

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Evaluación de la toxicidad en fangos
activos”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

ROMÁN LLAVONA ÁLVAREZ

JULIO, 2020



Contenido

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
Lista de figuras	5
Lista de tablas	6
1. Introducción	7
1.2. Objetivos.....	10
2. Revisión.....	11
2.1. Bioensayos de toxicidad	11
2.1.1. Ensayo de luminiscencia bacteriana.....	12
2.1.2. Bioensayo de inhibición de la nitrificación.....	14
2.1.3. Bioensayo con peces	15
2.1.4. Bioensayo con invertebrados	16
2.1.5. Bioensayo con plantas y algas.....	17
2.2. Biosensores.....	19
2.3. Análisis químicos completos	21
2.4. Citometría de flujo.....	27
2.5. Respirimetría	31
2.6. Otros	34
3. Discusión.....	37
4. Conclusiones	40
5. Acrónimos	41
6. Bibliografía.....	42

RESUMEN

Se lleva a cabo una revisión bibliográfica y discusión de los principales métodos para la detección de toxicidad en sistemas de lodos activos para el tratamiento de aguas residuales. Estos métodos son: bioensayos de toxicidad, biosensores, análisis químico completo, citometría de flujo, respirometría y *quantum dots*. Los bioensayos de toxicidad se basan en el empleo de microorganismos para detectar diferentes parámetros relacionados con el nivel de toxicidad presente en las aguas residuales a depurar mediante sistemas de lodos activos. Por otra parte, los biosensores son dispositivos analíticos que tiene dos partes fundamentales que son el elemento de detección, o receptor biológico, y el transductor, capaz de transformar la señal del elemento de detección y traducirla a una señal cuantificable. Los análisis químicos consisten en el empleo de técnicas analíticas, como son la cromatografía líquida y la cromatografía de gases, para detectar y cuantificar los compuestos químicos responsables de esa toxicidad en el agua residual. Por su parte, la citometría de flujo se basa en la detección de células viables presentes en los lodos activos o aguas residuales y que posteriormente son coloreadas con un tinte. Los lodos se introducen en el instrumento de medida y mediante la radiación de un láser, se obtiene la información de manera rápida. La respirometría relaciona la toxicidad de una corriente, con la variación en la velocidad específica de consumo de oxígeno de los organismos presentes en el lodo activo. Finalmente, los *quantum dots* son compuestos de carbono en escala nanométrica que sirven para detectar metales o bacterias que se encuentren en el lodo activo. La elección de un método u otro de detección de la toxicidad depende de los avances que se van realizando en las investigaciones a lo largo de los años y también del contaminante o contaminantes que generan esa toxicidad en lodos activos y aguas residuales. Esos avances que se van realizando están relacionados con el tiempo de respuesta de cada método, la sensibilidad a una o varias sustancias tóxicas a la vez y a que el método sea fácilmente manejable y entendible.

ABSTRACT

A bibliographic review and discussion of the main methods for toxicity detection in active sludge systems for wastewater treatment are carried out. These methods are toxicity bioassays, biosensors, complete chemical analysis, flow cytometry, respirometry and quantum dots. Toxicity bioassays are based on the use of microorganisms to detect different parameters related to the level of toxicity present in the wastewater to be purified using active sludge systems. Otherwise, biosensors are analytical devices that have two fundamental parts: the detection element, or biological receptor, and the transducer, capable of transforming the signal of the detection element and translating it into a quantifiable signal. Chemical analyzes consist of the use of analytical techniques, such as liquid chromatography and gas chromatography, to detect and quantify the chemical compounds responsible for this toxicity in wastewater. For its part, flow cytometry is based on the detection of viable cells present in the active sludge or wastewater and which are subsequently colored with a dye. Sludges are introduced into the measuring instrument and by means of laser radiation, the information is obtained quickly. Respirometry relates the toxicity of a current with the variation in the specific rate of oxygen consumption of the organisms present in the active sludge. Finally, quantum dots are nano-scale carbon compounds that serve to detect metals or bacteria found in active sludge. The choice of one method or another for the detection of toxicity depends on the advances that are being made in the investigations over the years and also on the pollutant or pollutants that generate this toxicity in active sludge and wastewater. These advances that are being made are related to the response time of each method, the sensitivity to one or more toxic substances at the same time and to the method being easily manageable and understandable.

