–264. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.013
- Henschel, K., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A., 1997. Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25, 220–225. doi:10.1006/rtp.1997.1102
- Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358–366. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.012
- Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernández Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.037
- Jux, U., Baginski, R.M., Arnold, H.-G., Krönke, M., Seng, P.N., 2002. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205, 393–398. doi:10.1078/1438-4639-00166
- Kim, J.W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M., Arizono, K., 2009. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Sci.* 34, 227–232. doi:10.2131/jts.34.227
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G., Park, J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ. Int.* 33, 370–375. doi:10.1016/j.envint.2006.11.017
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. doi:10.1021/es011055j
- Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* 328, 119–130. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.01.015
- Lin, A.Y.C., Yu, T.H., Lateef, S.K., 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J. Hazard. Mater.* 167, 1163–1169. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.108
- Lin, A.Y.C., Yu, T.H., Lin, C.F., 2008. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 74, 131–141. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.08.027
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T.A., 2005. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5209–5218. doi:10.1021/es0484146
- Mayer, J.M., Testa, B., 1997. Pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicity of ibuprofen enantiomers. *Drugs Future* 22, 1347–1366.
- Möder, M., Braun, P., Lange, F., Schrader, S., Lorenz, W., 2007. Determination of endocrine disrupting compounds and acidic drugs in water by coupling of derivatization, gas chromatography and negative-chemical ionization mass spectrometry. *Clean - Soil, Air, Water* 35, 444–451. doi:10.1002/clen.200720001
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803–814. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008
- Ortiz de García, S.A., Pinto Pinto, G., García-Encina, P.A., Irusta-Mata, R., 2014. Ecotoxicity and

- environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology* 23, 1517–1533. doi:10.1007/s10646-014-1293-8
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal. Chem.* 22, 685–696. doi:10.1016/S0165-9936(03)01105-1
- Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A., 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* 67, 387–396. doi:10.1016/j.aquatox.2004.02.001
- Pounds, N., Maclean, S., Webley, M., Pascoe, D., Hutchinson, T., 2008. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 47–52. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.07.003
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 389, 306–314. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.08.038
- Ribeiro, A.R., Castro, P.M.L., Tiritan, M.E., 2012. Chiral pharmaceuticals in the environment. *Environ. Chem. Lett.* 10, 239–253. doi:10.1007/s10311-011-0352-0
- Roberts, P.H., Thomas, K. V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 356, 143–153. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.04.031
- Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2007. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ. Int.* 33, 596–601. doi:10.1016/j.envint.2006.09.014
- Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E., 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J. Hazard. Mater.* 164, 1509–1516. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.073
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Song, Y., Chai, T., Yin, Z., Zhang, X., Zhang, W., Qian, Y., Qiu, J., 2018. Stereoselective effects of ibuprofen in adult zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.* 241, 730–739. doi:10.1016/j.envpol.2018.06.009
- Sung, H.H., Chiu, Y.W., Wang, S.Y., Chen, C.M., Huang, D.J., 2014. Acute toxicity of mixture of acetaminophen and ibuprofen to Green Neon Shrimp, *Neocaridina denticulate*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38, 8–13. doi:10.1016/j.etap.2014.04.014
- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina Díaz, A., Fernández Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.* 408, 3584–3595. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.041
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260. doi:10.1016/S0043-1354(98)00099-2
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, F., Jovančić, P., Jabučar, D., 2008. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Sci. Total Environ.* 399, 66–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.003
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., Von Tümpling, W., Wanke, A., 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57, 107–126. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.05.017

Capítulo 4

TOXICIDAD DE EFLUENTES LÍQUIDOS URBANOS: IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES TÓXICAS Y RELACIÓN CON PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

4.1. INTRODUCCIÓN:

Tal como se describió en el Capítulo 1, los ELUs están compuestos aguas de descarte de domicilios, comercios, hospitales, desagües pluviales y, en ocasiones, actividades de servicio e industriales. Como consecuencia de la naturaleza y variedad de sus fuentes, constituyen una compleja combinación de sustancias químicas. Diversos estudios han detectado en su composición detergentes, fármacos, metales, COPs, productos del cuidado personal, entre otros. A su vez, la composición es dinámica, dado que tanto los componentes como las concentraciones de éstos cambian constantemente afectados por factores antrópico y ambientales (Clara et al., 2005; Garcia-Reyero et al., 2011; Üstün, 2009) como la biodisponibilidad de las sustancias en el efluente pueden ser fuertemente variables por degradación o por interacción química de los componentes (materia orgánica, microflora) (Aguayo et al., 2004; Manusadžianas et al., 2003; Wong et al., 2001). En resumen, todo lo anterior nos permite considerar a los ELUs como mezclas complejas, variables y de composición desconocida que contienen una gran diversidad de sustancias orgánicas e inorgánicas (Aguayo et al., 2004; Dalzell et al., 2002; Farre et al., 2002; Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003; Sarakinos et al., 2000).

En general el manejo de las plantas de tratamiento de ELUs incluye la determinación y seguimiento de algunos parámetros físico-químicos tradicionales, entre ellos: DBO, DQO, carbono orgánico total y disuelto, sólidos suspendidos totales (SST), nitrógeno y fósforo totales, sólidos sedimentables en volumen, recuento de colonias de coliformes, conductividad, pH (Aguayo et al., 2004; Katsoyiannis and Samara, 2007; Polls et al., 1980). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la diversidad de las sustancias que los constituyen están sujetas a interacciones que alteran las propiedades características de la mezcla (Dalzell et al., 2002). El estudio de la toxicidad, mediante bioensayos, permite evaluar los ELUs de manera integral, ya sea para evaluar la eficacia de los sistemas de tratamiento a los que son sometidos, como para conocer la magnitud de las consecuencias de su vertido en el medio.

En algunos países, entre ellos EE.UU., Brasil, Canadá, varios países de la U.E., Australia y Nueva Zelanda, se han incorporado a los esquemas normativos la evaluación de los efectos adversos de aguas residuales sobre los sistemas biológicos, aplicando bioensayos como herramienta de evaluación para el manejo y protección de los ecosistemas acuáticos (Planes and Fuchs, 2015). En Argentina aún no se han incluido criterios biológicos en la normativa ambiental, y la reglamentación se basa en niveles máximos permisibles para algunos contaminantes relevantes por sus efectos biológicos, pero sin que exista una evaluación biológica que permita determinar si tales estándares son en realidad efectivos para lograr la protección de la vida acuática y sin considerar la interacción de los parámetros.

En la actualidad se ha estudiado la toxicidad de diversas aguas residuales con distintos organismos de prueba y la combinación de la información toxicológica con los análisis fisicoquímicos son una importante estrategia para el estudio integral de las aguas residuales (Aguayo et al., 2004; Farre et al., 2002; Katsoyiannis and Samara, 2007; Oberholster et al., 2008; Smital et al., 2011). Es posible realizar evaluaciones de la toxicidad con el objetivo de identificar las fracciones problema, esto fue descrito en protocolos de la US-EPA (U.S. EPA, 1993, 1991) para la evaluación de la identidad de la toxicidad (TIE). Para esto se evalúa la toxicidad en forma sucesiva sobre la muestra original y muestras manipuladas y el cambio en la toxicidad, que se origina por la manipulación, da indicios de cuáles son las fracciones responsables de la toxicidad. La evaluación de la reducción de la toxicidad puede implementarse tanto para identificar fuentes de toxicidad como para control/monitoreo del funcionamiento de las plantas de tratamiento de ELUs (Botts et al., 1989, 1988). Entre las posibles fracciones tóxicas a identificar se encuentran fracciones orgánicas, metales complejables y sustancias filtrables, entre otras. Este método se aplica teniendo en cuenta que la toxicidad es una respuesta genérica y no hay mecanismo para determinar si la toxicidad observada es causada a un componente simple o a una combinación de componentes que aparecen en forma alternativa, pero si es posible identificar fracciones que aportan a la toxicidad global.

Los objetivos de este estudio fueron i) caracterizar toxicológicamente los ELUs de un sector de Santa Rosa, La Pampa, Argentina, ii) identificar que fracciones aportan a la toxicidad global del ELU, iii) indagar acerca de las relaciones entre parámetros fisicoquímicos y toxicidades en los ELUs y en las submuestras manipuladas.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

Área de estudio: La ciudad de Santa Rosa, La Pampa, posee 102860 habitantes y su red cloacal tiene una cobertura próxima al 80% de las viviendas (INDEX, 2010). Posee dos plantas de

tratamiento, planta Norte y planta Sur. La planta Norte posee 6 piletas de depuración: 2 anaeróbicas, y 4 aeróbicas, y está ubicada a más de 15 Km. del sitio de disposición final (Figura 4.1). Los líquidos saneados son bombeados por un canal subterráneo que, en su tramo final, desemboca en un canal a cielo abierto y, finalmente, los conduce hacia el Bajo de Giuliani.

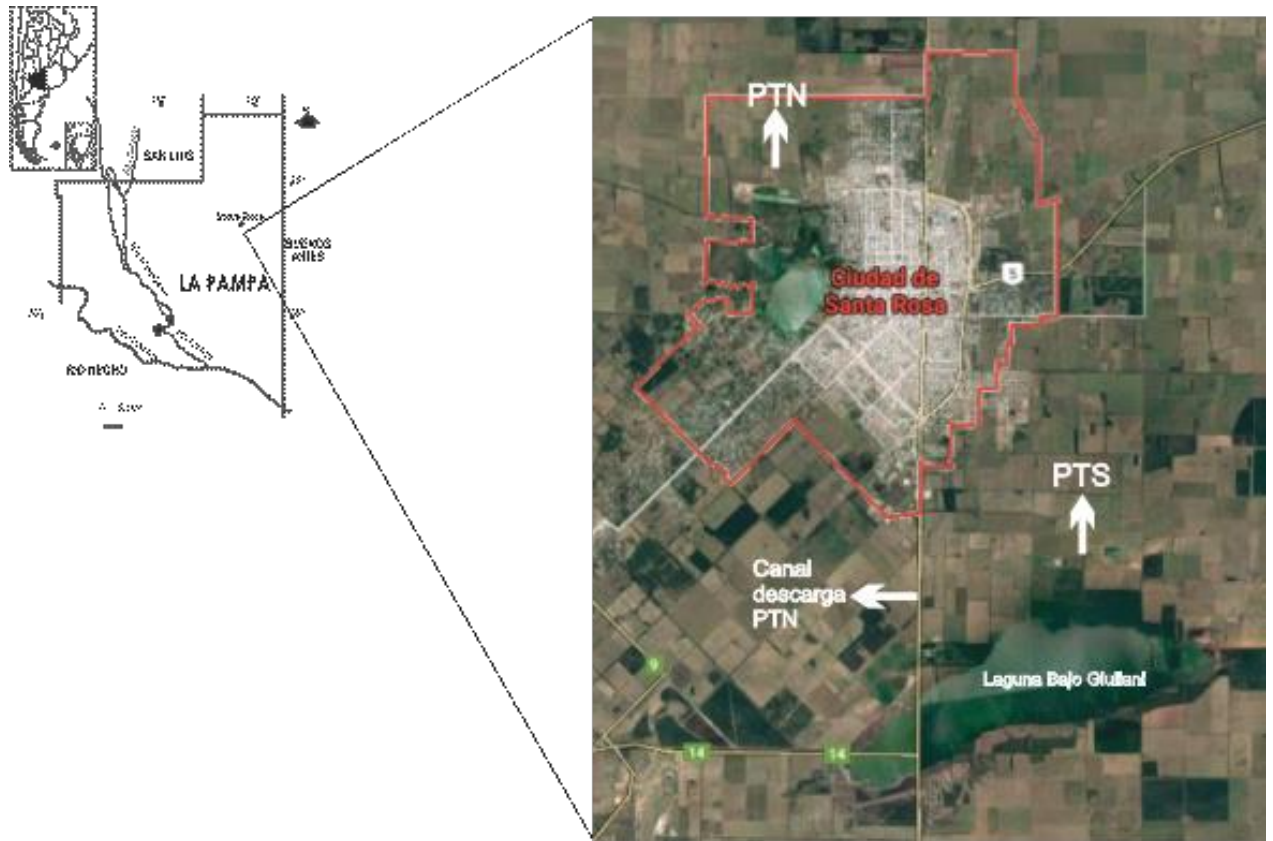


Figura 4. 1- Ubicación del área de estudio. Se indican las plantas de tratamiento Norte (PTN) y Sur (PTS), el Canal de descarga de ELULs y el sitio de disposición final, Laguna Bajo Giuliani.

En canal a cielo abierto confluyen, ocasionalmente, los líquidos cloacales saneados en la Planta de Tratamiento Norte con las aguas del sistema de desagües pluviales del sudeste de la ciudad y, cuando es necesario, las aguas del trasvase de la Laguna Don Tomas que se drenan a fin de mantener el nivel.

Toma de muestras, conservación y manipulación: Se colectaron 24 muestras simples de ELUs en forma quincenal, durante el periodo de diciembre 2013 a noviembre 2014. El sitio de muestreo correspondió al canal a cielo abierto que transporta los ELUs tratados en la planta de tratamiento Norte para su vertido al sitio de disposición final, laguna Bajo de Giuliani (Figura 4.1). La figura 4.2 diagrama la secuencia de trabajo que se describe a continuación.

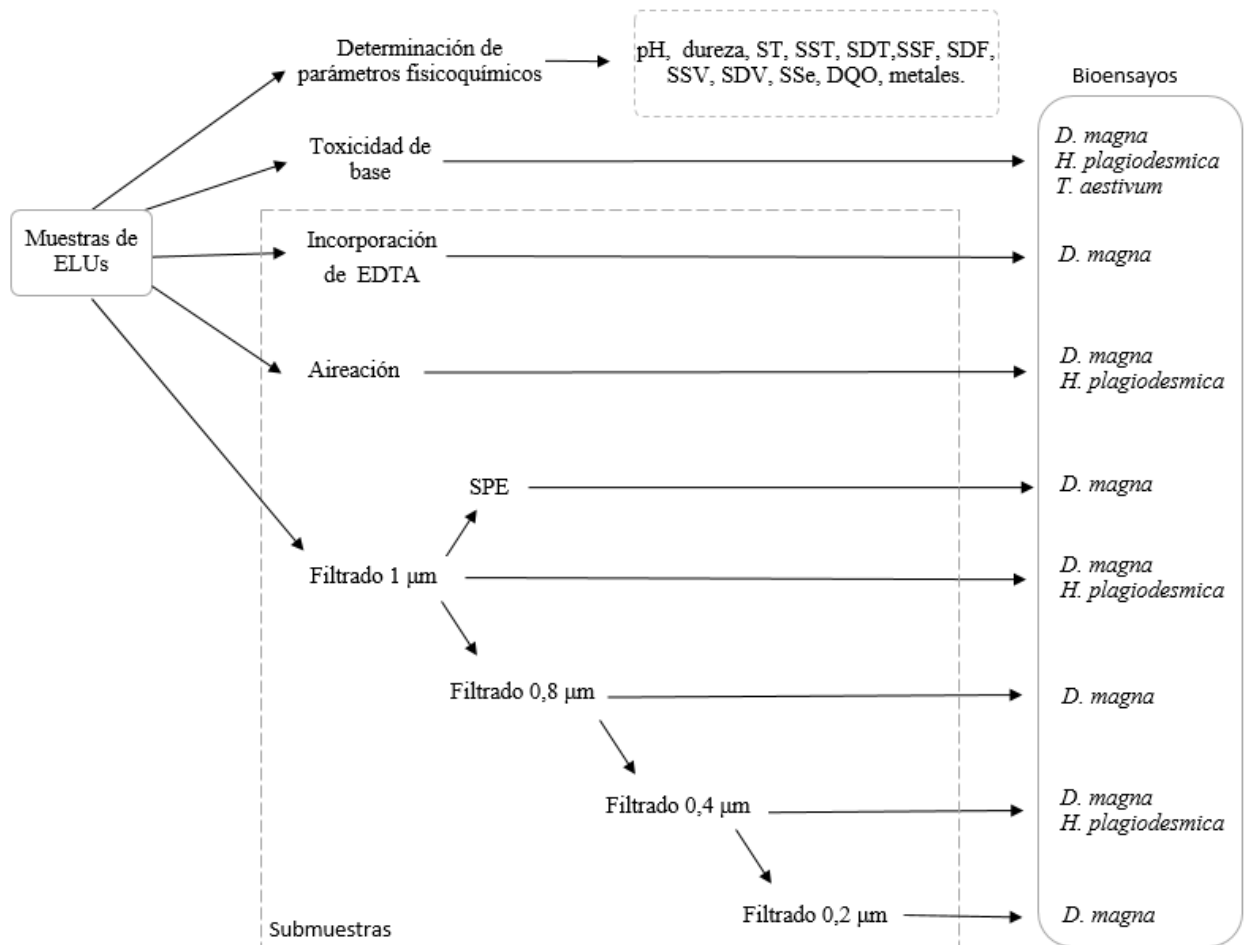


Figura 4. 2- Secuencia de trabajo: cada muestra colectada fue fraccionada. Una parte del muestreo se usó durante las determinaciones fisicoquímicas y, el resto, se utilizó para los ensayos de toxicidad. Los ensayos de toxicidad se iniciaron con la determinación de la toxicidad de base para las especies seleccionadas. Una vez establecida la toxicidad de base se inició con el tratamiento de submuestras para luego determinar la toxicidad remanente post tratamiento. Los tratamientos aplicados fueron: i) agregado de EDTA, ii) aireación durante 2h a temperatura ambiente, iii) filtrado 1 µm, iv) filtrado, 0,8 µm, v) filtrado 0,42 µm, vi) filtrado 0,22 µm, vii) SPE-C18.

Las muestras fueron fraccionadas y, una parte de la muestra fue conservada sin alteraciones, mientras que a las demás fracciones se les aplicó un tratamiento: i) aireación durante 2h a temperatura ambiente (Ai), ii) filtrado 1 µm (F1), iii) filtrado 0,8 µm (F08), iv) filtrado 0,42 µm (F04), v) filtrado 0,22 µm (F02), vi) SPE – C₁₈ (SPE), vii) agregado de 4 niveles de EDTA (posterior a la determinación de la dureza). Todos los tratamiento se aplicaron acorde a los métodos para las evaluaciones de identificación de toxicidad acuática (U.S. EPA, 1991) y son descriptos con detalle en capítulo 2: “Materiales y Métodos Generales”. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C, los ensayos y determinaciones se realizaron dentro de los plazo recomendados (APHA, 1998)

Parámetros físico-químicos: Se determinó pH, conductividad, ST, SST, SDT, SSF, SSV, SSe 10min, SSe 60min, SSe 24h, DQO y dureza. Todas las determinaciones se realizaron siguiendo los protocolos estandarizados y son descriptas en detalle en el Capítulo 2.

Se cuantificó Aluminio (Al), Niquel (Ni), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Manganeseo (Mn), Cadmio (Cd), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe) y Arsénico (As) por Espectroscopia de Plasma ICP-OES. Las muestras fueron tratadas según las Norma EPA 3051, la cuantificación de los elementos se realizó según Norma EPA 6010 (U.S. EPA, 2000; US-EPA, 2000).

Bioensayos: Se realizaron bioensayos con *D. magna*, *H. plagiodesmica* y *T. aestivum*. Se efectuaron 13 bioensayos por muestra, en 2 etapas. La primera etapa correspondió a la determinación de toxicidad de base (CE50cr) para cada una de las especies y, la siguiente etapa correspondió a la determinación de la toxicidad remanente en las submuestras manipuladas (Diagrama 3.1). La conservación de la toxicidad de base fue evaluada mediante repetición del ensayo de base junto con los ensayos post tratamiento. En caso de observarse una reducción significativa de la toxicidad de base no puede asegurarse la correcta conservación de las propiedades de la muestra y, por ende, no son válidos para comparaciones las toxicidades remanentes medidas. Por ésta razón, en éste caso TIE (U.S. EPA, 1991) recomienda descartar el muestreo problema y reemplazarlo por uno nuevo.

En el capítulo 2 se describen las condiciones específicas de mantenimiento de los cultivos y procedimiento de los bioensayos bajo condiciones estándar.

D. magna: Los ensayos para determinar toxicidad de base se realizaron por triplicado, con 10 neonatos (<24h) por concentración, en cambio los de determinación de toxicidad remanente se realizaron por duplicado, con una réplica del ensayo de base como control positivo de la toxicidad. Se evaluó inmovilización a las 48 h y, con éstos datos, se estimó CE50 a las 48 h. mediante el método PROBIT (G. Castillo Morales, 2004)

H. plagiodesmica: Los ensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones para ensayos de toxicidad aguda de Castillo Morales (2004) para *H. attenuata*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y, junto con los ensayos de para determinar toxicidad remanente, se repitió el ensayo de base como control positivo de la toxicidad. Se evaluó presencia de cambio letales y subletales y, por medio del método PROBIT, se estimó la CL50 y CE50, respectivamente, a las 96 h. (G. Castillo Morales, 2004)

T. aestivum: Los ensayos se realizaron mediante la adaptación del ensayo de toxicidad aguda de Castillo Morales (G. Castillo Morales, 2004) para semillas de *L. sativa*. Los ensayos se

realizaron por triplicado, en placas de Petri, con 10 semillas por placa. Como medio de dilución se utilizó agua dura reconstituida (Castillo Morales, 2004). Las placas se mantuvieron protegidas de la luz por un periodo de 120 h. Se evaluó la elongación de hipocotíleo y radícula, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento respecto del blanco.

Manejo de datos toxicológicos: Para mejor interpretación durante los análisis estadísticos multivariados, los parámetros toxicológicos estimados se transformaron en unidades tóxicas (UT). Se calculó el cambio de la toxicidad generado por cada manipulación respecto de la toxicidad original (Botts et al., 1988) por medio de la fórmula:

$$\text{Abatimiento Trat } i = \frac{UT_{cr} - UT_{trat } i}{UT_{cr}} \times 100$$

Donde:

$UT_{trat } i$ son las UT estimadas para la muestra sometida al tratamiento i

UT_{cr} son las UT estimadas para la muestra original (cruda)

Análisis estadísticos: Las comparaciones de puntos finales y tratamientos se realizaron mediante modelos lineales generales mixtos, en los cuales se consideró a las muestras como factor con efectos aleatorios. Para evaluar los supuestos de homocedasticidad de varianza y normalidad se realizaron gráficos de dispersión de residuos y pruebas analíticas (Shapiro-Wilks). Para obtener la estructura de varianzas más apropiada, cuando fue necesario, se utilizó el criterio de información Akaike. Finalmente se realizó el ANOVA del modelo que mostró el mejor ajuste y la comparación entre las medias se efectuaron mediante la prueba LSD- Fisher. Las correlaciones entre datos toxicológicos y los parámetros físico-químicos se estudiaron mediante el coeficiente Spearman. Los análisis estadístico y gráficos se realizaron mediante el software Infostat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011). También se evaluó la similaridad de las respuestas entre los bioensayos aplicados mediante análisis de clúster. Finalmente se llevó a cabo un análisis de correspondencias canónicas (CCA), para evaluar la relación entre datos toxicológicos y parámetros físico-químicos. Los análisis multivariados se realizaron mediante PCORD 6.0 (McCune and Mefford, 2011).

4.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN:

Caracterización fisicoquímica: La tabla 4.1 presenta las medidas de resumen para los parámetros fisicoquímicos determinados.

Variable	Media	D.E.	Min	Max	Decreto 2793/06
pH	6,8	0,9	5,3	8,9	6,5 -10
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	918,4	266,2	384	1493	s/r
DQO (mg O/L)	433	161	185	722	250
ST (mg/L)	715,8	172,9	421	1098	s/r
SST (mg/L)	250,5	53,3	185	402	s/r
SDT (mg/L)	465,2	150,9	196	794	s/r
SSF (mg/L)	173,1	55,3	80	327	s/r
SSV (mg/L)	77,46	30,2	25	189	s/r
SDF (mg/L)	209,1	131	13	549	s/r
SDV (mg/L)	256,1	64,9	113	384	s/r
SSe 10 m (mL/L)	1,1	0,6	0	2	Ausentes
SSe 120 m (mL/L)	1,4	0,7	0,4	3	1
SSe 24 h (mL/L)	2,1	0,9	0,9	4	s/r

Tabla 4. 1 - Parámetros fisicoquímicos determinados, Se indica media, DE, valor mínimo (Mín) y máximo (Máx) y se incluyen los límites establecidos en la regulación de vertidos de la normativa de la provincia de La Pampa Decreto N° 2793/06 – Anexo, sección A) Desagües a conducto pluvial abierto, curso de agua superficial elemental cerrada y cursos de agua no permanente. s/r: indica parámetro sin regulación provincial.

La DQO presentó valores elevados. Sin embargo, dentro de lo esperado para el tipo de muestra. También se detectó un importante contenido de ST y, dentro de estos la mayor parte se encontró en la fracción disuelta. Respecto a los SS, se identificó que la mayor parte corresponde a SSF, en relación a SSV. Los SD se componen en partes similares de SDF y SDV. En todas las muestras se detectó SSe 10m y se cuantificó un contenido variable de SSe a mayor tiempo.

Estudios previos en el mismo sitio de muestreo determinaron una conductividad de 972 $\mu\text{S/cm}$ y un pH de 7,5-8,3, acorde a los resultados obtenidos en la actualidad. Los resultados también se condicen con los reportados para otros ELUs (Di Marzio et al., 2005; Polls et al., 1980).

Los resultados obtenidos para DQO están dentro del rango medido en la planta de tratamiento local, previo a su canalización y transporte (Muñoz et al., 2007) y también son similares a los

reportados para vertidos al Río Luján (Di Marzio et al., 2005). Sin embargo, otros autores publican niveles más bajos de DQO en ELUs con tratamiento (Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadzianas et al., 2003; Santos et al., 2010) y los niveles se corresponden más a aguas residuales con escaso tratamiento. A su vez, de acuerdo a los límites establecidos por el Decreto N° 2793/06 reglamentario de la Ley 1914, Ley Ambiental de la provincia de La Pampa, el 83% de las muestras presentaron DQO por encima del límite recomendado. Respecto a los demás parámetros regulados, 67% de muestras superaron los niveles permitidos para SSe 10m. y 30% para SSe 120m. Así, para el periodo muestreado, solo 1 muestra cumple con lo establecido por el decreto N° 2793/06.

En estudios previos realizados en las plantas de tratamiento de La Pampa, Muñoz et al (2007) identificaron dentro de las causas de la falta de eficiencia a problemas de dimensionalidad, falta de capacitación del personal de mantenimiento o falta de mantenimiento (retiro de lodos que afectan al volumen y tiempo de residencia). Debido a la falta de acceso para tomar muestras de los ELUs sin tratamiento carecemos de información acerca de los niveles de los éstos parámetros en los ELUs ingresantes a la PT Norte y de la eficiencia del tratamiento aplicado. No obstante, teniendo en cuenta lo reportado por Muñoz et al (2007), Pratts (2011) y los resultados actuales podemos considerar que se mantienen las deficiencias en el tratamiento, y esto se manifiestan principalmente en altos contenidos de DQO y presencia de SSe a corto plazo.

En la tabla 4.2 se presentan los contenidos medios de metales y las figuras 4.3 y 4.4 muestran la variación intermuestra. Los gráficos fueron particionados teniendo en cuenta la concentración media de los metales, por un lado, aquellos con concentraciones inferiores a 0,1 mg/L (Figura 4.3) y por otro lado aquellos que se detectaron en concentraciones superiores (Figura 4.4).

Variable	% detec	LD	Media	D.E.	Mín.	Máx.	Referéncia		Decreto 2793/06
							Canal PI S	Canal PI N	
Fe	100	0,024	0,54	0,25	0,25	1,16	s/r	s/r	s/r
Al	100	0,014	0,24	0,19	0,05	0,93	s/r	s/r	s/r
Mn	100	0,003	0,1	0,09	0,03	0,48	s/r	s/r	s/r
Cr	100	0,007	0,01	0	0,01	0,01	0,003	0,003	0,5
Cu	21	0,003	0,02	0,02	0,003	0,06	0,006	0,017	s/r
Zn	4	0,074	0,09	0	0,09	0,09	0,17	0,157	s/r
Pb	4	0,014	0,01	0	0,01	0,01	<0,005	<0,005	0,5
As	0	0,026	<LD	-	<LD	<LD -	s/r	s/r	0,5
Cd	0	0,007	<LD	-	<LD	<LD	<0,002	<0,002	s/r
Ni	0	0,4	<LD	-	<LD	<LD	s/r	s/r	s/r

Tabla 4. 2 - Se presentan medidas de resumen para la variación quincenal de la concentración de metales (mg/L) y porcentaje de detección sobre 24 muestras de ELUs. Como referencia se incluye el límite para el vertido de efluentes a cuerpos de agua cerrados regulados según Decreto 2793/06 reglamentario de la Ley 1914, La Pampa y

las concentraciones reportadas por Pratts (2011) para los canales de descarga de líquidos tratados correspondientes a planta Sur (S) y Norte (. N). s/r: sin referencia.

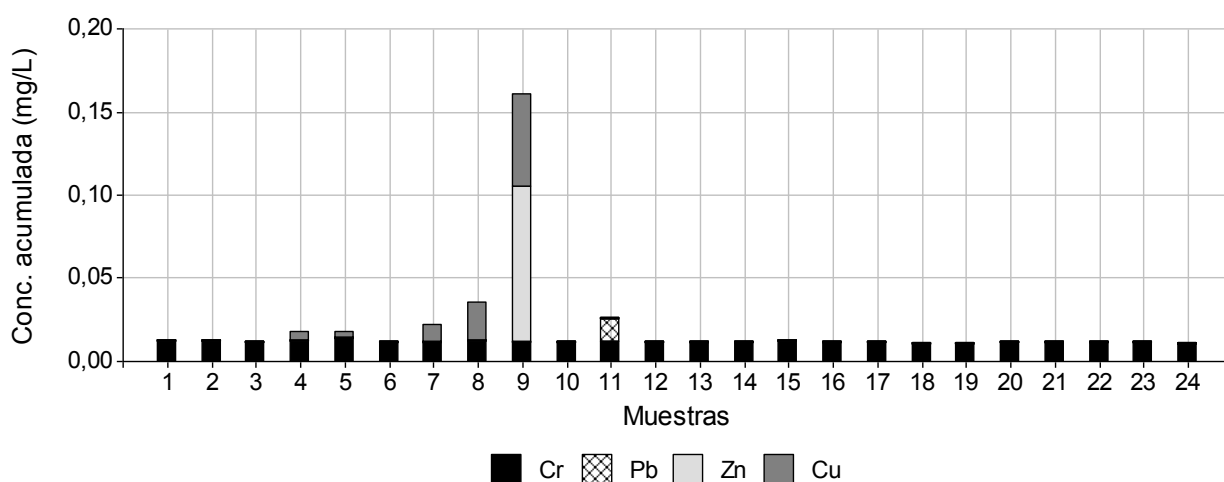


Figura 4. 3- Concentración (mg/L) de cromo, plomo, zinc y cobre en muestras de ELUs para 24 muestras obtenidas quincenalmente durante un año de muestreo.

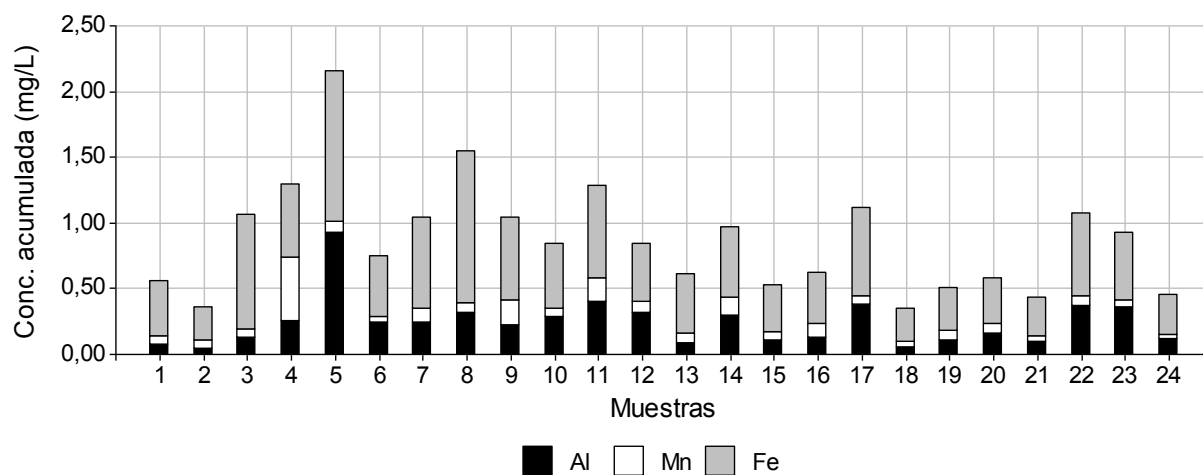


Figura 4. 4- Concentración (mg/L) de aluminio, manganeso y Hierro en muestras de ELUs para 24 muestras obtenidas quincenalmente durante un año de muestreo.

Para el periodo estudiado se observa alta frecuencia de detección para Al, Mn, Fe y Cr, que se detectaron en todas las muestras, con importantes fluctuaciones intermensuales a excepción del Cr que mantuvo niveles constantes. A diferencia de éstos, las detecciones de Pb, Zn y Cu que fueron aisladas y no se detectaron niveles cuantificables de Ni, Cd ni As.

Al comparar las concentraciones con el registro existente para los canales de descarga de las 2 plantas de tratamiento locales, se observa que incrementan las concentraciones de Cr levemente, Cu y Cd se mantienen en niveles similares y Zn disminuyó considerablemente. Para el Pb, la concentración detectada actualmente fue superior, sin embargo, se lo detectó sólo en una muestra (Pratts. 2011). Las concentraciones se mantuvieron siempre dentro de los límites permitidos para vertidos por la normativa provincial.

Las concentraciones detectadas son comparables a las reportadas por Karvelas (2003), Marín Galvin (2016), Chung (2011), Manuzadsiana (2003), Teijón (2010), Drozdova (2015) para los metales estudiados en general, excepto para Zn y Pb, que se detectaron en forma aislada. En particular, las concentraciones detectadas fueron inferiores a las reportadas para Cd y Cu en aguas residuales de Irán (Rezapour et al., 2019), para Mn y Fe en aguas residuales de República Checa (Drozdova et al., 2015) y para Pb y Cr en aguas residuales de México (Perez Días et al., 2016). La gran variación en las detecciones de Cu y Zn fue observada en estudios en Polonia (Chipasa 2003). Debido a la baja sensibilidad de la determinación de Ni (LD=0,4 mg/L) los resultados no son comparables con otros registros, debido a que, en la mayoría de las muestras, se encontró por debajo de nuestro LD.

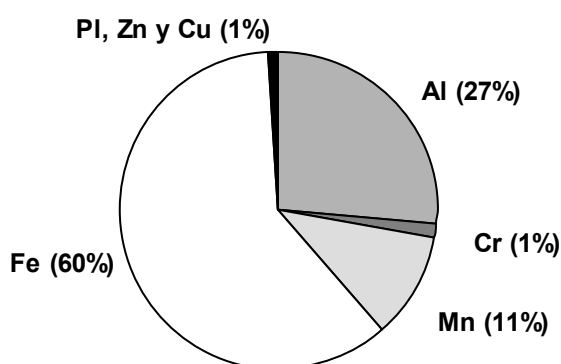


Figura 4. 5 - Composición porcentual de metales

La figura 4.5 presenta la composición porcentual de los metales cuantificados. Al comparar el resultado con los datos compilados por Cantinho et al (2016) se evidencia que el ELUs estudiado presenta una composición particular con una carga proporcional muy baja de Zn y Cu. En particular se destaca un contenido considerable de Al y bajos niveles de As. Esta última observación se debe al aporte mayoritario de agua del Río Colorado, con alto contenido de Al y un bajo aporte de aguas subterráneas locales, con importantes niveles de As, en el sistema de red de la ciudad.

El bajo contenido de metales detectado evidencia el origen netamente urbano del efluente con mínimo aporte industrial y la variabilidad temporal ha sido observada por otros autores y responde a patrones de uso/actividad humana (Mansourri and Madani, 2016; Üstün, 2009). Los resultados también permitieron observa alta correlación positiva entre las concentraciones de Al y Fe (0,72) y moderada para Cu y Cr (0,59), esto puede atribuirse a la existencia de fuentes comunes para estos metales. Los ELUs estudiado se compone en parte de los efluentes pluviales, por lo que parte de la carga de metales se asocia al parque automotor (Cu, Zn, Cr, Pb) y a

deposiciones atmosféricas (Bergback et al., 2001; Sorme and Lagerkvist, 2002). El Cr se mantuvo constante en durante todo el año, lo que indica un aporte invariable de este metal.

Los sistemas convencionales de tratamientos de ELUs, en general y el sistema evaluado en particular, no han sido desarrollados con el objetivo de remover la carga de metales. En trabajos que estudiaron el destino de los metales durante el tratamiento se observa que la reducción de metales en los ELUs final se corresponde a un desplazamiento de la carga hacia los lodos (Cantinho 2016). Debido a la falta de acceso para tomar muestras de los ELUs sin tratamiento carecemos de información acerca de la eficiencia del tratamiento aplicado.

Toxicidad: En las figuras 4.6; 4.7 y 4.8 se representan las CL50 y CE50 obtenidas por exposición de *D. magna*, *H. plagiodesmica* a los ELUs estudiados. También se indica la CL50 y CE50 resultante para las submuestras aireadas y filtradas, con diferentes tamaños de poro, para los ensayos seleccionados. En la figura 4.9 se representa la inhibición de crecimiento de hipocotíleo y radícula durante la germinación de semillas de *T. aestivum*.

Para el ensayo letal con *D. magna* la CL50 media de los ELUs fue 51,6%, la muestra más tóxica correspondió a la muestra 4 (27%) y la muestra menos tóxica correspondió a la muestra 17 (91,5%). Los ensayos letales con *H. plagiodesmica* arrojaron una CL50 media de 38%, para este punto final la muestra más tóxica fue la muestra 5 (17,7%) y la menos tóxica fue la muestra 15 (62,2%). Durante el ensayo subletal con *H. plagiodesmica* la toxicidad media fue 14%, la muestra 9 fue la más tóxica (7,4%) y la 18 la menor (29,6%).

Para *T. aestivum* las mismas muestras presentaron baja toxicidad y los resultados obtenidos permitieron estimar la CI₅₀ solo para el 21% de las muestras y se mantuvo dentro del rango 79,5-84,7% para inhibición de crecimiento del hipocotíleo y 72,1-83,8% para la radícula. Para el resto de las muestras los niveles de inhibición observados fueron inferiores y, por ésta razón, se representa gráficamente solo el porcentaje de inhibición generado por exposición a la muestra original.

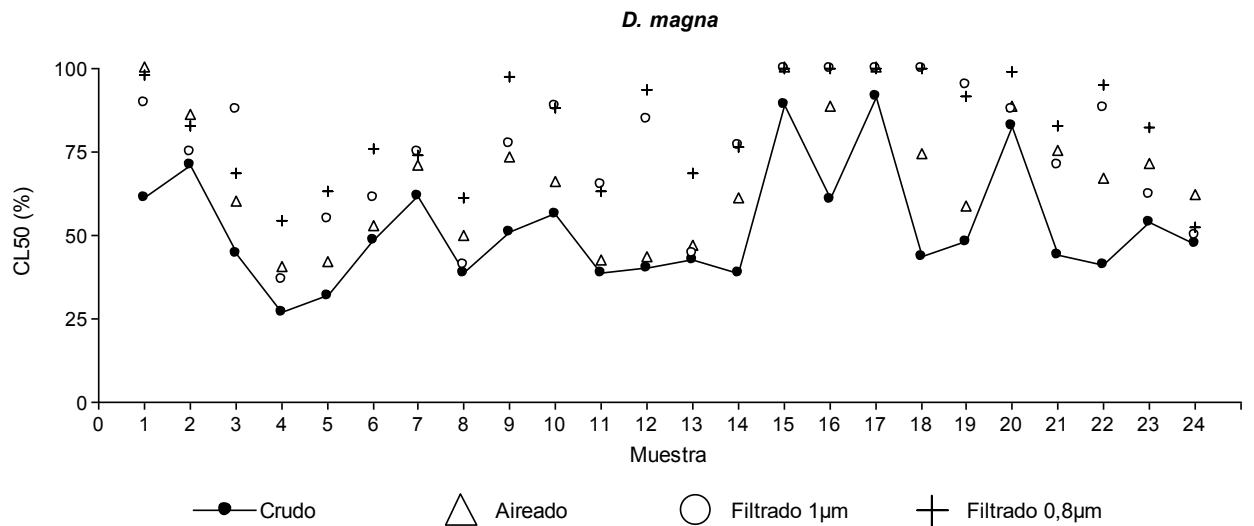


Figura 4. 6 - Se representa la CL50 (%) para *D. magna* de los residuos urbanos líquidos y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,8 µm).

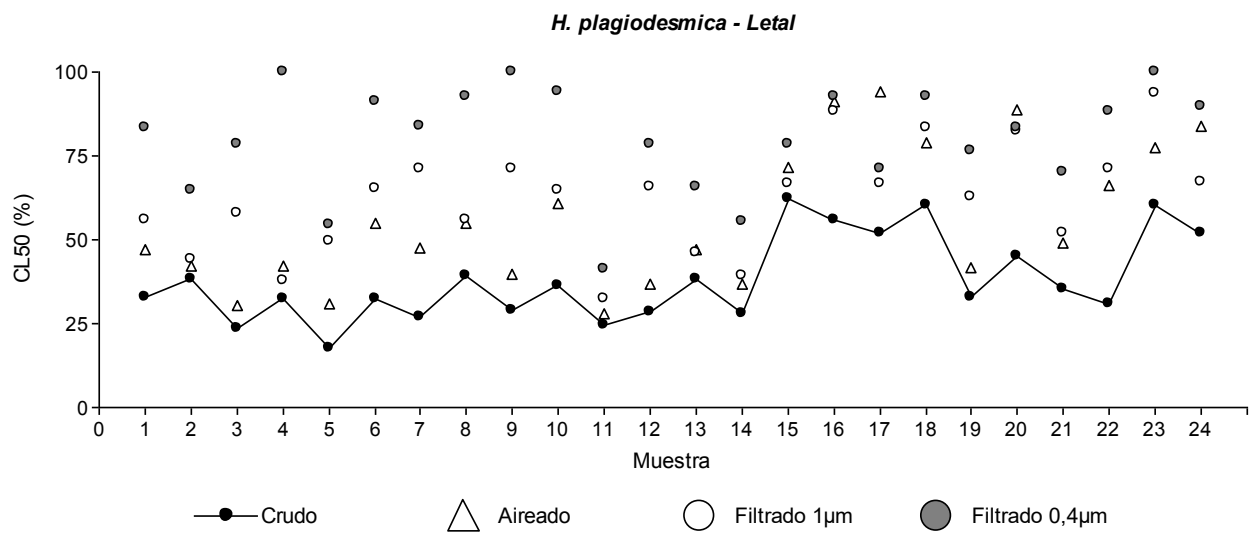


Figura 4. 7 - Se representa la CL50 (%) para *H. plagiodesmica* de los residuos urbanos líquidos y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).