Lista de figuras

Figura 1. Procesos típicos de depuración de aguas residuales en una EDAR.	8
Figura 2. Reacción de la luciferina	12
Figura 3. Respuesta luminiscente derivada de los diferentes efluentes industriales alimentarios de la provincia de Córdoba.	14
Figura 4. Principio de funcionamiento de un biosensor	19
Figura 5. Clasificación de los biosensores.....	20
Figura 6. Pasos del método de extracción QuEChERS.	24
Figura 7. Esquema GC-MS	25
Figura 8. Esquema de LC-MS.	26
Figura 9. Representación esquemática del funcionamiento de la citometría de flujo	27
Figura 10. A. Ejemplo de flóculos de lodos activos. B. Ejemplo de una suspensión de bacterias después de llevar a cabo los ultrasonidos para romper los flóculos	29
Figura 12. Respirómetro BM-EVO	33
Figura 13. Respirograma, mide la Tasa de respiración específica.	34

Lista de tablas

Tabla 1. Bioensayos de vertebrados, indicando especie, parámetro a medir y referencia	16
Tabla 2. Bioensayo de invertebrados, indicando especie, parámetro a medir y referencia	17
Tabla 3. Bioensayos de plantas y algas indicando especie, parámetro a medir y referencia	18
Tabla 4. Aplicaciones de la citometría de flujo en la industria alimentaria y aguas residuales urbanas.....	30
Tabla 5. Tabla comparativa de todos los métodos.....	37

1. Introducción

Los efluentes acuosos de la industria alimentaria son el problema más grave de contaminación de este tipo de industrias, ya que el agua es un disolvente casi universal y en el que prácticamente todas las sustancias son solubles hasta un cierto grado.

Es por ello que, después del tratamiento de las materias primas para llegar a obtener el producto deseado en un proceso agroalimentario, se genera una gran cantidad de residuos que se retiran con agua, obteniéndose una gran cantidad de aguas residuales. Estos procesos son principalmente: lavado de la materia prima, eliminación de la parte no comestible, preparación del producto alimenticio y envasado. Las actividades realizadas por la industria alimentaria generalmente conllevan un gran consumo de agua y una gran cantidad de contaminantes en sus vertidos, principalmente contaminantes orgánicos y, a veces, minerales.

Como consecuencia de estas actividades, la composición del agua residual generada es muy heterogénea, con altas DQO y DBO, predominando los siguientes contaminantes:

- Residuos de animales y vegetales.
- Materias en suspensión procedente del arrastre y lavado tanto de maquinaria como de materias primas.
- Productos putrescibles: grasas, azúcares, dextrinas, proteínas.
- Materias en disolución diversas: Sales disueltas, plaguicidas, detergentes...

El agua residual generada suele ser tratada en una estación depuradora, que puede estar dentro de la propia industria y/o ser una estación depuradora de aguas residuales, EDAR, que recibe las aguas de distintas empresas y hogares a través del sistema de alcantarillado. Los valores de contaminación en los efluentes de la industria alimentaria dependen de cada comunidad autónoma y, en ocasiones, incluso de los ayuntamientos.

En el caso de Asturias, se dan unos valores concretos de los contaminantes presentes en el agua que se vierte, procedentes de fábricas. En este sentido, el BOPA Ley 5/2002 indica las características que debe de cumplir el vertido, cómo tratar el efluente dependiendo de la industria y qué industrias deben solicitar el permiso para añadir los vertidos a la red de saneamiento urbano.

Dentro de la estación depuradora, a este agua residual se le realizan una serie de procesos, tanto biológicos, físicos y químicos, para separar los contaminantes sólidos suspendidos, contaminantes orgánicos o inorgánicos del agua, como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Procesos típicos de depuración de aguas residuales en una EDAR. (Pariente, 2017)

Dentro de los procesos típicos de depuración a los que se someten las aguas residuales, el tratamiento secundario es la etapa crítica. Este tratamiento incluye todos aquellos procesos enfocados a la eliminación de la materia orgánica disuelta. Debido a su sencillez y bajo coste, el proceso biológico de fangos activos es el más extendido como tratamiento secundario en depuradoras. El sistema de fangos activos consiste en un proceso biológico que permite el desarrollo de una depuración natural en la que los microorganismos son capaces de degradar los contaminantes del agua y devolverla a su estado natural. Esto se lleva a cabo a través de un proceso aerobio, que sería la aireación prolongada y la recirculación de fangos activos para así eliminar las sustancias biodegradables que están en el agua residual. (Anon., 2015)