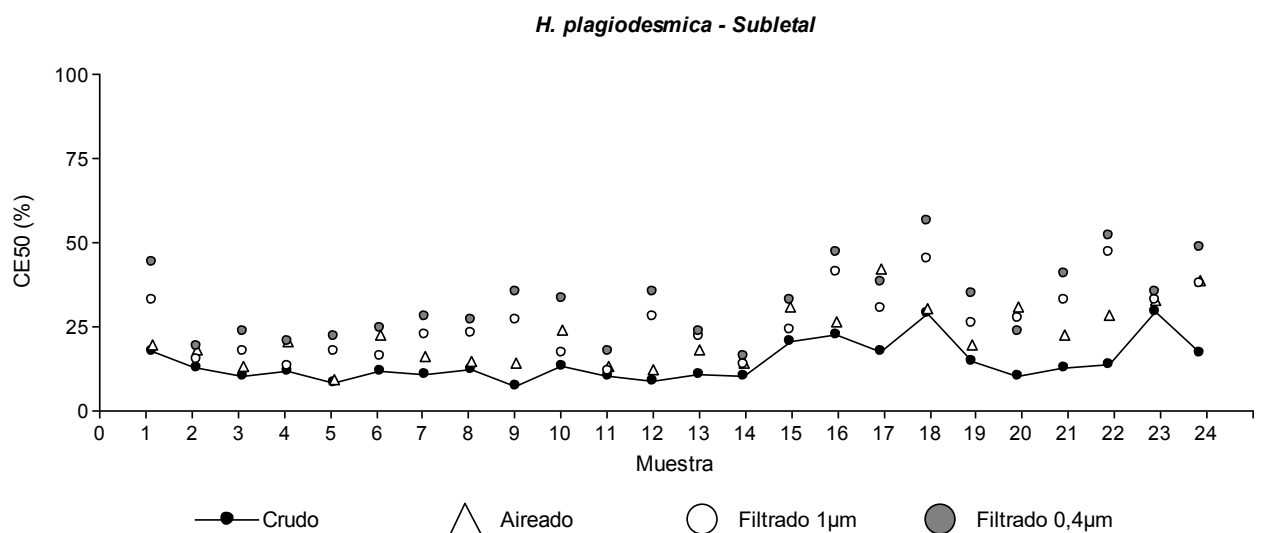


Figura 4. 8 - Se representa la CE50 (%) para *H. plagiodesmica* de los residuos urbanos líquidos y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).

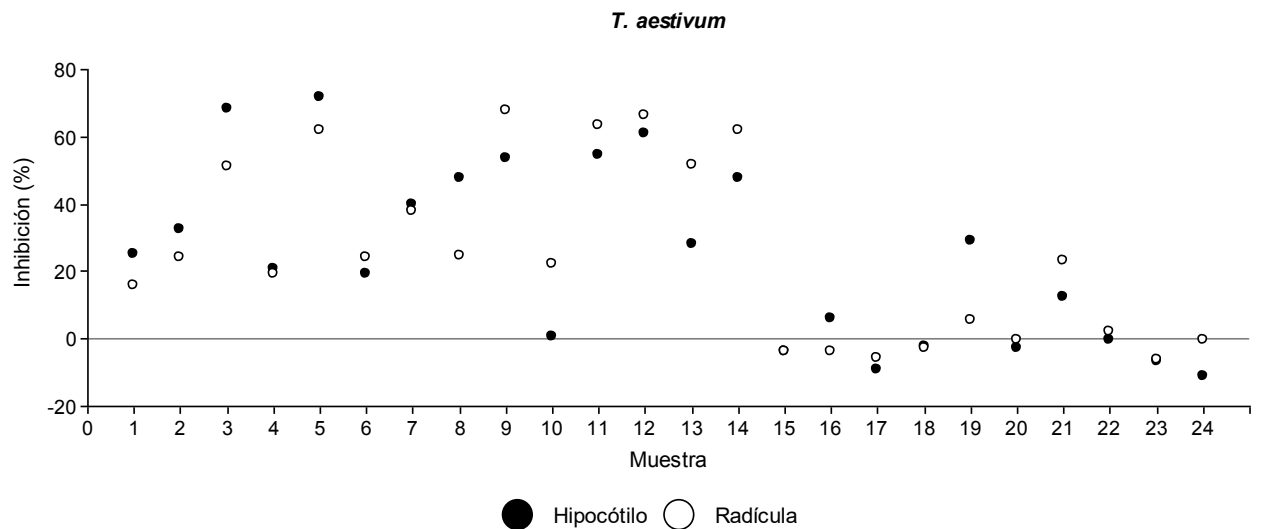


Figura 4. 9 - Inhibición de la elongación (%) del hipocótilo y radícula de semillas de *T. aestivum*.

Para *D. magna* los resultados son similares a otros obtenidos en aguas residuales urbanas de similares características. En estudios realizados sobre vertidos de ELUs al río Lujan, la CE50 se mantuvo entre 17 y 100% (Di Marzio et al., 2005). En muestras de Europa la CE50 se mantuvo entre 10 y 70% para ELUs sin tratamiento y mayor al 60% para aquellos tratados (Hernando et al., 2006b) y para España se reportaron CE50 entre 8 y 62% para líquidos con tratamiento (Aguayo et al., 2004). Trabajos en Portugal reportan CE50 entre 28 y >90% (Mendonça et al., 2013).

La baja inhibición observada para *T. aestivum* es similar a la respuesta observada Liwarska-Bizukoje and Urbaniak (2007) quienes reportan bajos niveles de inhibición ante la exposición a aguas residuales. Otros autores, en estudios similares con semillas de *L. sativa* concluyen que la elongación de hipocotileo y radícula no resultan ser los mejores indicadores para éste tipo de muestras (Oberholster et al., 2008)

Al comparar la respuesta obtenida con los ensayos de referencia (efluente crudo), surge que las sensibilidades a los ELUs crudos fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$) para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*, letal y subletal. En tanto el test subletal con *H. plagiodesmica* fue el indicador más sensible. Otros autores ya han reportado mayor sensibilidad del género *Hydra* frente a *D. magna* en el estudio de aguas residuales (Bohórquez-Echeverry et al., 2012; Castillo Morales et al., 2000; Oberholster et al., 2008). No obstante, *D. magna* se reporta en varios trabajos como un muy buen indicador de toxicidad, que responde a una gran variedad de productos químicos, con una sensibilidad marcadamente más alta que otras especies (Aguayo et al., 2004; Hernando et al., 2005; Martins et al., 2007; Mendonça et al., 2013; Tyagi et al., 2007)

y con capacidad de detectar tóxicos en concentraciones inferiores a 1 ng/L (Hernando et al., 2005).

De acuerdo a una escala de toxicidad arbitraria aplicada por otros autores (Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003) se clasificó la toxicidad de los residuos como: No tóxico < 1 UT, tóxico 1 – 10 UT, muy tóxico 11 – 100 UT, extremadamente tóxico > 100 UT. En relación a las toxicidades medidas los ELUs estudiados se pueden considerar, en todos los casos, como tóxicos para *D. magna* e *H. plagiodesmica*. Mientras que para *T. aestivum* el 79% de las muestras fue no tóxica. Nuestros resultados muestran una mayor proporción de muestras tóxicas en relación a otros estudios en los que los ELUs presenta un porcentaje variable de muestras no tóxicos (Deng et al., 2017; Di Marzio et al., 2005; Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003; Mendonça et al., 2013). Los niveles de toxicidad medidos indican que los efluentes, al momento de su descarga, mantienen una importante carga de componentes tóxicos.

Para el periodo de tiempo estudiado, la única muestra que cumple con los requerimientos normativos para vertido según el Decreto 2793/06 reglamentario de la Ley provincial N° 1914, La Pampa, se identificó como Tóxica para *D. magna* (1UT) e *H. plagiodesmica* (letal: 1,9 UT y subletal: 5,7 UT) y resultó No Tóxica para *T. aestivum*. Ya ha sido observado en otros trabajos que residuos líquidos en Argentina que cumplen con los requerimientos para su vertido son caracterizados, de igual manera, como Tóxicos (Botts et al., 1988; Di Marzio et al., 2005)

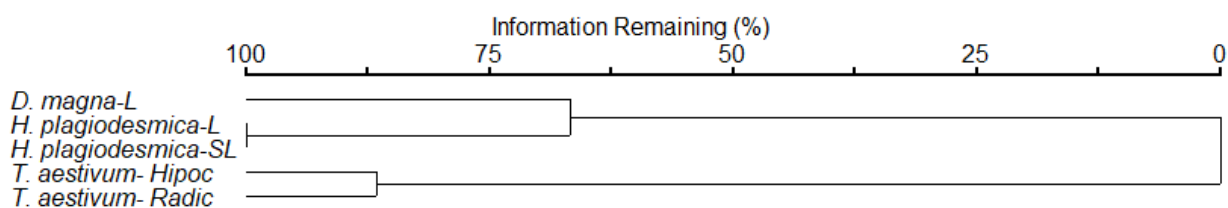


Figura 4. 10 – Análisis de clúster para los 5 puntos finales de los bioensayos aplicados. Método de ligar: Método de Ward. Distancia: Euclídea relativa.

El ajuste de la selección de bioensayos que constituyen una batería de bioensayos puede ser hecha mediante análisis multivariado (Bohórquez-Echeverry et al., 2012; Di Marzio et al., 2005; Pandard et al., 2006). La figura 4.10. presenta el resultado del agrupamiento en clúster realizado con los datos de toxicidad obtenidos para cada bioensayo. Los resultados indican una alta semejanza para los puntos finales letal y subletal de *H. plagiodesmica*. A su vez, se observa una marcada separación entre los ensayos con *H. plagiodesmica* y con *D. magna*. Luego se observa una asociación esperable para los dos puntos finales considerados en el ensayo con *T. aestivum* (radícula e hipocótilo), pero éstos se diferencian completamente del resto de la información

generada. Éstos resultados son de utilidad para seleccionar entre los ensayos considerados aquellos que podrían componer una batería óptima, así para los ELUs estudiados *D. magna* e *H. plagiodesmica* son bioindicadores efectivos de la presencia de tóxicos. Se sugiere que en futuros estudios se evalúen otras especies con el fin de reemplazar el bioensayo con *T. aestivum* por otro más sensible, teniendo en cuenta que la separación indicada en el clúster responde a su falta de sensibilidad a los tóxicos presentes en los ELUs estudiados.

Toxicidad remanente: Todas las manipulaciones aplicadas generaron cambios en la toxicidad de las submuestras. La figura 4.11 indica la toxicidad remanente en las submuestras manipuladas, y la figura 4.12 representa los abatimientos de toxicidad generados por las manipulaciones para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*.

La CE50 para *D. magna* luego de airear, filtrar con 1µm. y con 0,8 µm. fue $67,3\pm 19,1\%$; $74,6\pm 19,6\%$ y $82,3\pm 19,8\%$ respectivamente. Estos cambios implicaron abatimientos de la toxicidad del 22% para la aireación, 27% para el filtrado con 1 µm y 35% para el filtrado con 0,8µm. Las modificaciones disminuyeron el porcentaje de submuestras tóxicas así, se eliminó la toxicidad en el 12% de las submuestras luego de airear, y en el 17% y 46% respectivamente luego de los filtrados con 1 µm y 0,8 µm.

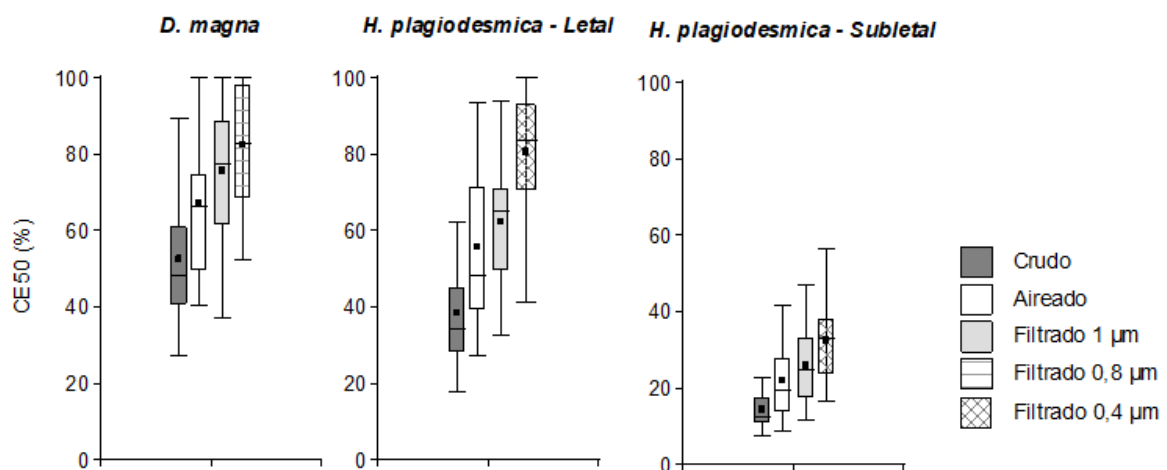


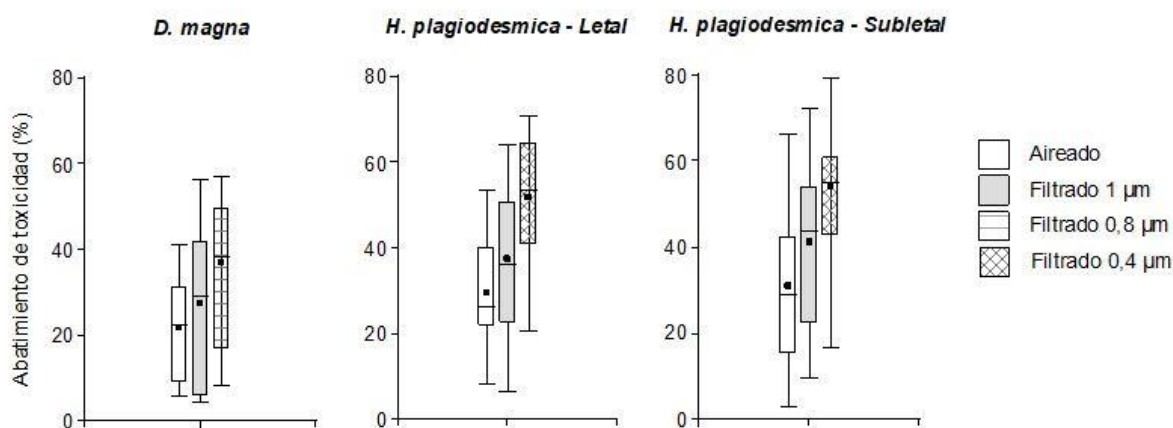
Figura 4. 11 - CE50 para residuos urbanos líquidos y CE50 remanente en las submuestras manipuladas con i) aireación, ii) Filtrado 1 µm, iii) Filtrado con 0,8 µm y iv) Filtrado con 0,4 µm. Se indica media \pm 3 SD.

Figura 4. 12 - Abatimientos de toxicidad (%) estimados para cada punto final y manipulación aplicada.

Para el ensayo letal con *H. plagiodesmica*, las CE50 luego de airear fue del $55,4\pm 12,7\%$, mientras que en las submuestras filtradas con 1 µm y 0,4 µm fue de $62,1\pm 15,9\%$ y $80,2\pm 15,6\%$.

De ésta manera se

generaron



abatimientos del 29% de la toxicidad mediante aireación, 37% con el filtrado con 1µm y 52% para el filtrado con 0,4µm. Sin embargo, solo se eliminó la toxicidad en el 12,5% de las submuestras filtradas con la malla de 0,4µm. Al analizar los resultados obtenidos en los ensayos subletales se observan abatimientos medios similares al del ensayo letal (aireación: 30,8%; filtrado 1µm: 41% y filtrado con 0,4µm: 54%).

Los test de comparaciones de medias para evaluar diferencias entre toxicidad cruda y el remanente de toxicidad luego de los tratamientos de aireación y filtrado, aplicados por separado para cada punto final, indicaron que, para todos los bioensayos, los tratamientos realizados generaron cambios significativos en la toxicidad de las muestras manipuladas respecto a la toxicidad de las muestras crudas ($p < 0,0001$ en cada punto final empleado).

El test de comparación del abatimiento por aireación no indica diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas obtenidas para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*, letal y subletal. Sin embargo, el valor p obtenido es marginal ($p = 0,07$), por lo que los ensayos parecen generar información redundante respecto a la magnitud del abatimiento causado por la aireación.

Respecto al abatimiento generado por filtrado con 1 µm se observaron diferencias significativas entre los puntos estudiados ($p = 0,004$). La prueba LSD de Fisher indicó que el abatimiento indicado para los ensayos con *H. plagiodesmica* (letal y subletal) no fue significativamente distinto, pero si éstos difieren del abatimiento indicado para el ensayo letal con *D. magna*. Para esta manipulación el uso de ambas especies permite identificar cambios en el abatimiento asociados a la sensibilidad específica de los organismos.

Para *D. magna*, se evaluó también la toxicidad luego de aplicar filtros con tamaño de poro de 0,8; 0,4, 0,2 µm y SPE. La mayoría de esos tratamientos generó submuestras no tóxicas

(CE50>100%). Por esta razón no puede ser estimado el abatimiento de la toxicidad y los resultados obtenidos se analizaron en función de la mortalidad media causada en las submuestras puras (100%). Los resultados se presentan en la figura 4.13.

Los filtrados con 1; 0,8 y 0,4µm presentaron menor toxicidad respecto a la muestra cruda, si bien el 87%, 59% y 46% de estas sub-muestras, respectivamente, se mantuvieron dentro de la clasificación de toxicidad como tóxicas. En las submuestras filtradas con 0,2 µm y tratadas con SPE se observó alta proporción de muestras no tóxicas (87 y 100% respectivamente). La comparación entre tratamientos indicó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Todos los tratamientos reducen la toxicidad, sin embargo, el filtrado con 0,2µm y la SPE la eliminan.

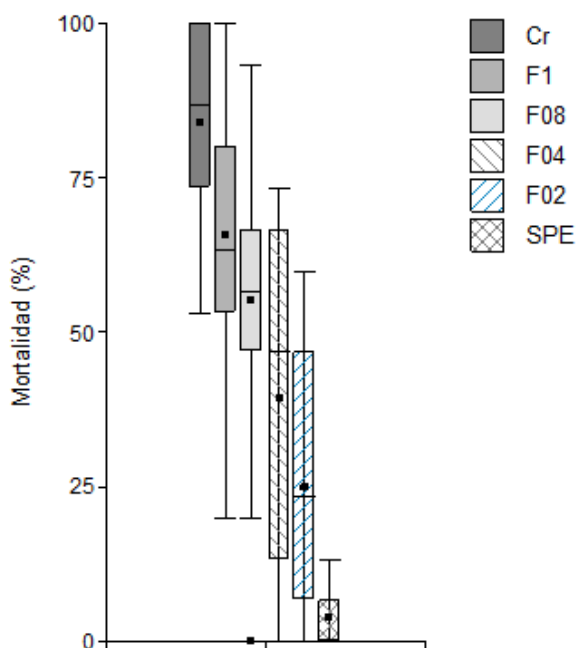


Figura 4. 13 - Mortalidad media (%) para las muestras originales y las submuestras manipuladas mediante aireación, filtrados con mallas de 1 µm (F1), 0,8 µm (F08), 0,4 µm (F04) y 0,2 µm (F02) de tamaño de poro y extracción en fase sólida (SPE).

La heterogeneidad de los abatimientos ante una misma manipulación indica que la composición de la carga tóxica es variable entre muestras. Nuestros resultados muestran que los sólidos suspendidos aportan significativamente a la toxicidad. Sin embargo, no es posible asociar la carga tóxica a una única fracción en particular. La no toxicidad observada al combinar el filtrado con poro 1µm y SPE evidencia la importancia de los sólidos suspendidos de mayor porte y de los

compuestos orgánicos no polares y/o complejos órgano-metálicos retenidos por SPE, como aquellos componentes que aportan a la toxicidad global.

La marcada diferencia de toxicidad entre las fracciones aireadas y la fracción post-SPE puede indicar presencia de compuestos orgánicos persistentes o bien que la aireación también se generó productos de degradación tóxicos o aumentó la biodisponibilidad de los metales. Si bien el resultado final indica que durante la aireación se redujo significativamente la toxicidad global del efluente, esto no obsta que otros cambios se hayan dado y que, en conjunto, indiquen una disminución de la toxicidad.

Otra posible causa es que los compuestos orgánicos no degradados durante la aireación, pero si retenidos en la SPE muestren efectos sinérgicos en combinación con los demás componentes. En estudios previos la sola incorporación de un tóxico a concentración baja a generado cambios en la toxicidad de efluentes clasificados como no tóxico, aun cuando el componente fue agregado en concentraciones bajas ($\mu\text{g/L}$) para las cuales no se esperaban efectos tóxicos individuales (Hernando et al., 2005).