Algunas de las ventajas que presenta el tratamiento de lodos activos son el alto grado de flexibilidad para el tratamiento de diversos tipos de aguas residuales, es decir, la capacidad que tienen los lodos activos para recibir cualquier tipo de agua residual sin verse afectada la degradación que se estaba realizando. También presenta una alta eficiencia gracias a la velocidad de degradación de las sustancias biodegradables, y además, puede tolerar grandes cantidades de residuos orgánicos sin verse afectado por ello. (Tchobanoglous, et al., 2002)

Las principales desventajas son: en primer lugar, la actividad de los microorganismos utilizados en el tratamiento biológico puede verse afectada por la presencia de compuestos tóxicos y estables a la biodegradación, en segundo lugar, se generan grandes cantidades de lodos y, por último, el riesgo de taponamiento de los dispositivos de aireación. (Hazen and Sayer, 2011)

El seguimiento y control de las aguas residuales ha sido tradicionalmente regulado usando métodos con respuestas no específicas y midiendo parámetros globales, como el carbono orgánico total (COT) o la demanda química de oxígeno (DQO) (Farré & Barceló, 2003). El primero se basa en la suma de todos los compuestos orgánicos presentes en la muestra (Kappe, 2015) y el segundo parámetro es una medida de la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar toda la materia orgánica presente en un agua residual. (Altes, 20018) Sin embargo, estos métodos no proporcionan suficiente información sobre los efectos biológicos de estos efluentes en los sistemas de fangos activos. El número de productos químicos que llegan con el agua al sistema de fangos activos es elevado y aumenta de manera continuada, puesto que se están desarrollando y liberando constantemente nuevas sustancias. (Tobajas & Molina, 2017) Esto hace que la actividad microbiana pueda verse afectada por la presencia de compuestos xenobióticos que son tóxicos, químicamente estables o resistentes a la biodegradación. Debido a ello, se provoca un grave perjuicio económico y medio ambiental, pues puede afectar, por una parte, a la biodegradación orgánica del agua residual, inhibiéndola, y, por otra, a la eficiencia de la reducción de la fase líquido-sólida, lo que modificará las propiedades de los fangos, afectando consecuentemente a la calidad del efluente final.

Por este motivo, es necesario evaluar la biodegradabilidad y la toxicidad de los contaminantes presentes en un agua residual sobre la población microbiana antes de

realizar su tratamiento biológico con un sistema de fangos activos. Es importante resaltar que toxicidad y biodegradabilidad no siempre son mutuamente excluyentes. Por lo tanto, las sustancias que son consideradas tóxicas se pueden eliminar de manera eficiente en un biorreactor a concentraciones bajas por debajo de un límite, mientras que otros compuestos menos tóxicos pero que sean poco o nada biodegradables se liberarían al medio ambiente con el riesgo de acumularse y alcanzar concentraciones que produjeran efectos adversos para los diferentes compartimentos ambientales.

Por lo tanto, a la hora de tratar un agua residual alimentaria mediante un sistema biológico (de fangos activos u otro), es imprescindible disponer de ensayos de toxicidad rápidos, baratos y reproducibles que permitan determinar la viabilidad de su depuración mediante un proceso biológico y su efecto sobre la microbiota de éste.

1.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica pormenorizada y discusión de los principales métodos disponibles para la medida de la toxicidad y/o biodegradabilidad de compuestos o matrices complejas sobre sistemas de tratamiento mediante fangos activos. Para ello, se realizará una descripción de cada método, indicando sus características, ventajas y ejemplos de aplicaciones en aguas residuales de origen alimentario.

2. Revisión

2.1. Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos de toxicidad se utilizan para evaluar diferentes parámetros íntimamente relacionados con la actividad bacteriana presente en los lodos activos. En estos ensayos se emplean organismos modelo, como ciertos microorganismos, peces, plantas y algas, que se exponen al agua residual y se mide su tasa de mortalidad, la inhibición del crecimiento o la luz que genera una bacteria mediante una reacción con el ATP celular, presente en las células viables, y el complejo luciferina-luciferasa. Estos bioensayos se diferencian en el tipo de microorganismo utilizado, como pueden ser algas, larvas de crustáceos y larvas de peces, en la proporción biomasa/sustrato (el sustrato es la materia orgánica presente en los lodos que pueden consumir los microorganismos y transformarla en biomasa, parte sólida de los lodos) y en el tiempo de duración del ensayo. Este último viene en consonancia con el tipo de microorganismo utilizado, ya que si se utiliza un alga tarda entre 72-96 horas y si se realiza un ensayo de letalidad de larvas de peces tardan hasta un máximo de 96 horas, pero dependiendo del nivel de contaminación podría finalizar antes. (Tobajas & Molina, 2017)