Estudios similares reportan resultados que demuestra la utilidad práctica del método empleado para señalar las fracciones que aportan a la toxicidad y generar información acerca de posibles tratamientos que permitan reducir la toxicidad de los ELUs durante su tratamiento. En EE.UU. Botts et al. (1988) reportaron aguas residuales en las cuales la eliminación de los sólidos suspendidos ($>1\mu\text{m}$) removió la mayor parte de la toxicidad aguda (30-70%). El abatimiento que los autores reportan es mayor al que observamos en nuestros resultados a pesar de que el contenido de SST era ampliamente menor. A su vez la aireación generó cambios, aunque en menor medida. Los resultados de este trabajo coinciden con los nuestros en indicar a la fracción orgánica no polar, principalmente suspendida, como la responsable de la mayor carga tóxica. En estudios desarrollados en Finlandia, la toxicidad de muestras de aguas residuales disminuyó con filtrado (10-40%) y con aireación (20-50%), mientras que la SPE generó los mayores cambios ($>80\%$), estos resultados son ampliamente coincidentes con los obtenidos en nuestro trabajo, aunque los efluentes presentaban menores niveles de SST, DQO y conductividad (Pessala et al., 2004). Otros estudios realizados en ELUs de EE.UU. presentaron también reducción de la toxicidad en submuestras aireadas, sin embargo no se observaron grandes cambios al filtrar con $1\mu\text{m}$ (DiGiano et al., 1992). Otros estudios presentan aguas residuales que no indican cambios de toxicidad por filtrado ni aireación para *D. magna*, pero si observaron cambios, principalmente post-SPE, con otras especies (Hutchings et al., 2004).

La eliminación de la toxicidad generada por la SPE y por el filtrado con 0,2 μm ha sido reportada por varios autores (U.S. EPA, 1999). Estudios realizados en aguas residuales de Indiana, mostraron que el filtrado con 0,22 μm redujo la toxicidad de 2,5 1,3 UT para *C. dubia*, mientras que el filtrado con 1 μm generó un mínimo descenso. Para estos mismos efluentes, la SPE eliminó la toxicidad de las muestras y la aireación la redujo, un comportamiento similar al obtenido en nuestros resultados. Observaciones similares fueron hechas en plantas de tratamiento de Hollywood, Largo y Akron. A su vez los resultados obtenidos también coinciden en gran parte con aquellos obtenidos en California, en los cuales también fue la SPE la manipulación que generó los mayores cambios de toxicidad en las muestras, mientras que la aireación y filtrado generaron cambios en menor proporción. Otros reportes de remoción de toxicidad por SPE fueron hechos por DiGiano (1992), Carr et al. (2001) y Maya et al. (2018).

Toxicidad de la carga metálica: Al incorporar EDTA en las muestras se observaron cambios en la toxicidad para *D. magna* (Figura 4.14). En el 37,5% de las muestras el agregado de EDTA incrementó la toxicidad o no generó un descenso significativo, lo que indica baja biodisponibilidad de metales. Mientras que, en el resto de las muestras (62,5%) el agregado de EDTA disminuyó la toxicidad considerablemente para al menos una de las alícuotas aplicadas. Los máximos abatimientos observados, para éstas muestras, fueron del $38 \pm 13\%$.

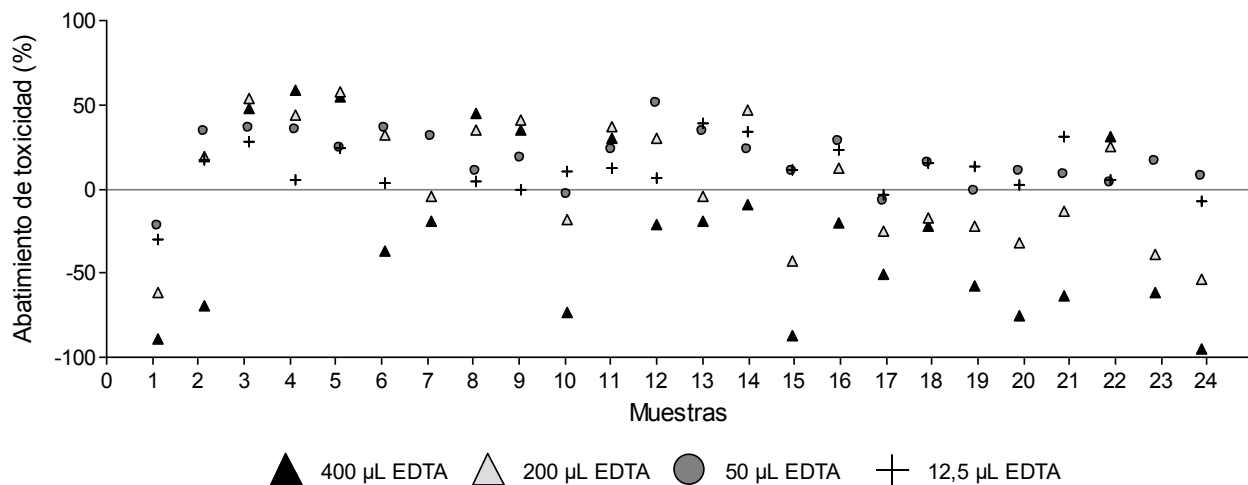


Figura 4. 14 - Abatimiento de toxicidad generado al incorporar 4 alícuotas de EDTA. Los abatimientos negativos indican incremento de la toxicidad.

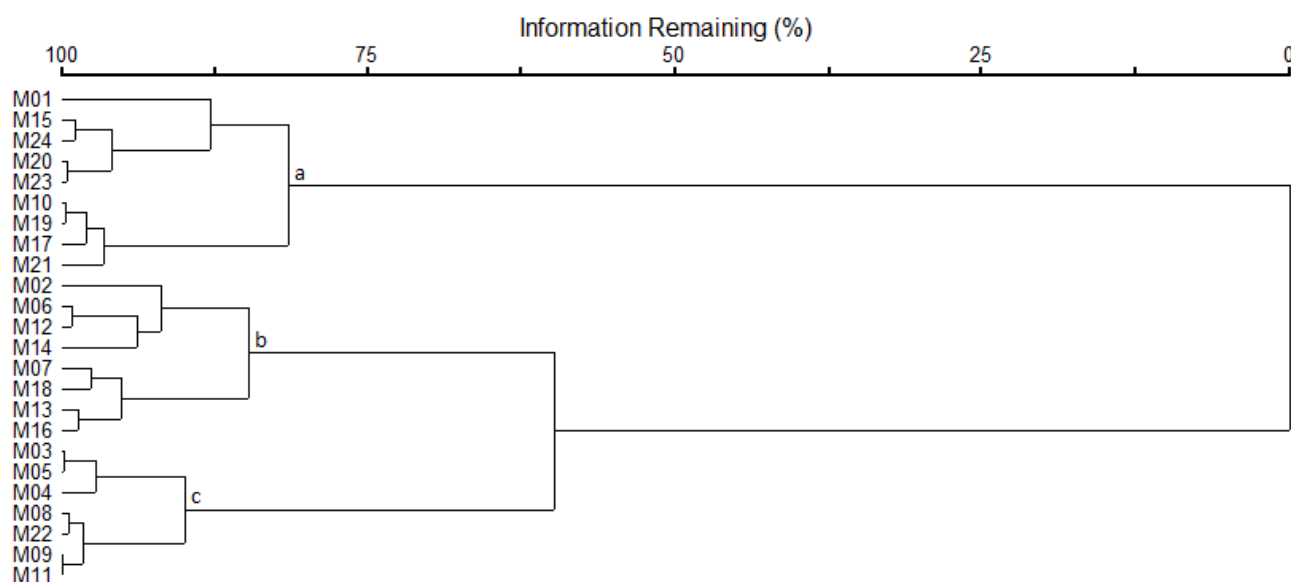


Figura 4. 15 - Agrupamiento según cambio relativo de toxicidad generado por la incorporación de EDTA al ensayo letal con *D. magna*. Método de ligar: Método de Ward. Distancia: Euclídea. El agrupamiento permite identificar 3 grupos de muestras que se indican con las letras a, b y c.

Con los resultados obtenidos luego del agregado de EDTA, se llevó a cabo un agrupamiento en clúster (Figura 4.15). El análisis permite diferenciar tres grupos de muestras. El primer grupo (a) corresponde a muestras con bajo contenido de metales biodisponibles, por lo que el agregado de EDTA generó incrementos de la toxicidad y sólo en algunos casos se observó descenso de la toxicidad para el agregado de la menor alícuota de EDTA. El segundo grupo (b) corresponde a muestras en las que al agregar los niveles de EDTA más bajos se observó un descenso de la toxicidad, sin embargo, el agregado de EDTA en mayor cantidad generó un aumento de toxicidad. El último grupo (c) se integra por muestras que presentaron los mayores descensos de toxicidad ante el agregado de EDTA.

Según estos resultados evaluados en conjunto, se puede asumir que uno de los factores causantes de la toxicidad global se debería a la presencia de complejos organometálicos, afirmación que puede ser válida para una importante proporción de los ELUs estudiados.

Para los casos en los que las submuestras con EDTA resultaron menos tóxicas que las muestras originales, se buscó asociación entre las variables mediante análisis multivariado. Los altos abatimientos de toxicidad generados por la incorporación de la mayor alícuota de EDTA se asociaron a altas concentraciones de aluminio, cromo, hierro y cobre (Figura 4.16).

De acuerdo al reporte de Sorvari and Sillanpää (1996), las concentraciones determinadas para Cu fueron equivalentes a la CE50 para *D. magna*, aunque para Mn, Fe, y Zn se encontraron por debajo de las CE50 individuales estimadas (CE50 para *D. magna* Cu: 0,022 mg/L Mn:56 mg/L; Fe:16 mg/L; Zn: 5,5 mg/l). Esto último no quita la posibilidad de interacciones entre los

contaminantes que generen efectos nocivos aún en concentraciones por debajo de las CE50 individuales

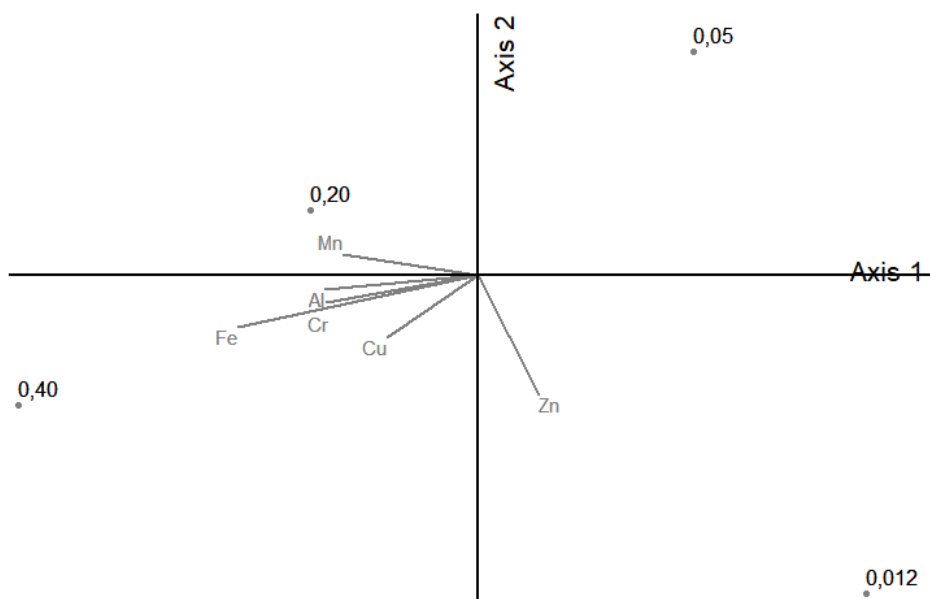


Figura 4.16 – Análisis de correspondencias canónicas realizado sobre los abatimientos, estimados para cada agregado de EDTA, y datos fisicoquímicos explicativos. El análisis explica el 53,3% de la variabilidad de los datos (eje 1: 45,4; eje 2: 8%)

La reducción de la toxicidad producida por la adición de EDTA fue reportada en ELUs de Michigan, EE.UU. (U.S. EPA, 1999). En ese caso se asoció también a remoción de la toxicidad por SPE, y mediante estudios complementarios determinó que los responsables de la mayor parte de la toxicidad eran complejos organometálicos. Otros autores que reportan descenso de la toxicidad tras la incorporación de EDTA son Bailey et al. (1995) Carr et al. (2001), Hutchings et al (2004) Pessala et al. (2004).

La CE50 de EDTA para *D. magna* es de 600 mg/L (Sorvari and Sillanpää, 1996). En las submuestras que se observó incremento de la toxicidad ante el agregado de EDTA, la incorporación siempre fue menor a su CE50 individual. Así, el incremento de toxicidad puede deberse a la ocurrencia de efectos tóxicos asociados al EDTA en combinación con la matriz. Resultados similares se han encontrado en otros estudios de aguas residuales (DiGiano et al., 1992; Pessala et al., 2004). Sorvari and Sillanpää (1996) indican que el agregado de EDTA incrementa la toxicidad en muestras con hierro o cobre, esto se contradice con la asociación hecha entre altos abatimientos de toxicidad generados por la incorporación de la mayor alícuota de EDTA y altas concentraciones de aluminio, cromo, hierro y cobre.

Tal como se ha visto en otros trabajos, la baja toxicidad de muestras con alto contenido de metales (Magdaleno et al., 2014) puede estar asociada a efectos antagónicos con otros

componentes, alto contenido de materia orgánica coloidal y la presencia de complejos orgánicos que limitan la biodisponibilidad de los metales, dado que la toxicidad de los mismos en el medio acuático estaría relacionada directamente a la concentración de iones metálicos libres. Las altas DQO observadas en las muestras refuerzan este punto. Otros estudios desarrollados en las aguas del río Matanza-Riachuelo, han obtenido resultados similares donde muestras con elevado contenido de metales presentan baja toxicidad para algas (Magdaleno et al, 2014). Los autores también observaron que, en los casos en que el agregado de EDTA redujo la toxicidad de las muestras, esto no siempre se asoció a altos contenidos de metales, sino que la reducción de la toxicidad solo evidencia el contenido de metales biodisponibles, más relacionado a la especiación de los metales.

Análisis multivariado aplicado a variables fisicoquímicas y parámetros toxicológicos:

Debido a la baja capacidad como indicador de toxicidad para los ELUs estudiados demostrada para *T. aestivum*, no se consideraron estos datos en los siguientes análisis.

El ACC realizado entre la toxicidad (UT) y parámetros fisicoquímicos (Figura 4.17) explica un 52,3 % de la variabilidad de los datos (eje 1: 32,1; eje 2: 13,6 y eje 3: 6,6%). En función del ACC los bioensayos con *D. magna* muestran que la toxicidad de base se asocia principalmente a la DQO y a SSV, así indica que responde especialmente a la presencia de tóxicos orgánicos. Mientras que en los ensayos con *H. plagiodesmica* (L y SL) se asoció a SS en general (SST y SSF) y para el ensayo SL la asociación fue superior. Los resultados anteriores muestran una fuerte componente de compuestos orgánicos, principalmente suspendidos como responsables de la toxicidad del efluente original.

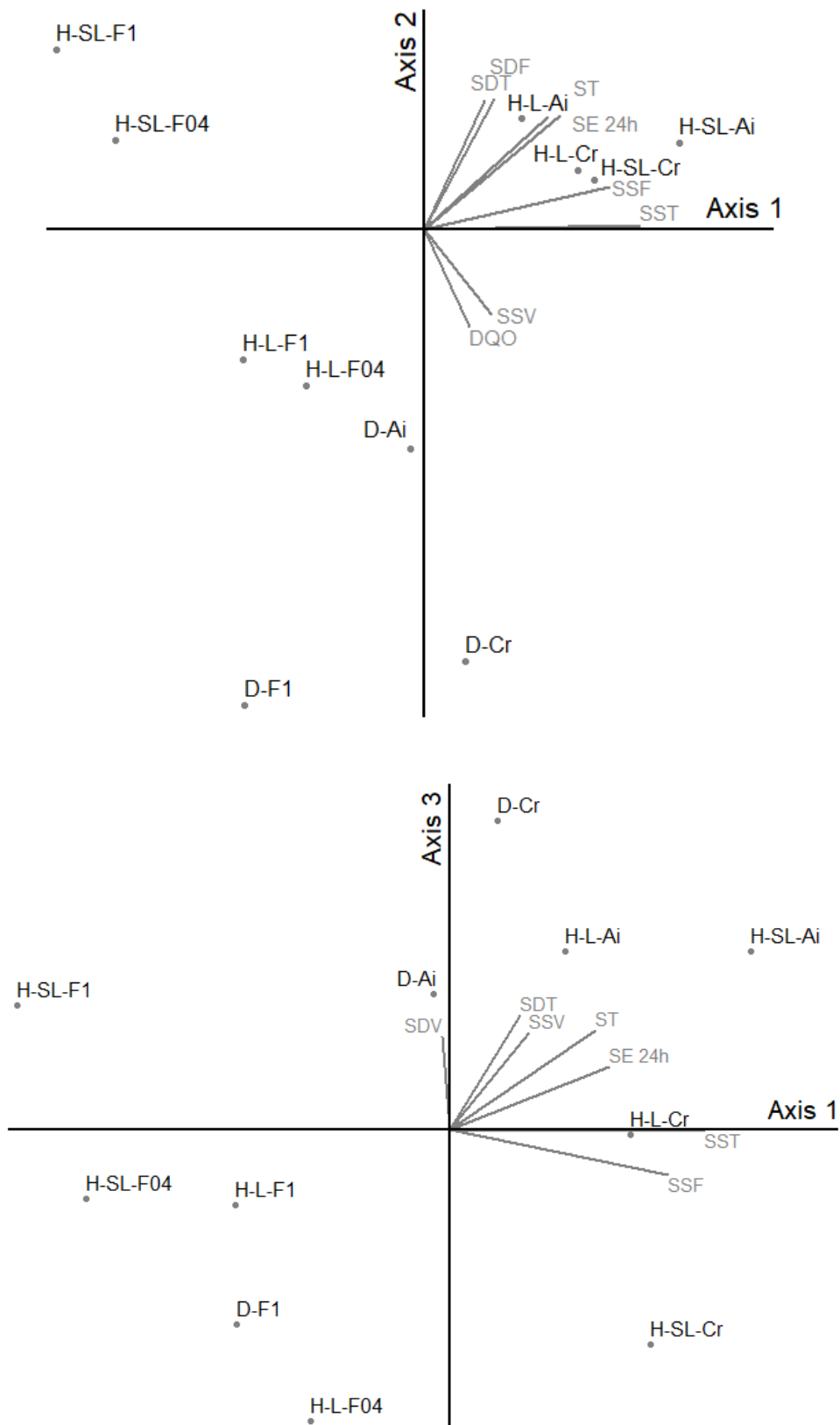


Figura 4.17- CCA realizado entre los datos toxicológicos y los parámetros fisicoquímicos. Eje 1: 32,1; eje 2: 13,6 y eje 3: 6,6% de la variabilidad de los datos. Referencias datos toxicidad: Primer letra indica especie D= *D. magna*, H= *H. plagiodesmica*. Para ésta última se indica a continuación ensayo letal (L) o subletal (SL). La última parte del rótulo indica submuestras: Cr= cruda (sin tratamiento), Ai= aireada y F1, F08 y F04= filtrada con 1; 0,8 y 0,2 μm respectivamente

Luego de airear el efluente la toxicidad remanente para *D. magna* disminuye considerablemente la asociación con la DQO. Para el caso de *H. plagiodesmica* en los ensayos letales se observa que el responde a los ST y SD en particular. Así el cambio de asociación desde los SS en el efluente crudo a los SD luego de la aireación refuerza los resultados anteriores de que la fracción orgánica suspendida es un componente importante de la toxicidad y que su efecto puede ser atenuado mediante aireación. A su vez, de acuerdo a lo anterior, en los ensayos subletales con *H. plagiodesmica* luego de la aireación, la toxicidad remanente se asoció más fuertemente a los SSF.

La toxicidad remanente luego de filtrar con 1 μm presentó baja asociación a los parámetros fisicoquímicos medidos para los ensayos con *H. plagiodesmica* en general. Para el ensayo subletal se asoció débilmente con SD, en particular SDT y SDF. Sin embargo, para *D. magna*, luego del filtrado, se mantuvo parte de la asociación con la DQO. La asociación del remanente de toxicidad para *D. magna* con la DQO refuerza la participación de componentes orgánicos no filtrables entre los responsables de la toxicidad en ausencia de sólidos suspendido y se condice con la eliminación de toxicidad observada por SPE en la etapa anterior.

Una vez que el efluente fue filtrado con la malla de 0,4 μm el remanente de toxicidad no se asocia a las variables estudiadas. Lo que indica que los agentes responsables de la toxicidad remanente corresponden a componentes trazas.

El ACC realizado sobre los abatimientos relativos, estimados para cada tratamiento, y los parámetros fisicoquímicos (Figura 4.18) explica el 48,6% de la variabilidad de los datos (eje 1: 29,3; eje 2: 11 y eje 3: 8,3%).

El abatimiento generado por aireación, para *D. magna*, se muestra fuertemente asociado a la DQO de las muestras. No fué así para los ensayos con *H. plagiodesmica*, ya que para ésta especie la asociación fue menor. Éste último resultado puede indicar que *H. plagiodesmica* es sensible a compuestos particulares, que fueron transformados durante la aireación, pero que no tiene alto impacto en la DQO. Esta observación se contradice con el resultado obtenido durante los test de comparación del abatimiento por aireación entre ensayos que, aunque con p-valor marginal, no indicó diferencias significativas entre las respuestas obtenidas para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*, letal y subletal. El CCA indica que, aunque las magnitudes de los abatimientos sean similares entre ensayos, los abatimientos responden a distintas propiedades de los ELUs.

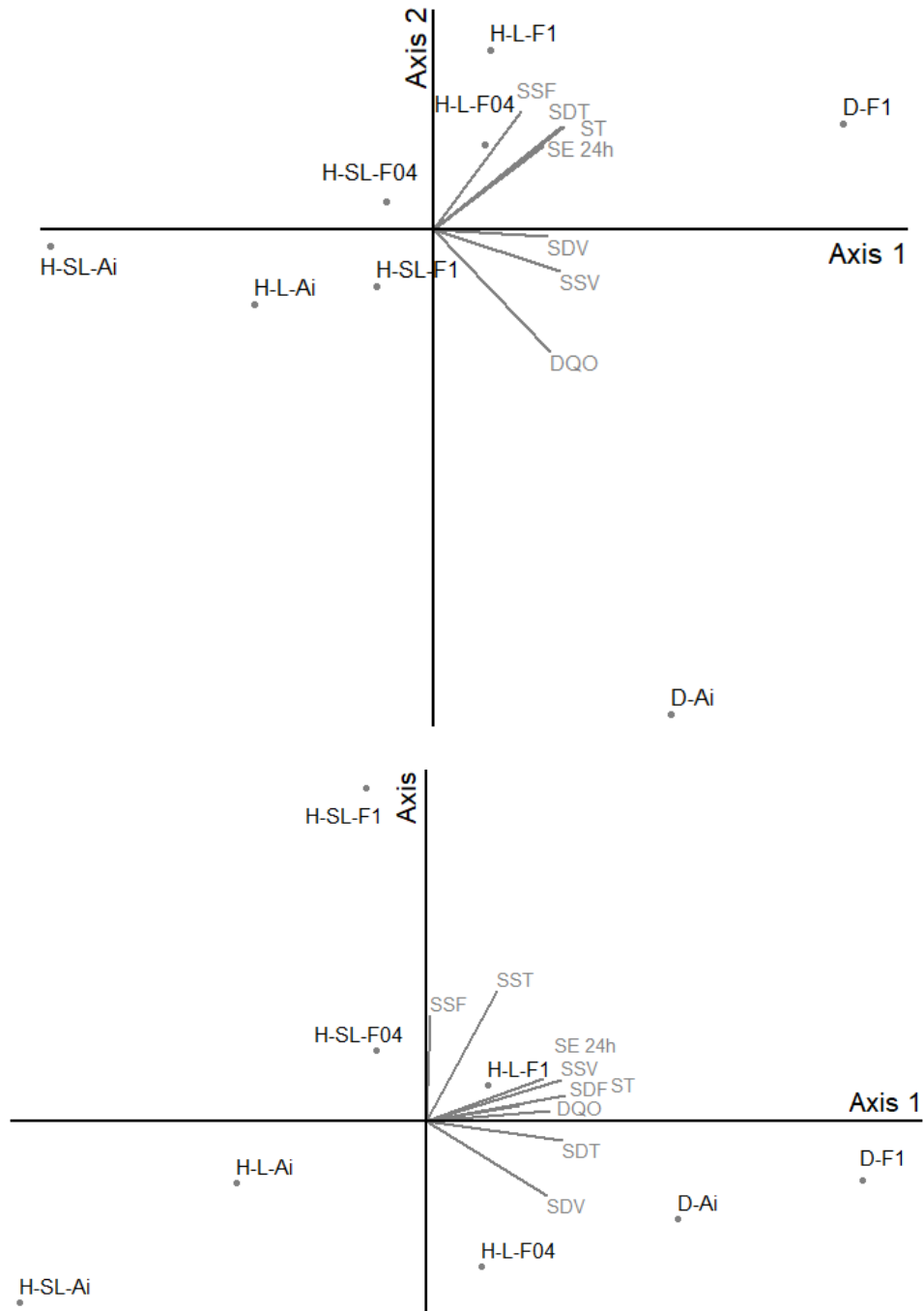


Figura 4. 18 - CCA realizado entre los abatimientos de toxicidad y los parámetros fisicoquímicos. Eje 1: 29,3; Eje 2: 11 y Eje 3: 8,3% de la variabilidad de los datos. Referencias datos toxicidad: Primer letra indica especie D= *D. magna*, H= *H. plagiodesmica*. Para ésta última se indica a continuación ensayo letal (L) o subletales (SL). La última parte del rótulo indica submuestras: Ai= aireada y F1, F08 y F04= filtrada con 1; 0,8 y 0,2 μm respectivamente.

Luego del filtrado con 1µm el abatimiento generado se asoció a DQO, ST para *D. magna*, y podría deberse a la eliminación de compuestos orgánicos suspendidos. Sin embargo, también se observó asociación a SD. Una posible explicación para esto podría ser la alta correlación entre las variables ST y SD, esto pudo generar que, en el análisis multivariado, se relacione las variables. Para *H. plagiodesmica*, en los ensayos letales, el abatimiento por filtrado con 1 µm se vinculó principalmente con SS en general, SSF, todos directamente asociados a los sólidos extraídos durante el filtrado. En cambio, en los ensayos subletales no se pudo hacer vinculaciones directas a las variables. La falta de asociación directa a SS observada para *D. magna* e *H. plagiodesmica* (ensayos subletales) evidencia que el abatimiento por filtrado 1µm responde a la supresión de la acción tóxica ejercida por algunos tóxicos suspendidos cuantitativamente escasos.

El abatimiento de toxicidad observado para el filtrado con 0,4µm en el ensayo letal con Hydra se asocia a SSF, pero en menor medida a la asociación para el filtrado con 1µm. y presenta una leve asociación a SDT y SDV. La remoción de toxicidad generada por el filtro de 1µm está incluida en la remoción del filtro de 0,4µm. por lo que la similitud es esperable

En función a los resultados obtenidos de los CCA y de las comparaciones de toxicidad, se puede identificar dos fracciones que aportan significativamente a la toxicidad global efluente: compuestos orgánicos principalmente suspendidos y, en menor medida, metales. Observaciones similares se han encontrado en estudios previos, en la toxicidad asociada a contaminantes orgánicos, metales son las más frecuentemente reportadas (Pessala et al., 2004; Smital et al 2010). Los resultados obtenidos sugieren que podría ser posible mejorar la calidad toxicológica de los ELUs de Santa Rosa mediante un tratamiento que reduzca de manera eficiente la DQO y los SS.

Otros investigadores han observado correlaciones significativas entre la EC50 y la DQO. Estudios realizados por Katsoyiannis and Samara (2007) en aguas residuales con y sin tratamiento de Grecia observaron correlaciones significativas entre DQO y la toxicidad de las muestras para *V. fischeri*. Las correlaciones significativas encontradas para la toxicidad y DQO sugieren que gran parte de la carga tóxica corresponde a carga orgánica. Tyagi et al. (2007) también reporta interrelación entre DQO y SS con respecto a la toxicidad para *D. magna* de aguas residuales de India. En estudios de los vertidos al Río Lujan también se establece, mediante análisis multivariado, relación entre la toxicidad para *Daphnia spinulata* y *Hyaella curvispina* con la DQO (Di Marzio et al., 2005). Otros autores que indican correlaciones similares son Araújo et al. (2005), Zhao et al. (2014) y Deng et al. (2017) y reportan que, para *D.*

magna, los efluentes deja de ser tóxicos por debajo de 57 mg/L de DQO. Sin embargo, otros autores reportan ausencia de correlación entre la toxicidad y los parámetros fisicoquímicos (Araújo et al., 2005). Esto alude a que, en muestras con composición compleja como lo son los ELUs, la DQO puede no ser un indicador eficiente de la toxicidad y más específicamente para nuestros resultados, la DQO no sería buen indicador de la toxicidad para *H. plagiodesmica*.

A su vez, una parte importante de la información toxicológica generada no puede asociarse, mediante el análisis multivariado a los parámetros fisicoquímicos. Esto puede deberse a que, en esos casos, la toxicidad se asocia más a la calidad o tipo de componentes que a la cantidad. Así, podrían indicar la presencia de algunas sustancias particularmente tóxicas, para los organismos empleados, pero no cuantitativamente importantes. En este sentido, existen reportes de que *D. magna* ha sido efectiva para detectar tóxicos en concentraciones de 1 ng/L (Hernando et al., 2005).

4.4. CONCLUSIONES:

Dado que la variación de la toxicidad responde de diferentes maneras para las especies empleadas se evidencia que los responden a diferentes tóxicos. La principal diferencia en la respuesta tóxica se da para el ensayo con *T. aestivum*, para este ensayo todas las muestras resultaron no tóxicas, mientras que si manifestaron efectos tóxicos para los demás ensayos. En términos generales los resultados identifican al test subletal con *H. plagiodesmica* como el indicador más sensible a la toxicidad de base del efluente, en comparación con los ensayos letales. Sin embargo, los ensayos letales resultaron ser más sensibles a los cambios de toxicidad generados por los tratamientos y, de esta forma indicaron mayores cambios de toxicidad que el ensayo subletal. Esto puede deberse a la alta sensibilidad de los puntos subletales evaluados. La variabilidad de sensibilidad de los test es necesaria para lograr una mejor representación de la variabilidad real, presente en los ambientes acuáticos. A su vez el ensayo de inhibición de crecimiento con *T. aestivum* no es adecuado para el tipo de muestras trabajados por lo que, para futuros trabajos se debe evaluar reemplazarlo con otra especie, más sensible, que sea útil como indicadora.

Los resultados mostraron una variabilidad importante, tanto en las características fisicoquímicas como respecto de la toxicidad y, por ésta razón se considera adecuado un enfoque integral, como el que se aplicó.

Los tratamientos aplicados a las submuestras generaron cambios en la toxicidad que no difieren significativamente para los dos puntos finales considerados en *H. plagiodesmica*, sin embargo,

los abatimientos si difieren entre *H. plagiodesmica* y *D. magna* excepto para el caso de las submuestras aireadas. Esto se debe a que cada ensayo se muestra sensibles sustancias diferentes, y los cambios de toxicidad indican alteraciones de la toxicidad atribuibles a tóxicos distintos para cada ensayo.

La aplicación de un protocolo de fraccionamiento para la identificación de las fracciones tóxicas resultó efectiva y generó información valiosa, que sirve de referencia para futuros estudios que permitan mejorar la eficiencia del sistema de tratamiento.

Los niveles de remoción de la toxicidad generados durante los tratamientos fueron variables, lo cual es acorde a la naturaleza compleja de las muestras, sin embargo, la aplicación del método de fraccionamiento permitió definir en forma general las características de los componentes tóxicos que aportan en mayor parte a la toxicidad global. Cantidades importante de la toxicidad pudo ser removida durante la aireación y el filtrado con 1µm, en particular luego del filtrado con 0,2 µm y la aplicación de SPE. Esto es evidencia de la participación de los SS y de compuestos orgánicos no polares como las fracciones más importantes que aportan a la toxicidad. Esta asociación es confirmada mediante los análisis multivariados entre datos toxicológicos y fisicoquímicos. Sin embargo, las diferencias en las remociones indican diferencias en la composición de la carga tóxica. La composición es altamente variable y sus efectos tóxicos varían en función de las interacciones entre componentes.

Teniendo en cuenta los bioensayos realizados en submuestras con EDTA y los realizados en las submuestras tratadas con SPE, la alta carga orgánica puede estar interactuando con los metales y ser la que determina su disponibilidad, y por ende la ocurrencia o no efectos tóxicos en las muestras de ELUs. Por lo que la sola cuantificación de los metales no genera información acerca de los efectos esperados.

El análisis de datos multivariados mostró que la determinación de parámetros fisicoquímicos junto a los ensayos de toxicidad son herramientas indispensables y complementarias para el estudio de la calidad de los vertidos de ELUs.

Se desconoce la toxicidad del afluente que ingresa a la planta de tratamiento Sur, por lo cual no se tienen información cuantitativa acerca de la eficiencia del tratamiento. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, se presume de una baja eficiencia y una importante falencia en el tratamiento y se presume que la aplicación de un tratamiento que reduzca la DQO y el contenido de sólidos suspendidos podría mejorar considerablemente las características toxicológicas de los ELUs estudiados. Los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica* pueden ser

aplicados en la rutina de controles de calidad de las aguas residuales. Su sensibilidad ante la extracción o degradación de componentes que aportan a la toxicidad los hace una herramienta útil para informar acerca de la eficiencia del tratamiento aplicado y como sistema de alerta ante tratamientos deficientes.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, S., Muñoz, M., De La Torre, A., Roset, A.J., De La Peña, E., Carballo, M., Muñoz, M.J., De La Torre, A., Roset, J., De La Peña, E., Carballo, M., 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci. Total Environ.* 328, 69–81. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.02.013
- APHA, 1998. *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington, DC, DC.
- Araújo, C.V., Nascimento, R.B., Oliveira, C.A., Strotmann, U.J., da Silva, E.M., 2005. The use of Microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil). *Chemosphere* 58, 1277–1281.
- Bergback, B., Johansson, K., Mohlander, U., 2001. Urban metal flows - a case study of Stockholm. *Water Air Soil Pollut Focus* 1, 3–24.
- Bohórquez-Echeverry, P., Duarte-Castañeda, M., León-López, N., Caicedo-Carrascal, F., Vásquez-Vásquez, M., Campos-Pinilla, C., 2012. Selection of a bioassay battery to assess toxicity in the affluents and effluents of three water-treatment plants. *Univ. Sci.* 17, 152–166. doi:10.11144/javeriana.SC17-2.soab
- Botts, J.A., Braswell, J.W., Goodfellow, W.L., 1989. *Toxicity Reduction Evaluation Protocol for Municipal Wastewater Treatment Plants*.
- Botts, J.A., Braswell, J.W., Goodfellow, W.L., Bishop, D.F., 1988. *Toxicity Reduction Evaluation at the Patapsco Wastewater Treatment Plant*. US EPA.
- Cantinho, P., Matos, M., Trancoso, M.A., dos Santos, M.M.C., 2016. Behaviour and fate of metals in urban wastewater treatment plants: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 359–386. doi:10.1007/s13762-015-0887-x
- Carr, R.S., Nipper, M., Biedenbach, J.M., Hooten, R.L., Miller, K., Saepoff, S., 2001. Sediment toxicity identification evaluation (TIE) studies at marine sites suspected of ordnance contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 298–307. doi:10.1007/s002440010252
- Castillo Morales, G. (Ed.), 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* 39, 4797–4807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015
- Dalzell, D.J.B., Alte, S., Aspichueta, E., de la Sota, A., Etxebarria, J., Gutierrez, M., Hoffmann, C.C., Sales, D., Obst, U., Christofi, N., 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assesment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47, 535–545.
- Deng, M., Zhang, Y., Quan, X., Na, C., Chen, S., Liu, W., Han, S., Masunaga, S., 2017. Acute toxicity reduction and toxicity identification in pigment-contaminated wastewater during anaerobic-anoxic-oxic (A/A/O) treatment process. *Chemosphere* 168, 1285–1292. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.144
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., Silvana, G., 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 380–391. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.10.002

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DiGiano, F.A., Maeker, M., Champlin, T.L., Frey, M. V, 1992. Application of the toxicity reduction evaluation protocol for municipal wastewater treatment plants: Case histories at High point and Fayetteville, NC.
- Farre, M., Kloter, G., Petrovic, M., Alonso, M.C., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2002. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal. Chim. Acta* 456, 19–30. doi:10.1016/S0003-2670(01)00908-4
- Garcia-Reyero, N., Lavelle, C.M., Escalon, B.L., Martinović, D., Kroll, K.J., Sorensen, P.W., Denslow, N.D., 2011. Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 101, 38–48. doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.014
- Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358–366. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.012
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández Alba, A.R., Barceló, D., 2006b. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.037
- Hutchings, M., Johnson, I., Hayes, E., Girling, A.E., Thain, J., Thomas, K., Benstead, R., Whale, G., Wordon, J., Maddox, R., Chown, P., 2004. Toxicity reduction evaluation, toxicity identification evaluation and toxicity tracking in direct toxicity assessment. *Ecotoxicology* 13, 475–484. doi:10.1023/B:ECTX.0000035297.90620.73
- INDEX, 2010. Censo de Nacional de Población, Hogares y Vivienda.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. *J. Hazard. Mater.* 141, 614–621. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.038
- Liwarska-Bizukojc, E., Urbaniak, M., 2007. Evaluation of phytotoxic effect of wastewater contaminated with anionic surfactants. *Biotechnologia* 76, 203–214.
- Magdaleno, A., De Cabo, L., Arreghini, S., Salinas, C., 2014. Assessment of heavy metal contamination and water quality in an urban river from Argentina. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 18, 113. doi:10.14210/bjast.v18n1.p113-120
- Mansourri, G., Madani, M., 2016. Examination of the Level of Heavy Metals in Wastewater of Bandar Abbas Wastewater Treatment Plant. *Open J. Ecol.* 06, 55–61. doi:10.4236/oje.2016.62006
- Manusadžianas, L., Balkelyte, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Pöllumaa, L., Kahru, A., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: Selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat. Toxicol.* 63, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(02)00132-7
- Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ. Int.* 33, 414–425. doi:10.1016/j.envint.2006.12.006
- Maya, N., Evans, J., Nasuhoglu, D., Isazadeh, S., Yargeau, V., Metcalfe, C.D., 2018. Evaluation of wastewater treatment by ozonation for reducing the toxicity of contaminants of emerging concern to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 274–284. doi:10.1002/etc.3952
- McCune, B., Mefford, M.J., 2011. PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data.
- Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S.M., Silva, L., Barbosa, M., Cunha, M.A., 2013. Ecotoxicological evaluation of wastewater in a municipal WWTP in Lisbon area (Portugal). *Desalin. Water Treat.* 51, 4162–4170. doi:10.1080/19443994.2013.768021
- Muñoz, M.Á., Buitrón, E.B., de Ormaechea, J.A., 2007. Eficiencia En Los Sistemas De Tratamiento De Líquidos Cloacales En La Provincia De La Pampa, II Congreso Pampeano del Agua.
- Oberholster, P.J., Botha, A.M., Cloete, T.E., 2008. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. *Environ. Pollut.*

- 156, 184–192. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.028
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A.M., Poulsen, V., Jourdain, M.J., Férard, J.F., Grand, C., Bispo, A., 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.* 363, 114–125. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.12.016
- Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A., Herve, S., 2004. Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 263–272. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.10.002
- Planes, E., Fuchs, J., 2015. Cuales Son Los Aportes De La Ecotoxicología a Las Regulaciones Ambientales. *Cienc. Invest.* 65, 45–62.
- Polls, I., Lue-Hing, C., Zenz, D.R.D.R., Sedita, S.J.S.J.S.J., 1980. Effects of urban runoff and treated municipal wastewater on a man-made channel in northeastern Illinois. *Water Res.* 14, 207–215. doi:10.1016/0043-1354(80)90090-1
- Pratts, P., 2011. Evaluación del Impacto Antrópico sobre la Dinámica e Hidroquímica de la Laguna del Bajo Giuliani, Santa Rosa, La Pampa (Tesis de Maestría). UNLPam.
- Rezapour, S., Atashpaz, B., Moghaddam, S.S., Damalas, C.A., 2019. Heavy metal bioavailability and accumulation in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) irrigated with treated wastewater in calcareous soils. *Sci. Total Environ.* 656, 261–269. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.288
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Sarakinos, H.C., Bermingham, N., White, P. a, Rasmussen, J.B., 2000. Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 63–71.
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K.E., Thomas, K. V., Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 844–851. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.010
- Sorme, L., Lagerkvist, R., 2002. Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *Sci. Total Environ.* 298, 131–145.
- Tyagi, V.K., Chopra, A.K., Durgapal, N.C., Arvind, K., 2007. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of municipal sewage treatment plant. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 11, 61–67.
- U.S. EPA, 2000. Method 6010: Inductively Couple Plasma Atomic Emission Spectrometry.
- U.S. EPA, 1999. Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plant- Appendix A to J.
- U.S. EPA, 1993. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. US EPA.
- U.S. EPA, 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase Toxicity Characterization Procedures. US EPA.
- US-EPA, 2000. Norma EPA 6010 - Inductively Couple Plasma-Atomic Emission spectrometry.
- Üstün, G.E., 2009. Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 172, 833–838. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.073
- Wong, J.W., Li, K., Fang, M., Su, D.C., 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environ. Int.* 27, 373–380. doi:10.1016/S0160-4120(01)00088-5
- Zhao, J.L., Jiang, Y.X., Yan, B., Wei, C., Zhang, L.J., Ying, G.G., 2014. Multispecies acute toxicity evaluation of wastewaters from different treatment stages in a coking wastewater-treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1967–1975. doi:10.1002/etc.2638

Capítulo 5

APLICACIÓN DE BIOENSAYOS EN LA EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE EFLUENTES DE TAMBO

5.1 INTRODUCCIÓN:

La producción de leche y derivados es una de las actividades económicas más importantes de Argentina. En los últimos años la actividad se ha intensificado, con un importante aumento de los tamaños de los rodeos sin que se incrementara el número de tambos ni su superficie. Esto genera una mayor producción de residuos, sólidos y líquidos en las salas de ordeño y, en la mayoría de los casos, no se consideró la adaptación de los sistemas de tratamiento de estos líquidos residuales, que presentan características específicas.

El manejo incorrecto de los efluentes es una fuente potencial de riesgos ambientales, tanto en el sitio de disposición directa, como en otros más alejados a los que llegara por drenaje superficial o por infiltración. El impacto ambiental más evidente y conocido está asociado al alto contenido de nitrógeno y fósforo y su capacidad de generar eutrofización de los cuerpos de agua superficial. Sin embargo, las aguas residuales están constituidas por una gran variedad de sustancias que las convierten en mezclas complejas. En los últimos años se ha comenzado a indagar acerca de la incidencia de una gran variedad de sustancias orgánicas antes no consideradas, valorándose la detección de antibióticos, anti-ectoparasitarios, hormonas, y otros compuestos utilizados como aditivos presentes en los formulados de medicamentos y alimentos balanceados (Halling-Sorensen et al., 1998; Eguchi et al., 2004).

Es en este contexto, que algunos autores han volcado su interés hacia la evaluación de estos componentes minoritarios de la fracción orgánica de las aguas residuales de diferentes orígenes, asumiendo el hecho de que estas sustancias son en su mayoría bioactivas y *a priori* puede sospecharse que su aporte al impacto global, sería significativo (Eguchi et al., 2004). Para estas sustancias no existe una apropiada evaluación del riesgo ambiental, y si bien su vertido en general se realiza en pequeñas concentraciones, su aporte continuo hace necesario su estudio. En los sistemas pecuarios estos compuestos y sus metabolitos ingresan a los líquidos residuales debido a que, luego de su administración a los animales, son excretados sin degradar o bajo la

forma de metabolitos bioactivos a través de la orina y las heces. A su vez, durante el proceso de lavado de los establecimientos tamberos se incorporan agentes desinfectantes a la mezcla.

Existen escasas referencias de la toxicidad de las aguas residuales generadas durante el proceso de lavado de los tambos y de las fracciones que aportan a su toxicidad así, los objetivos de este estudio fueron i) caracterizar toxicológicamente los ELTs de un tambo, La Pampa, Argentina, ii) identificar que fracciones aportan a la toxicidad global del ELTs, iii) indagar acerca de las relaciones entre parámetros fisicoquímicos y toxicidades en los ELTs y en las submuestras manipuladas.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS:

Área de estudio: La Estación Experimental Agropecuaria “Ing. Agr. Guillermo Covas” INTA – Anguil (La Pampa) cuenta con un tambo ovino experimental. En este tambo, se trabaja con la raza PampInta, realiza un ordeño diario por la mañana, y las ovejas ingresan al ordeño al momento del destete de sus crías (45 días post parto) y permanecen en ordeño 6 a 7 meses en promedio. Se ordeñan entre 110 y 170 ovejas al día.

El tambo cuenta de un corral de espera, seguida del sector de ordeño (cubierto), y un sector de espera post-ordeño con piso. Con el lavado, los efluentes escurren por gravedad hacia una laguna de contención y disposición final con capacidad de algo más de 300.000 litros, que presenta una sección horizontal de aproximadamente 160 m² y una profundidad de 2 metros. (Figura 5.1)



Figura 5.1- Área de estudio. Tambo experimental de la EEA-INTA Anguil (La Pampa)

Toma de muestras, conservación y manipulación: Durante un lapso de 12 meses, entre diciembre de 2013 y noviembre de 2014, se colectaron muestras simples (quincenales) de efluente generado durante el lavado del establecimiento, almacenándolas en envases plásticos refrigerados a 4°C hasta el desarrollo de los ensayos y determinaciones posteriores, tomando en

cuenta los tiempos de almacenamiento recomendados en cada caso (APHA, 1998). El tambor permaneció fuera de operación durante un mes, por lo cual se omitió la muestra correspondiente a mitad de éste periodo y, de ésta manera, se colectaron un total de 23 muestras durante el año. La secuencia de trabajo con cada muestra (Figura 5.1), se inició con el fraccionamiento en cuatro alícuotas equivalentes para constituir cuatro submuestras. Una de estas submuestras se utilizó para las determinaciones fisicoquímicas y el resto para los ensayos de toxicidad.

Los ensayos de toxicidad se iniciaron con la determinación de la toxicidad de base para las especies seleccionadas en una submuestra sin tratamiento. Las dos submuestras remanentes se trataron para luego determinar la toxicidad remanente post tratamiento. Los tratamientos aplicados fueron: i) aireación durante 2 horas a temperatura ambiente, ii) filtrado a través de poro de 1 μm y iii) filtrado de la submuestra obtenida de (ii), a través de poro de 0,42 μm . Todos los tratamientos se aplicaron acorde a los métodos para las evaluaciones de identificación de toxicidad acuática (U.S. EPA, 1991) y son descriptos con detalle en capítulo 2: “Materiales y Métodos Generales”.

Parámetros físico-químicos: Se determinó pH, ST, SST, SDT, SSF, SSV, SSe 10min, SSe 60min, SSe 24h, DQO. Todas las determinaciones se realizaron siguiendo los protocolos estandarizados y son descriptas en detalle en el Capítulo 2.

Bioensayos: Se realizaron bioensayos con *D. magna*, *H. plagiodesmica* y *T. aestivum*. Se efectuaron 9 bioensayos por muestra, en 2 etapas. La primera etapa correspondió a la determinación de toxicidad de base (CE50cr) para cada una de las especies y, la siguiente etapa correspondió a la determinación de la toxicidad remanente en las submuestras manipuladas (Figura 5.2). La conservación de la toxicidad de base fue evaluada mediante repetición del ensayo de base junto con los ensayos post tratamiento. Si se observa una reducción significativa de la toxicidad de base, no puede asegurarse la correcta conservación de la muestra y, por esto, no son válidos para comparaciones las toxicidades remanentes medidas. Por ésta razón, en éste caso TIE (U.S. EPA, 1991) recomienda descartar el muestreo problema y reemplazarlo por uno nuevo.

En el capítulo 2 se describen las condiciones específicas de mantenimiento de los cultivos y procedimiento de los bioensayos bajo condiciones estándar.

D. magna: Los ensayos para determinar toxicidad de base se realizaron por triplicado, con 10 neonatos (<24h) por concentración, en cambio los de determinación de toxicidad remanente se realizaron por duplicado, con una réplica del ensayo de base como control positivo de la

toxicidad. Se evaluó inmovilización a las 48 h y, con éstos datos, se estimó CE50 a las 48 h. mediante el método PROBIT (G. Castillo Morales, 2004)

H. plagiodesmica: Los ensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones para ensayos de toxicidad aguda de Castillo Morales (2004) para *H. attenuata*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y, junto con los ensayos de para determinar toxicidad remanente, se repitió el ensayo de base como control positivo de la toxicidad. Se evaluó presencia de cambio letales y subletales y, por medio del método PROBIT, se estimó la CL50 y CE50, respectivamente, a las 96 h. (G. Castillo Morales, 2004)

T. aestivum: Los ensayos se realizaron mediante la adaptación del ensayo de toxicidad aguda de Castillo Morales (G. Castillo Morales, 2004) para semillas de *L. sativa*. Los ensayos se realizaron por triplicado, en placas de Petri, con 10 semillas por placa. Como medio de dilución se utilizó agua dura reconstituida (Castillo Morales, 2004). Las placas se mantuvieron protegidas de la luz por un periodo de 120 h. Se evaluó la elongación de hipocótilo y radícula, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento respecto del blanco.

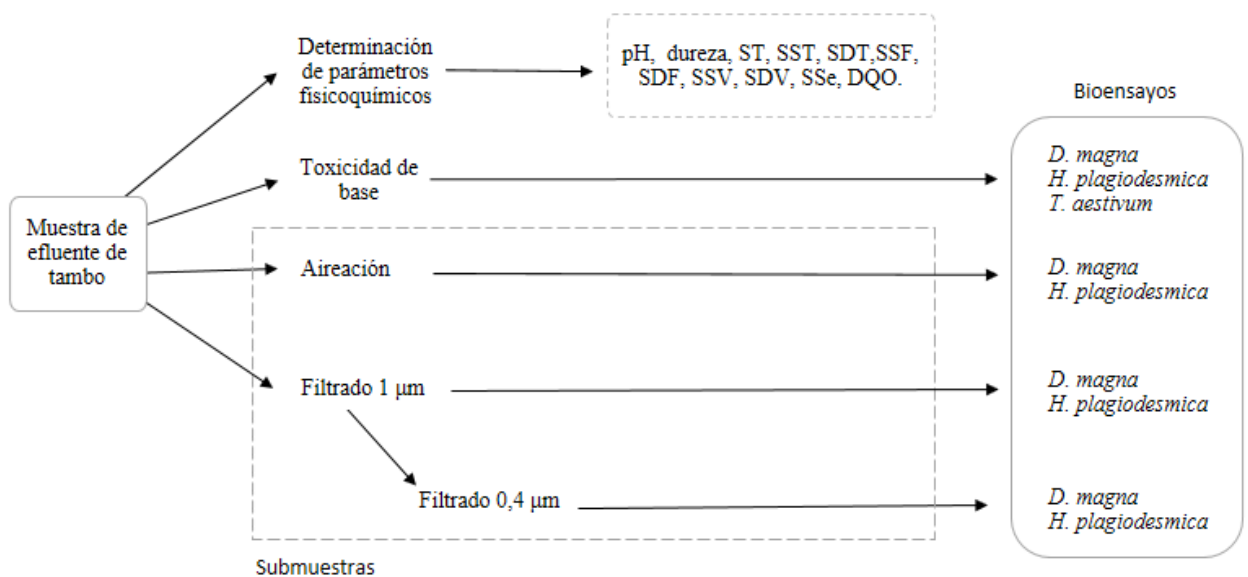


Figura 5.2- Secuencia de trabajo aplicada a las muestras obtenidas desde el efluente. cada muestra colectada fue fraccionada. Una parte del muestreo se usó durante las determinaciones fisicoquímicas y, el resto, se utilizó para los ensayos de toxicidad. Los ensayos de toxicidad se iniciaron con la determinación de la toxicidad de base para las especies seleccionadas. Una vez establecida la toxicidad de base se inició con el tratamiento de submuestras para luego determinar la toxicidad remanente post tratamiento. Los tratamientos aplicados fueron: i) aireación durante 2h a temperatura ambiente, ii) filtrado 1 µm y iii) filtrado 0,42 µm.

Las muestras fueron fraccionadas y, una parte de la muestra fue conservada sin alteraciones, mientras que a las demás fracciones se la aplicó un tratamiento: i) aireación durante 2h a temperatura ambiente, ii) filtrado 1 µm, iii) filtrado 0,42 µm. Todos los tratamiento se aplicaron acorde a los métodos para las evaluaciones de identificación de toxicidad acuática (U.S. EPA,

1991) y son descriptos con detalle en capítulo 2: “Materiales y Métodos Generales”. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C, los ensayos y determinaciones se realizaron dentro de los plazos recomendados (APHA, 1998).

Manejo de datos toxicológicos:

Para mejor interpretación durante los análisis estadísticos multivariados, los parámetros toxicológicos estimados se transformaron en unidades tóxicas (UT). Se calculó el cambio de la toxicidad generado por cada manipulación respecto de la toxicidad original (Botts et al., 1988) por medio de la fórmula:

$$\text{Abatimiento Trat } i = \frac{UT_{cr} - UT_{trat } i}{UT_{cr}} \times 100$$

Donde:

$UT_{trat } i$ son las UT estimadas para la muestra sometida al tratamiento i

UT_{cr} son las UT estimadas para la muestra original (cruda)

Análisis estadísticos: Las comparaciones de puntos finales y tratamientos se realizaron mediante modelos lineales generales mixtos, en los cuales se consideró a las muestras como factor con efectos aleatorios. Para evaluar los supuestos de homocedasticidad de varianza y normalidad se realizaron gráficos de dispersión de residuos y pruebas analíticas (Shapiro-Wilks). Para obtener la estructura de varianzas más apropiada, cuando fue necesario, se utilizó el criterio de información Akaike. Finalmente se realizó el ANOVA del modelo que mostró el mejor ajuste y la comparación entre las medias se efectuaron mediante la prueba LSD- Fisher. Las correlaciones entre datos toxicológicos y los parámetros físico-químicos se estudiaron mediante el coeficiente Spearman. Los análisis estadístico y gráficos se realizaron mediante el software Infostat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011). También se evaluó la similaridad de las respuestas entre los bioensayos aplicados mediante análisis de clúster. Finalmente se llevó a cabo un análisis de correspondencias canónicas (CCA), para evaluar la relación entre datos toxicológicos y parámetros físico-químicos para estudiar las variaciones en el abatimiento de toxicidad generado por tratamientos. Los análisis multivariados se realizaron mediante PCORD 6.0 (McCune and Mefford, 2011).

5.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN:

Caracterización fisicoquímica: Un resumen de las medidas de los parámetros fisicoquímicos determinados se presentan en la tabla 5.1, realizando una comparación con los valores límite para el vertido de efluentes líquidos en cuerpos de aguas superficiales establecidos por el

Decreto N°2793-06, reglamentario de Ley N°1914 o Ley Ambiental de la Provincia de La Pampa, sancionada en diciembre del 2000. Se observa que la DQO presentó valores elevados, aunque dentro de los rangos para un efluente de tambo sin tratamiento. Se detectó además un contenido alto de ST y, dentro de éstos, la mayor parte se encontró en la fracción suspendida. Respecto a los SS, se identificó que la mayor parte corresponde a SSV, en relación a SSF. Los SD se componen en partes similares de SDF y SDV. En todas las muestras se detectó alto contenido de SSe 10 m, dentro de los niveles esperados para el tipo de muestra.

Los niveles de DQO medidos son inferiores a los reportados para efluentes del tambo de la EEA-INTA – Rafaela, donde se determinación valores de DQO de 4617 ± 370 mg/L para el ELT sin tratamiento (García et al., 2006). Para tambos ubicados cuencas lecheras de Bs. As. Herrero (2014) indica niveles de DQO entre 530 y 27000 mg/L para efluente crudo y 510 a 5630 mg/L para efluentes tratados. Estudios de la efectividad de un sistema de tratamiento de RTL muestran valores de DQO, para los líquidos con distintos niveles de tratamiento, entre 1580 y 2445 mg/L (Otero, 2015). Considerando los reportes anteriores, nuestros resultados muestran que el ELT estudiado, a pesar de no estar tratado presenta baja DQO, con niveles similares a los publicados por varios autores para ELT tratados de Argentina. Sin embargo, estudios en Nueva Zelanda muestran que es posible reducir la carga orgánica de los efluentes de tambo con un tratamiento adecuado por medio de extracción de sólidos seguida de un sistema de lagunas: anaeróbica y facultativa (Craggs et al., 2004).

Variable	Media	D.E.	Min	Max	Decreto 2793/06
pH	6,9	0,6	6,1	8,2	5,5 -10
DQO (mg O/L)	1728	244,1	1373	2162	350
ST (mg/L)	4555,3	495,9	3507	5804	s/r
SST (mg/L)	2964,5	331,0	2139,3	3598,5	s/r
SDT (mg/L)	1590,7	316,2	1121,4	2210,8	s/r
SSF (mg/L)	798,0	290,2	160,6	1112,0	s/r
SSV (mg/L)	2166,5	257,5	1792,4	2726,7	s/r
SDF (mg/L)	862,5	225,3	579,0	1437,0	s/r
SDV (mg/L)	723,0	195,6	481,3	1191,0	s/r
SSe 10 m (mL/L)	6,4	1,5	4	10	0,5

SSe 120 m (mL/L)	11,0	1,6	9	15	1
SSe 24 h (mL/L)	13,0	1,5	10	16	s/r

Tabla 5. 1 - Parámetros fisicoquímicos determinados, Se indica media, DE, valor mínimo (Mín) y máximo (Máx) y se incluyen los límites establecidos en la regulación de vertidos de la normativa de la provincia de La Pampa Decreto N° 2793/06. Anexo, sección B) Desagües a pozos o a campos de drenaje s/r: indica parámetro sin regulación provincial.

Respecto a los demás parámetros estudiados, el pH es acorde a publicaciones previas para el tipo de efluente (Gambaudo et al., 2014; García et al., 2006; M. S. Gutiérrez et al., 2008; Herrero, 2014; Imhoff et al., 2014; Sosa et al., 2013). El contenido de ST es el doble del reportado por Imhoff et al (2014) pero menor al reportado por Otero (2015). Respecto a los SST, García et al. (2006) informa niveles similares, al tiempo que detecta un contenido ampliamente superior de SSe.

Al considerar los límites establecidos por el Decreto N°2793/06, el 100% de las muestras presentaron DQO por encima del límite recomendado. Respecto a los demás parámetros regulados, 100% de muestras superaron los niveles permitidos para SSe 10 m y 30% para SSe 120 m. Así, para el periodo muestreado, ninguna muestra cumple con lo establecido por el Decreto N°2793/06, de manera que los ELTs estudiados no serían aptos para su vertido directo. Los resultados coinciden con los obtenidos en un amplio relevamiento de tambos argentinos realizado por Herrero (2014) en que en ningún caso los efluentes alcanzan los niveles requeridos para DQO. Esto denota una deficiencia general en los tratamientos aplicados. Así, incluso en los casos es que se emplea tratamientos por lagunas, éstos tienen alguna eficacia, pero no reducen la carga orgánica a niveles que permita su vertido.

La disposición final en lagunas artificiales o zonas bajas es un manejo habitual en Argentina. Se reporta que un 56% de los tambos de la Provincia de Santa Fe y un 58% de los de la Provincia de Buenos Aires son dispuestos de esta manera (Badino et al., 2015). Reportes anteriores indicaban que un 69 % de los tambos de Argentina aplicaba ésta metodología y, en particular, un 65% de los tambos ovinos (Buseti and Suárez, 2008; Cappellini, 2011). Éste resulta ser el mayor problema ambiental asociado a los tambos, ya que la mayoría a su vez los dispone sin tratamiento ni extracción de sólidos (Cappellini, 2011). Es evidente que, a esta escala, el manejo inadecuado de los ELTs pone en riesgo la sustentabilidad del sistema.

Toxicidad: En las figuras 5.2; 5.3 y 5.4 se representan las CL50 y CE50 obtenidas por exposición de *D. magna*, *H. plagiodesmica* a los ELT estudiados. También se indica la CL50 y CE50 resultante para las submuestras aireadas y filtradas con diferentes tamaños de poro, para

los ensayos seleccionados. En la figura 5.5 se representa la inhibición de crecimiento de hipocotíleo y radícula durante la germinación de semillas de *T. aestivum*. Para el ensayo letal con *D. magna*, la CL50 media de los ELTs fue con una dilución del 62%, en tanto que la muestra más tóxica correspondió a la muestra 8 (43%) y la muestra menos tóxica correspondió a la muestra 20 (89%), estableciéndose con estas muestras el rango de toxicidad de las muestras crudas. Los ensayos letales con *H. plagiodesmica* arrojaron una CL50 media con una dilución de 47%, en tanto que para este punto final la muestra más tóxica fue la muestra 15 (CL50:24%) y la menos tóxica fue la muestra 22 (CL50:84%), estableciéndose con estas muestras el rango de toxicidad de las muestras crudas para *H. plagiodesmica*. Durante el ensayo subletal con *H. plagiodesmica* la CE50 fue del 20%, en tanto que la muestra 10 fue la más tóxica (CE50:10%) y la 5 la menor (CE50:35%).

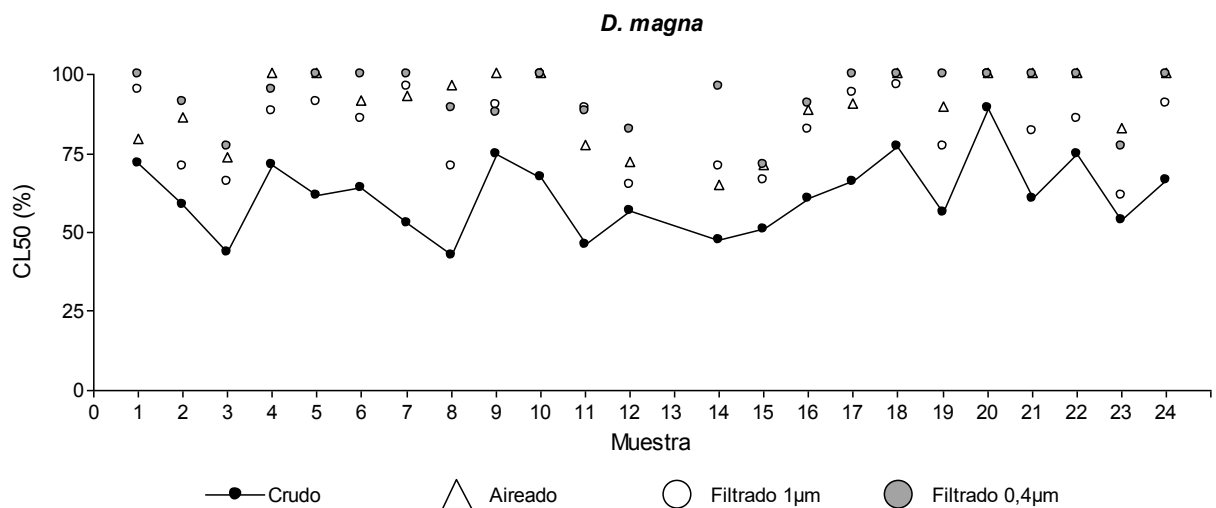


Figura 5. 2- Se representa la CL50 (%) para *D. magna* de los efluentes líquidos de tambo y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).

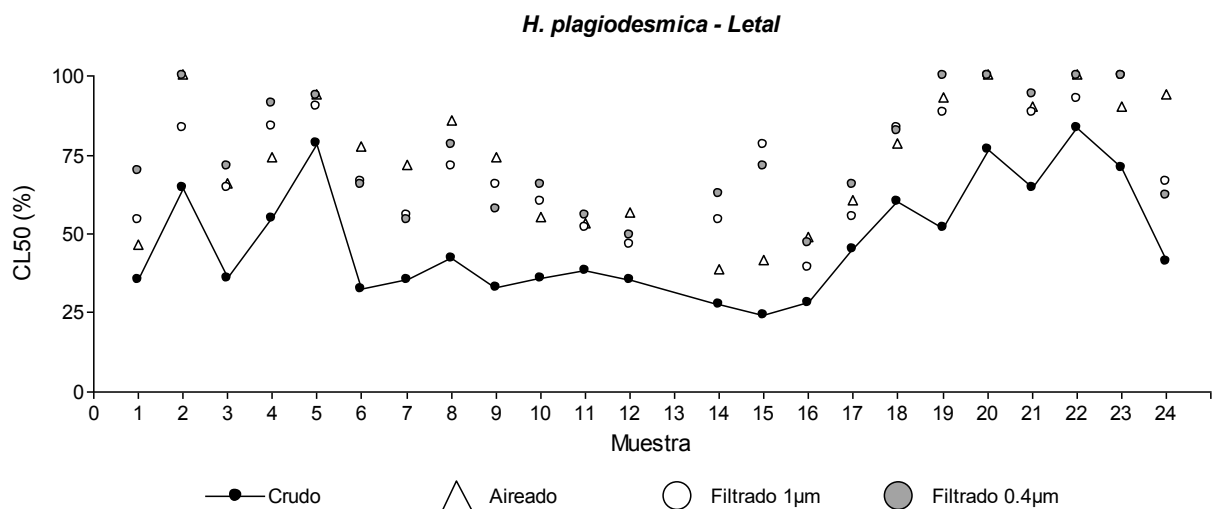


Figura 5. 3- Se representa la CL50 (%) para *H. plagiodesmica* de los efluentes líquidos de tambo y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).

***H. plagiodesmica* - Subletal**

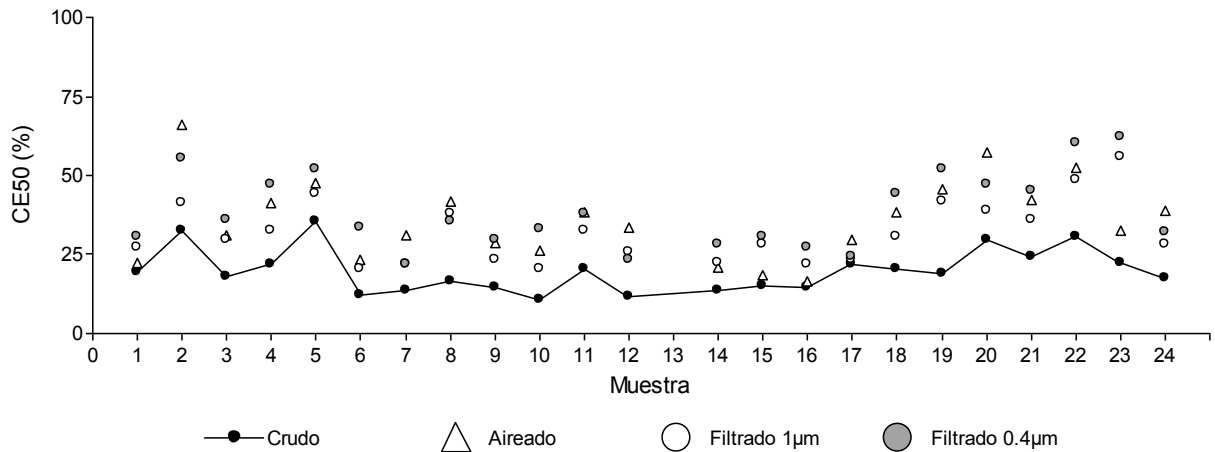


Figura 5. 4 - Se representa la CE50 (%) para *H. plagiodesmica* de los efluentes líquidos de tambo y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).

Para *T. aestivum* las muestras de ELTs presentaron baja toxicidad y los resultados obtenidos permitieron calcular la CI50 solo para 2 de 23 muestras, y esta se mantuvo siempre por encima de diluciones del 90%. Para el resto de las muestras los niveles de inhibición observados fueron inferiores y, por ésta razón, se representa gráficamente solo el porcentaje de inhibición generado por exposición a la muestra original.

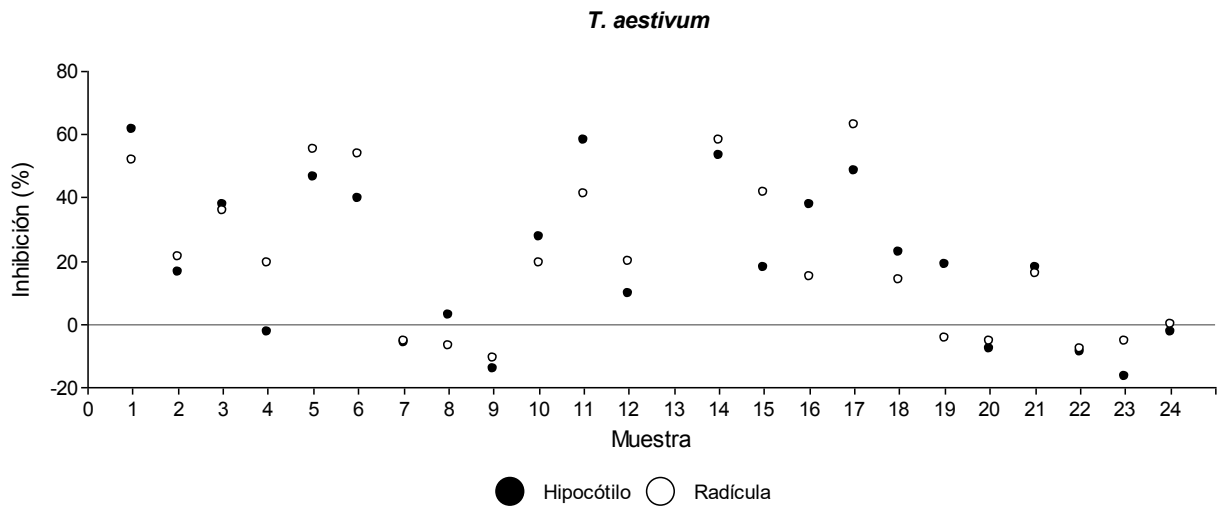


Figura 5. 5- Inhibición de la elongación (%) del hipocótilo y radícula de semillas de *T. aestivum*.

Se cuenta con escasos registros que reporten la toxicidad de los ELTs. Herrero (2014) evaluó la toxicidad de efluentes de 8 tambos, con altas cargas de DQO (>2000mg/L), mediante ensayos con semillas de *L. sativa*. Sus resultados muestran que el 75% de los efluentes no tratados fue tóxico y no se detectó efectos tóxicos en las restantes. Mientras que, luego del tratamiento, solo el 37% presentó toxicidad. Estos resultados se condicen con los niveles de toxicidad medidos para *D. magna* e *H. plagiodesmica*, pero comparados con los resultados obtenidos para las semillas de *T. aestivum* se observan mayores niveles de toxicidad. Teniendo en cuenta los

resultados observados en el Capítulo 4, es posible que las cargas orgánicas no inhiban el desarrollo de *T. aestivum*.

Otros autores reportaron que es posible cultivar *L. minor* en humedales artificiales empleados para el tratamiento de las aguas residuales de industria láctea, lo que pone en manifiesto la baja o nula toxicidad de este efluente (Adhikari et al., 2015). Sin embargo, estos los estudios se hicieron en aguas residuales con baja carga orgánica (DQO entre 260 y 1544 mg/L). En el mismo sentido, un efluente lácteo estabilizado de Irlanda resultó apto como medio de cultivo para *D. magna*, lo que indica que, además de no ser tóxico es una potencial fuente de nutrientes para invertebrados (Roche, 1998). Aunque el autor no indica las características fisicoquímicas del efluente estudiado, destaca que la tasa de natalidad fue menor en líquidos con baja concentración de oxígeno disuelto.

Finalmente, las toxicidades observadas son similares a las descritas para aguas residuales urbanas, en el capítulo 4.

Al comparar la respuesta obtenida con los ensayos de referencia (efluente crudo), surge que las sensibilidades a los ELTs crudos fueron significativamente diferentes ($p < 0,0001$) para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*, letal y subletal. En tanto el test subletal con *H. plagiodesmica* fue el indicador más sensible. La prueba LSD Fisher indica que todas las medias son significativamente diferentes.

La selección de bioensayos con semillas responde a que esto podría orientar acerca del posible uso de efluentes como riego de forrajeras. Nuestros resultados muestran que los efluentes no son tóxicos para las semillas expuestas, pero si afectan a los invertebrados por lo que, en caso de aplicación directa al suelo podrían afectar a la microfauna del suelo. Existen varios reportes de aplicación de ELTs mediante riego como abono (Diez, 2014, 2012; Gambaudo et al., 2014; Imhoff et al., 2014; Sosa et al., 2013), aun cuando los líquidos no cumplen con los parámetros normativos. Según Herrero (2014) un 5% de los tambos hacen reuso directo del efluente, sin tratamiento. Esta práctica subestima el impacto ambiental asociado.

Se clasificó los ELTs de acuerdo a una escala de toxicidad arbitraria aplicada por otros autores (Katsoyiannis and Samara, 2007; Manusadžianas et al., 2003) como: No tóxico < 1 UT, tóxico $1 - 10$ UT, muy tóxico $11 - 100$ UT, extremadamente tóxico > 100 UT. En relación a las toxicidades medidas todas las muestras se clasifican como tóxicas para *D. magna* e *H. plagiodesmica*. Mientras que para *T. aestivum* solo el 8% de las muestras fue tóxica.

La figura 5.6. presenta el resultado del agrupamiento en clúster realizado con los datos de toxicidad obtenidos para cada bioensayo. Los resultados indican una alta semejanza para los ensayos letales con *H. plagiodesmica* y *D. magna*. Mientras que el ensayo subletal con *H. plagiodesmica* es el más disímil de todos. Estos resultados son de utilidad para seleccionar entre

los ensayos considerados aquellos que podrían componer una batería óptima, así para los ELTs es estudiados los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*-Subletal son indicadores efectivos de toxicidad. Mediante futuros estudios se debe proponer un nuevo bioensayo que reemplace al ensayo con *T. aestivum*.

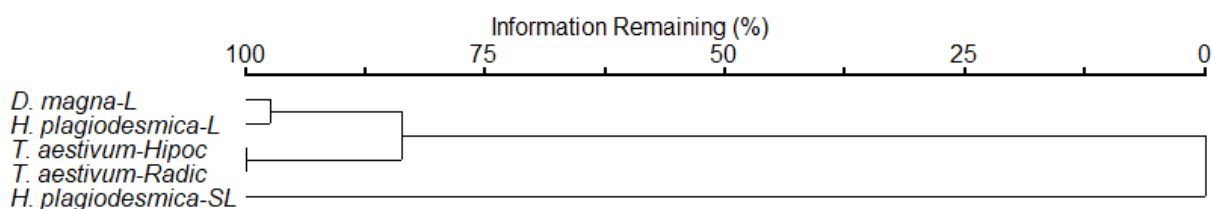


Figura 5. 6 - Análisis de clúster para los 5 puntos finales de los bioensayos aplicados. Método de ligue: Método de Ward. Distancia: Euclidea.

Toxicidad remanente:

La figura 5.7 indica la toxicidad remanente en las submuestras manipuladas, y la figura 5.8 representa los abatimientos de toxicidad generados por las manipulaciones para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*. Los test de comparación de medias para comparar la toxicidad cruda y los remantes de toxicidad luego de los tratamientos, aplicados por separado para cada final, indican que todas las manipulaciones aplicadas generaron cambios en la toxicidad de las submuestras.

Para el ensayo *D. magna*, las CE50 luego de airear fue del $89,4 \pm 11,2\%$, mientras que en las submuestras filtradas con $1 \mu\text{m}$ y $0,4 \mu\text{m}$ fue de $84,1 \pm 12,5\%$ y $93,6 \pm 8,8\%$. De ésta manera se generaron abatimientos del 31% de la toxicidad mediante aireación, 26% con el filtrado con $1 \mu\text{m}$ y 34% para el filtrado con $0,4 \mu\text{m}$. se eliminó la toxicidad en el 40% de las submuestras luego de airear, y en el 13% y 56% respectivamente luego de los filtrados con $1 \mu\text{m}$ y $0,4 \mu\text{m}$.

La CE50 para *H. plagiodesmica* luego de airear, filtrar con $1 \mu\text{m}$. y con $0,4 \mu\text{m}$. fue $73,1 \pm 20,22\%$; $71,4 \pm 17,6\%$ y $75,6 \pm 18,23\%$ respectivamente. Estos cambios implicaron abatimientos de la toxicidad del 35% para la aireación, 34% para el filtrado con $1 \mu\text{m}$ y 38% para el filtrado con $0,4 \mu\text{m}$. Las modificaciones disminuyeron el porcentaje de submuestras tóxicas así, la aireación eliminó la toxicidad en el 13% de las muestras, y los filtrados con $1 \mu\text{m}$ y $0,4 \mu\text{m}$ en el 8% y 22% respectivamente. En los resultados de los ensayos subletales se observan abatimientos similares al del ensayo letal (aireación: 42%; filtrado $1 \mu\text{m}$: 37% y filtrado con $0,4 \mu\text{m}$: 48%).

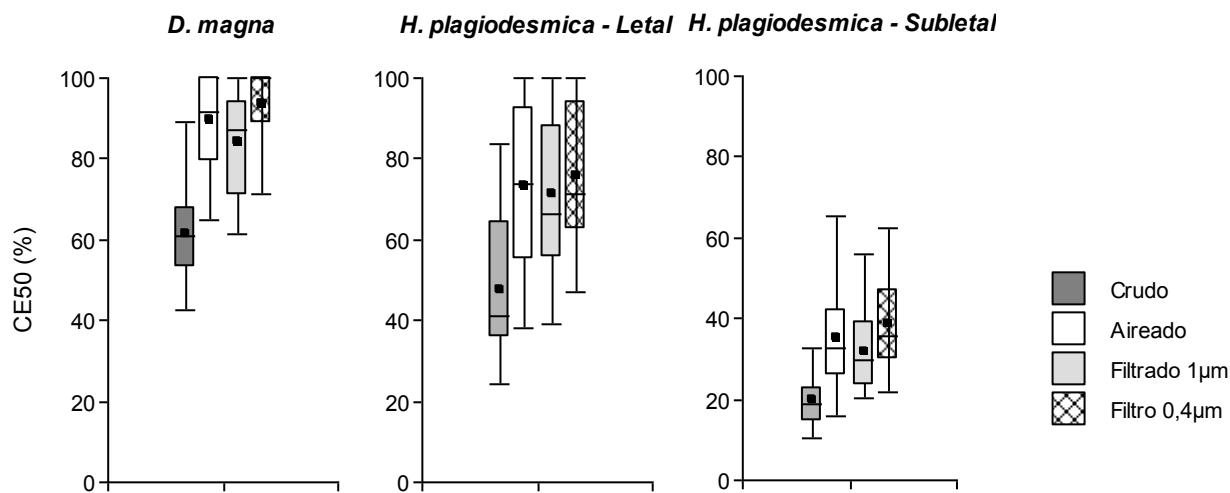


Figura 5. 7 - CE50 para residuos líquidos de tambo y CE50 remanente en las submuestras manipuladas con i) aireación, ii) Filtrado 1 µm, iii) Filtrado con 0,4 µm. Se indica media \pm 3 SD.

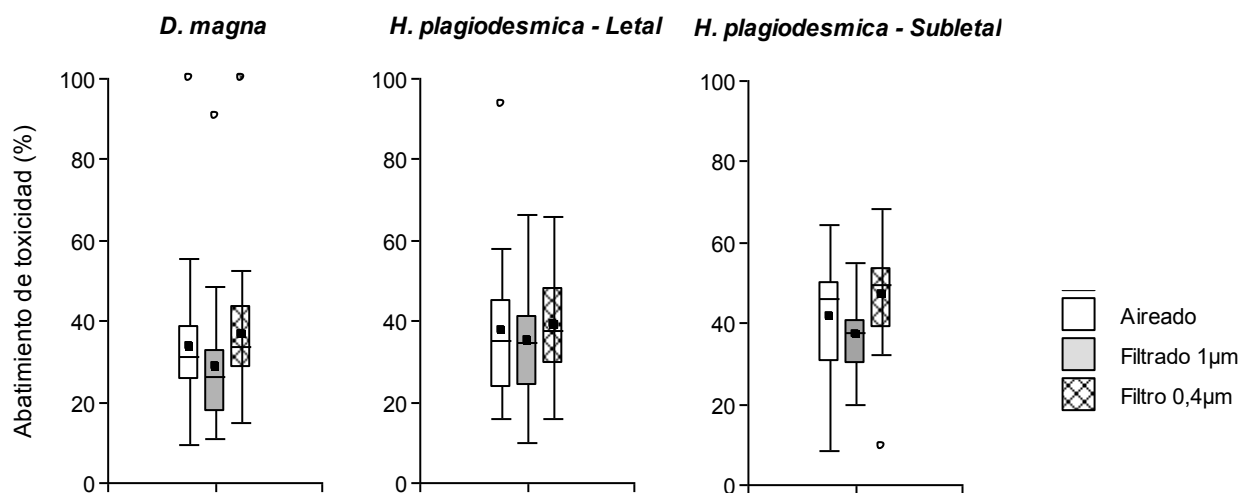


Figura 5. 8 - Abatimientos de toxicidad (%) estimados para cada punto final y manipulación aplicada

Al aplicar un test de comparación de medias para comparar el abatimiento por aireación se observó que los abatimientos no fueron diferentes ($p=0,1413$). Así, no existen diferencias estadísticamente significativas para el abatimiento entre los ensayos letal y subletal con *H. plagiodesmica*. Y, a su vez los abatimientos cuantificados en los ensayos letales con *H. plagiodesmica* y con *D. magna* tampoco son significativamente diferentes.

El test de comparación de medias para el abatimiento generado al filtrar con 1 µm indicó que no existen diferencias significativas entre los abatimientos ($p=0,0708$).

El abatimiento por aireación fue similar al observado para ELUs, si bien presentaban menor DQO (Capítulo 4). La materia orgánica vegetal presente en estiércol es de difícil degradación

puede que ésta sea la razón para que los abatimientos por aireación sean similares en aguas residuales con diferentes cargas orgánicas.

Los tratamientos aplicados generaron disminución de la toxicidad, sin embargo, no se observó ningún tratamiento que remueva la toxicidad en forma efectiva. En función a los resultados anteriores se observa que parte de la fracción toxica reside en la carga orgánica oxidable y en los sólidos filtrables. Se necesitan estudios complementarios para describir las fracciones tóxicas en más detalle. Por otro lado, respecto al manejo del ELTs estudiado resulta importante la implementación de una correcta separación de sólidos previo al tratamiento, que permita disminuir la alta carga orgánica del efluente, como así también la instalación de un sistema de lagunas de estabilización adecuadamente dimensionadas y controladas.

Análisis multivariado aplicado a variables fisicoquímicas y parámetros toxicológicos:

Debido a la baja capacidad como indicador de toxicidad para los ELTs estudiados demostrada para *T. aestivum*, no se consideraron estos datos en los siguientes análisis.

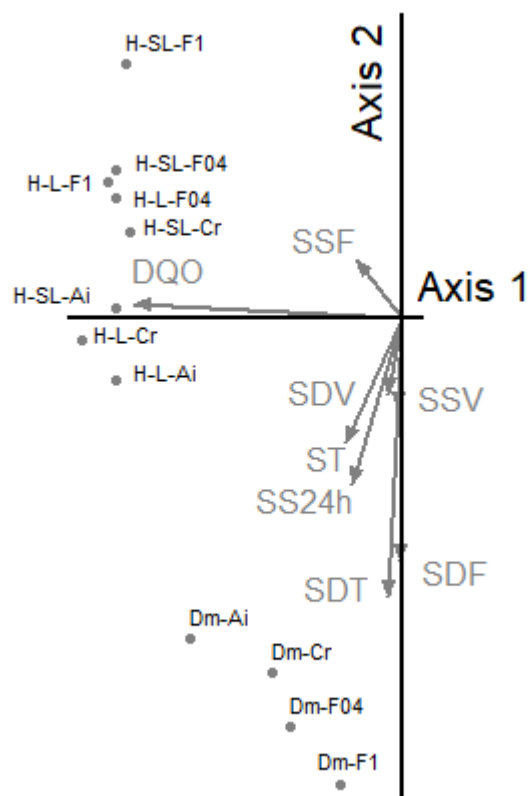


Figura 3. 16- CCA realizado entre los datos toxicológicos y los parámetros fisicoquímicos. Eje 1: 54,1; eje 2: 23,6 y eje 3: 6 % de la variabilidad de los datos. Referencias datos toxicidad: Primer letra indica especie D= *D. magna*, H= *H. plagiodesmica*. Para ésta última se indica a continuación ensayo letal (L) o subletales (SL). La última parte del rótulo indica submuestras: Cr= cruda (sin tratamiento), Ai= aireada y F1, y F04= filtrada con 1 y 0,4 μm respectivamente.

En el CCA realizado entre las variables fisicoquímicas y los remanentes de toxicidad (UT) se observa que los ensayos con *H. plagiodesmica*, tanto letales como subletales, responden en distinta medida a la DQO, mientras que para los ensayos con *D. magna* lo hacen a los ST y SD y la vinculación con SD se incrementa con el filtrado. Estos resultados indican que la carga toxica corresponde a alta carga orgánica y presencia de SDT. Para el caso de *D. magna*, el importante efecto de la fracción de solidos entre 1 y 0,4 μm se observó durante el análisis de los abatimientos. Y la asociación del remanente de toxicidad luego de filtrar con 0,4 μm . con los SD se condice que el alto porcentaje de muestras que mantuvieron su carácter de tóxicas luego de la manipulación.

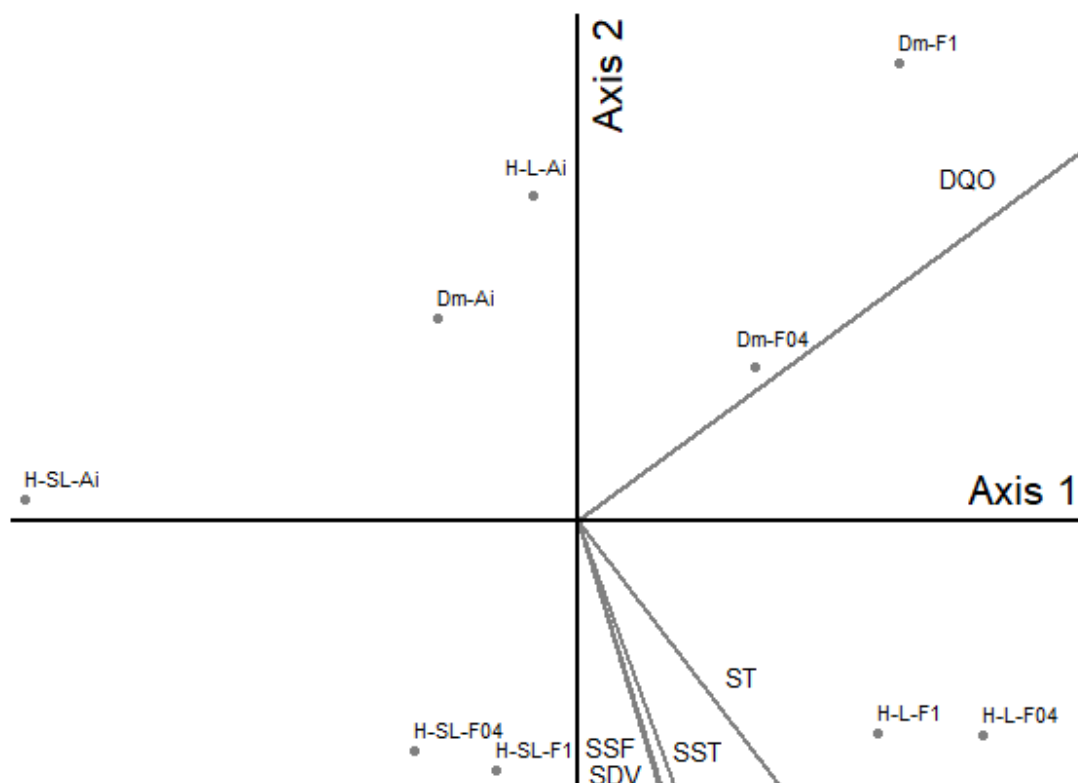


Figura 5. 9 - CCA realizado entre los datos toxicológicos y los parámetros fisicoquímicos. Eje 1: 16; eje 2: 11 y eje 3: 4.6 % de la variabilidad de los datos. Referencias datos toxicidad: Primera letra indica especie D= *D. magna*, H= *H. plagiodesmica*. Para ésta última se indica a continuación ensayo letal (L) o subletales (SL). La última parte del rótulo indica submuestras: Cr= cruda (sin tratamiento), Ai= aireada y F1, y F04= filtrada con 1y 0,4 μm respectivamente.

El CCA realizado entre los abatimientos y los parámetros fisicoquímicos explica un porcentaje bajo de la información. No se observa vinculación entre los abatimientos por aireación para ningún ensayo. Se muestra una leve respuesta de los abatimientos por filtrado para *D. magna*, que indicaría que al filtrar se remueve parte de la carga orgánica tóxica. Los abatimientos para *H. plagiodesmica* aparecen asociados a la carga de sólidos.

Sin embargo, no se obtuvieron correlaciones importantes ($>0,5$) entre los parámetros fisicoquímicos y las toxicidades (cruda y remanentes) ni los abatimientos generados por los

tratamientos. Las variables fisicoquímicas se mantuvieron siempre en valores altos y con escasa variación, por lo que los valores más bajos medidos continúan siendo altos. Esta falta de variabilidad en los datos puede ser parte de la explicación a la falta de correlación general. Otro factor podría ser la alta vinculación entre la DQO y los sólidos filtrables debida a la composición de los ELTs, ya que es posible que al filtrar con poro de 1 μm se esté extrayendo una gran parte de la carga orgánica.

Otros autores reportan que la toxicidad de ELTs parece relacionarse con la DQO en los efluentes sin tratamiento ya que los no tóxicos correspondieron a los niveles más bajos de DQO, pero en los líquidos tratados no se observa esa relación (Herrero, 2014). Esto coincide con otros autores que manifiestan que no se puede establecer relación entre DQO y toxicidad en efluentes líquidos (Araújo et al., 2005). En particular el resultado obtenido se contradice con los obtenidos para ELUs, descritos en Capítulo 4, en los cuales los ensayos con *D. magna* se vincularon ampliamente con la DQO. Ésta diferencia puede deberse a que los rangos de las DQO medidas fueron marcadamente disímiles entre los ELT y los ELU, producto de las diferentes características de los efluentes.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los CCA y de las comparaciones de toxicidad, se observa que entre las fracciones que aportan a la toxicidad del efluente, es la fracción orgánica la que aporta más significativamente.

5.4 CONCLUSIONES:

Los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica* resultan útiles para la evaluación toxicológica de los ELT estudiados, no así el ensayo con *T. aestivum* que presentó muy baja sensibilidad frente a los tóxicos presentes. De manera concluyente, los resultados señalan al test subletal con *H. plagiodesmica* como el indicador más sensible a la toxicidad de base del efluente, en comparación con los ensayos letales.

Todas las muestras estudiadas se clasificaron como tóxicas y la toxicidad disminuyó con las manipulaciones. Todos los ensayos sobre las submuestras mostraron alta sensibilidad a los cambios de toxicidad generados por los tratamientos. Los tratamientos aplicados a las submuestras generaron cambios en la toxicidad que difieren significativamente para los ensayos subletales con *H. plagiodesmica* y *D. magna*. De esta forma se pone en manifiesto la diferencia de sensibilidad entre ensayos y su diferente capacidad para indicar presencia de tóxicos. Si bien la aplicación de un protocolo de fraccionamiento generó información valiosa, es necesario tener en cuenta que no se logró eliminar la toxicidad completamente mediante ninguna de las

manipulaciones aplicadas, lo que evidencia un reservorio importante de tóxicos remanes. Consideramos que son necesarios más estudios para lograr un mejor entendimiento del tipo de residuo y así aportar a mejorar la eficiencia de los sistemas de tratamiento.

En función de los resultados obtenidos, una parte importante de la toxicidad corresponde a compuestos orgánicos oxidables y a sólidos mayores a 1 µm. Considerando el origen del efluente, es posible que estas dos fracciones presenten alto solapamiento en su composición. Esta asociación es confirmada en parte mediante los análisis multivariados entre datos toxicológicos y fisicoquímicos, donde los ensayos con *H. plagiodesmica* se relacionan a la DQO. Por otro lado, los ensayos con *D. magna* se muestran asociados a SSe y SD principalmente. Aunque los abatimientos de toxicidad no pudieron ser vinculados a las variables fisicoquímicas evaluadas, los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica* demostraron ser de utilidad para procedimientos estandarizados de caracterización de los ELTs.

5.5 BIBLIOGRAFÍA:

- Adhikari, U., Harrigan, T., Reinhold, D.M., 2015. Use of duckweed-based constructed wetlands for nutrient recovery and pollutant reduction from dairy wastewater. *Ecol. Eng.* 78, 6–14. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.05.024
- APHA, 1998. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington, DC, DC.
- Araújo, C.V., Nascimento, R.B., Oliveira, C.A., Strotmann, U.J., da Silva, E.M., 2005. The use of Microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil). *Chemosphere* 58, 1277–1281.
- Badino, O., Schmidt, E., Ramos, E., Herrero, M.A., Weidmann, R., Giraud, F., 2015. Uso del agua, manejo de efluentes y residuos en tambos del noreste de la provincia de Santa Fé (Argentina). *Rev. FAVE - Ciencias Agrar.* 14, 7–16.
- Botts, J.A., Braswell, J.W., Goodfellow, W.L., Bishop, D.F., 1988. Toxicity Reduction Evaluation at the Patapsco Wastewater Treatment Plant. US EPA.
- Buseti, M., Suárez, V., 2008. Situación actual de los tambos en Argentina. *INTA* 6.
- Cappellini, O.R., 2011. Dairy development in Argentina, Fao.
- Castillo Morales, G. (Ed.), 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Craggs, R.J., Sukias, J.P., Tanner, C.T., Davies-Colley, R.J., 2004. Advanced pond system for dairy-farm effluent treatment. *New Zeal. J. Agric. Res.* 47, 449–460. doi:10.1080/00288233.2004.9513613
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Diez, M., 2014. Respuesta del maíz a la aplicación de efluentes de tambos en entisoles y molisoles de la planicie medanosa. FCEyN-UNLPam.
- Diez, M., 2012. Efluentes de tambo, mucho más que residuos. *Sitio Argentinbo Prod. Anim.* 20, 1–4.
- Gambaudo, S., Imhoff, S., Carrizo, M.E., Marzetti, M., Racca, S., 2014. Uso de efluentes líquidos de tambo para mejorar la productividad de cultivos anuales y la fertilidad del suelo. *Cienc. del Suelo* 32, 197–208.

- García, K.E., Charlón, V., Cuatrín, A., Taverna, M., Walter, E., 2006. Evaluación de un sistema de tratamiento de efluentes generados en las instalaciones de ordeño. Comunicación. Rev. Argentina Prod. Anim. 28, 313–314.
- Gutiérrez, M.S., Cabrera, M.N., Benítez, A., Gutiérrez, A., 2008. Manual para el manejo de Efluentes de Tambo, 1ra edició. ed. Proyecto Producción Responsable - M.G.A.P, Montevideo, Uruguay.
- Herrero, M.A., 2014. Uso y manejo del agua y efluentes en un área rural: Consecuencias sanitarias y ambientales de la intensificación de la producción primaria de leche. UBA.
- Imhoff, S., Carrizo, M.E., Martel, R., Lotto, V., Zen, O., 2014. Efluentes líquidos de tambo: Efectos de su aplicación sobre las propiedades físicas de un argiudol. Cienc. del Suelo 32, 177–187.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. J. Hazard. Mater. 141, 614–621. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.038
- Manusadžianas, L., Balkelyte, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Põllumaa, L., Kahru, A., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: Selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. Aquat. Toxicol. 63, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(02)00132-7
- McCune, B., Mefford, M.J., 2011. PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data.
- Otero, A., 2015. Tratamiento de efluentes en un tambo comercial, Memoria Técnica 2013-2014 - INTA EEA General Villegas.
- Roche, K.F., 1998. Growth potential of *Daphnia magna* Straus in the water of dairy waste stabilization ponds. Water Res. 32, 1325–1328. doi:10.1016/S0043-1354(97)00272-8
- Sosa, N., Orcellet, J.M., Gambaudo, S., Minetti, I., 2013. Uso de efluente de tambo en la producción de maíz para silo. Inf. INTA EEA Rafaela.
- U.S. EPA, 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase Toxicity Characterization Procedures. US EPA.

Capítulo 6

CONCLUSIONES GENERALES

Durante el desarrollo de esta Tesis se abordaron dos tipos de efluentes líquidos, los de origen urbano (ELUs) y los generados durante las operaciones normales de un tambo (ELTs).

Para este abordaje fue necesaria una extensa búsqueda de antecedentes que, aun siendo un tema de relativo reciente interés, cuenta con un enorme bagaje de reportes de la emisión de contaminantes emergentes de este origen en diferentes lugares del mundo.

En este marco y con la finalidad de indagar en el papel que juegan los fármacos como sustancias contaminantes en este tipo de efluentes se seleccionaron dos fármacos de amplio uso en salud humana que, durante la revisión inicial, surgen como los más abundantes en ELUs: ibuprofeno (IBP) y acetaminofeno (ACF). Para estos dos fármacos la información sobre sus riesgos ambientales dista de estar completa y, en particular, son escasos los estudios que involucren a los enantiómeros del ibuprofeno. Por esta razón se estudió la ecotoxicidad de los enantiómeros del ibuprofeno (IBP) por sí solos y en concurrencia con acetaminofeno (ACF).

Respecto del estudio de las propiedades ecotoxicológicas del IBP y ACF, concluimos que:

- Se generó información toxicológica nueva para el enantiómero S-IBP. El presentado en este trabajo, es el primer reporte de la toxicidad de S-IBP para *D. magna*.
- Todos los fármacos estudiados presentaron CE50-48h en el rango 10 -100 mg/L, lo que implica considerarlos como fármacos nocivos para los organismos acuáticos.
- S-IBP es más tóxico que R/S-IBP para *D. magna*. Así, los enantiómeros S(+) y R(-) no son ecotoxicológicamente equivalentes.
- En la evaluación de la toxicidad de las mezclas correspondientes al 50% de efectos los valores obtenidos tanto para la mezcla de R/S-IBP con ACF como para S-IBP con ACF se ajustaron a lo estimado con el modelo de AC. Sin embargo, el efecto observado y el efecto predicho difieren al considerar únicamente AC para las concentraciones de prueba más altas (CE75/2) y las más bajas (CE10/2 y CE25/2). Así, las curvas de respuestas observadas no se corresponden con ninguno de los modelos considerados. Este análisis indica que no hay un modo de acción específico que explique la toxicidad de las mezclas.

- En la evaluación de la toxicidad de las mezclas se observaron efectos tóxicos aun cuando las concentraciones individuales fueron menores o iguales a los NOEC individuales. En función a esto, existe un riesgo ambiental significativo asociado con la presencia simultánea de enantiómeros de IBP y ACP, siendo el riesgo para S-IBP mayor que el que presentaría el R/S-IBP. Teniendo en cuenta que sus vertidos al medio son continuos, para futuras investigaciones se debe indagar acerca de su efecto combinado a bajas concentraciones y a tiempos más prolongados de exposición.
- Desde el punto de vista ambiental, la sustitución de formulaciones farmacológicas constituidas por S/R-IBP por otras constituidas por S-IBP no es inocua.
- Parece relevante evaluar los factores ambientales al momento de establecer la validez del uso, y por lo tanto la aprobación de su uso, de un fármaco o de una mezcla de fármacos con fines terapéuticos o productivos.

Debido a complejidad y variabilidad de la composición de los efluentes líquidos, puesta en manifiesto durante la búsqueda de antecedentes, surge la necesidad de abordar su estudio desde una perspectiva integradora, no limitada únicamente a la determinación de parámetros fisicoquímicos, sino que incluya también consideraciones de su toxicidad. Así, se aplicaron metodologías ecotoxicológicas para la caracterización de los efluentes líquido urbanos y pecuarios, con el objetivo no solo de conocer su toxicidad sino también de identificar las fracciones de aportan a la toxicidad global e indagar las vinculaciones entre la toxicidad y los parámetros fisicoquímicos tradicionalmente evaluados. Respecto de las metodologías aplicadas concluimos que:

- Si bien existen escasos registros de la aplicación de bioensayos con *H. plagiodesmica*, es posible considerarlo un indicador sólido para la evaluación de efluentes del tipo de los ensayados, teniendo en cuenta la reproducibilidad y precisión analítica de la prueba. Es también relevante el hecho que, entre los ensayados, ésta resulto ser la prueba más sensible.
- El ensayo de inhibición del crecimiento realizado con *T. aestivun* no resultó útil como bioindicador de la calidad de los líquidos estudiados y debe ser evaluado su reemplazo por otro ensayo de mayor sensibilidad que utilice organismos vegetales superiores, de manera de cubrir adecuadamente la estimación de riesgos tóxicos sobre este grupo taxonómico.
- a aplicación de un protocolo de fraccionamiento para la identificación de las fracciones tóxicas resultó efectiva y generó información valiosa, que sirve de referencia para aquellos estudios dirigidos a mejorar la eficiencia de los sistemas de tratamiento. Esto es relevante

L

dado que aún prevalecen las metodologías de optimización dirigidas a correlacionar la composición de los líquidos residuales y el abatimiento de sus componentes, y es aún insuficiente la sistematización de metodologías de optimización, orientadas al abatimiento de la toxicidad.

Respecto de los efluentes líquidos urbanos y pecuarios abordados, concluimos que:

- Todas las muestras de ELUs y ELTs evaluadas fueron clasificadas como tóxicas para *D. magna* e *H. plagiodesmica*. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que las especies empleadas responden de diferente manera a los tóxicos presentes.
- Los resultados mostraron una variabilidad importante, tanto en la toxicidad de los efluentes a lo largo del tiempo, como en los remanentes de toxicidad luego de los diferentes tratamientos aplicados. Esta variabilidad pone en manifiesto la constante fluctuación en la composición de este tipo de líquidos residuales durante el año que duraron los muestreos. Esto justifica la aplicación de un enfoque integral, como el que se aplicó.
- Los niveles de remoción de la toxicidad generados durante los tratamientos fueron variables, acorde a la naturaleza compleja de las muestras. Sin embargo, la aplicación del método de fraccionamiento permitió definir en forma más específicas las características de los componentes tóxicos que aportan en mayor parte a la toxicidad global y por lo tanto se genera información valiosa para el diseño específico de los tratamientos necesarios para su abatimiento.
- Las fracciones que aportan mayormente a la toxicidad de los ELUs fueron los sólidos suspendidos y los compuestos orgánicos no polares. Esta asociación es confirmada mediante los análisis multivariados entre datos toxicológicos y fisicoquímicos.
- Las fracciones que aportan mayormente a la toxicidad de los ELTs se asociaron a los compuestos orgánicos oxidables y a los sólidos suspendidos. Son necesarios más estudios en ELTs ya que, aún después del filtrado con 0,4 μm , las submuestras conservaron una carga tóxica importante que no pudo ser caracterizada adecuadamente.
- El análisis de datos multivariados mostró que la determinación de parámetros fisicoquímicos junto a los ensayos de toxicidad son herramientas indispensables y complementarias para el estudio de la calidad de los vertidos de efluentes líquidos.

Respecto de los resultados específicos de ambos efluentes líquidos utilizados como sistemas modelo en esta tesis, concluimos que:

- Los resultados obtenidos para los ELUs manifiestan deficiencias en el tratamiento aplicado en la planta de tratamiento Norte, y se presume que la aplicación de un tratamiento que reduzca la DQO y el contenido de sólidos suspendidos mejorará considerablemente las características toxicológicas. En estudios posteriores sería de gran valor informativo evaluar la eficiencia del sistema de tratamiento *in situ*.
- Los resultados obtenidos para los ELTs estudiados indican la necesidad de desarrollar y aplicar un sistema de tratamiento adecuado.
- Los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica* pueden ser aplicados en la rutina de controles de calidad de estas aguas residuales. Su sensibilidad ante la extracción o degradación de componentes que aportan a la toxicidad los hace una herramienta útil para informar acerca de la eficiencia del tratamiento aplicado y como sistema de alerta ante tratamientos deficientes.

ANEXO: Glosario de siglas y abreviaturas.

AC: Modelo de efectos en una mezcla donde los componentes poseen igual mecanismo de acción.

ACF: Acetaminofeno.

Ai: Indica submuestra de efluente líquido aireada.

AI: Modelo de efectos en una mezcla donde los componentes poseen diferentes modos de acción.

BPA: Bisfenol A.

CCA: Análisis de correspondencia canónica

CE10: Concentración que causa un efecto determinado en el 10 % de la población expuesta. Para el caso de efluentes se refiere a una dilución en medio de control.

CE25: Concentración que causa un efecto determinado en el 25% de la población expuesta. Para el caso de efluentes se refiere a una dilución en medio de control.

CE50: Concentración que causa un efecto determinado en el 50% de la población expuesta. Para el caso de efluentes se refiere a una dilución en medio de control.

CE75: Concentración que causa un efecto determinado en el 75% de la población expuesta. Para el caso de efluentes se refiere a una dilución en medio de control.

CI50: Concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento. Para el caso de efluentes se refiere a una dilución en medio de control.

CL50: Concentración que causa la muerte en el 50% de la población expuesta. Para el caso de efluentes se refiere a una dilución en medio de control.

COD: Carbono orgánico disuelto.

COPs: Compuestos orgánicos persistentes.

COT: Carbono orgánico total.

Cr: Indica muestra de efluente líquido crudo, sin manipulación.

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno

DQO: Demanda química de oxígeno.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELU/s: Efluente/s líquidos urbanos.

ELT/s: Efluente/s líquidos de tambo.

F02: Indica submuestra de efluente líquido filtrada con 0,22 μm .

F04: Indica submuestra de efluente líquido filtrada con 0,42 μm .

F08: Indica submuestra de efluente líquido filtrada con 0,8 μm .

F1: Indica submuestra de efluente líquido filtrada con 1 µm.

FT: Fósforo total.

GC/MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas.

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

HPLC–MS/MS: cromatografía líquida de alta presión con detección de masa en tándem

IBP: Ibuprofeno.

K₂Cr₂O₇: Dicromato de potasio.

LD: Límite de detección

NOAEL: La máxima concentración o nivel de una sustancia que no causa alteraciones adversas detectables.

NT: Nitrógeno total.

PCBs: Bifenilos policlorados.

R/S-IBP: Mezcla racémica de los enantiómeros de IBP.

R-IBP: Enantiómero levógiro del IBP

SDF: Sólidos disueltos fijos a 550°.

SDT: Sólidos disueltos totales.

SDV: Sólidos disueltos volátiles.

S-IBP: Enantiómero dextrógiro del IBP.

SPE: Extracción en fase sólida.

SSE: Sólidos sedimentables en volumen en función del tiempo de sedimentación.

SSF: Sólidos suspendidos fijos.

SST: Sólidos suspendidos totales (filtrables a 1µm).

SSV: Sólidos suspendidos volátiles.

ST: Sólidos totales.

TIE: Evaluación de la identidad de la toxicidad.

UHPLC: Cromatografía líquida de alta performance.

UT: Unidades tóxicas calculadas mediante la fórmula: $UT = \frac{100}{CB50 \text{ o } CL50}$