En este tipo de ensayos no se necesitan equipos sofisticados, por lo tanto, no se requiere de una gran inversión en equipos y, probablemente, tampoco en mano de obra, lo que implica un bajo gasto económico. Por el contrario, el principal inconveniente sería la gran variedad de pruebas diferentes, donde los efectos de un tóxico dependen en gran medida del organismo modelo seleccionado. Esto requeriría saber en todo momento cual es el contaminante que se busca para emplear un organismo sensible a ese tóxico. Otro inconveniente es que los bioensayos de toxicidad usan una sola especie como organismo modelo, mientras que los fangos activos están constituidos por un variado consorcio de bacterias, hongos y protozoos, lo que provoca que la resistencia a un tóxico de un sistema de fangos activos sea muy superior a la obtenida mediante el bioensayo con un organismo modelo.

Estos ensayos de toxicidad se han ido llevando cada vez más en la dirección de la realización de pruebas rápidas como los biosensores, debido a que los bioensayos

dependen de algunos peces o de plantas y algas. Estos organismos requieren unas condiciones de crecimiento (nutrientes, temperatura, pH...) que son difícilmente reproducibles y, en algunas ocasiones, necesitan largos tiempos de incubación para su crecimiento. A todo esto, se suma el rechazo de la sociedad para comprobar la letalidad que producen las aguas residuales en estas especies. (Farré & Barceló, 2003)

En los laboratorios, se están utilizando principalmente tres tipos de bioensayo de toxicidad: luminiscencia bacteriana, inhibición de la nitrificación e inhibición de la respiración en lodos activos. (Davies & Murdoch, 2001)

2.1.1. Ensayo de luminiscencia bacteriana

En este bioensayo se mezclan distintas concentraciones de aguas residuales con una bacteria marina luminiscente. El ensayo se basa en la disminución de la luminiscencia natural de esa bacteria en presencia de contaminantes. El ATP está presente en todas las células y es indispensable para la actividad celular. El ensayo de detección de ATP está basado en la reacción productora de luz luferina-luciferasa (Figura 2), en la que la producción de luz es proporcional al ATP presente. Este ensayo es el más sensible a Cu, pero poco sensible para Zn, Cd y tolueno, por otro lado, se demostró que el ensayo de inhibición de la nitrificación era más sensible en general a los compuestos tóxicos. (Xiao, et al., 2014)

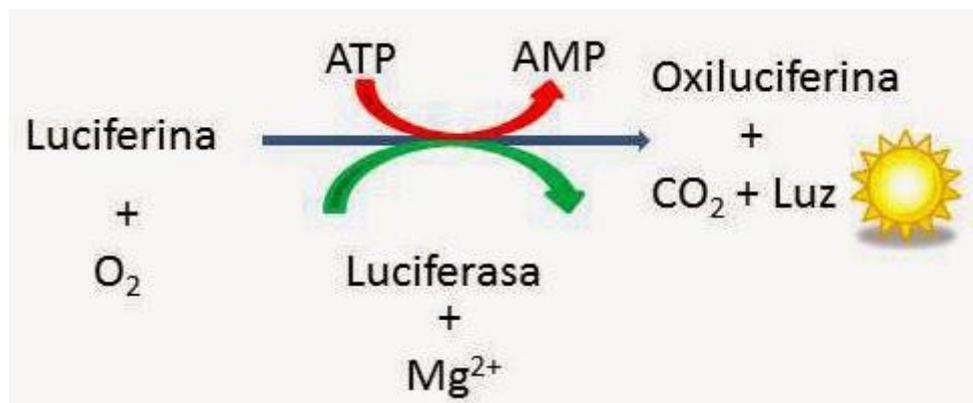


Figura 2. Reacción de la luciferina. (Vrilecologico, 2017)

Las principales ventajas de los tests de bioluminiscencia no varían con respecto a las de los bioensayos de toxicidad: son rápidos, sensibles y reproducibles.

En principio, sería parecido a la medida de la inhibición de la respiración, ya que la luminiscencia es una medida de la velocidad de formación de ATP en las bacterias y esta depende de la respiración bacteriana. (Ejemplos Microtox y Toxalert) (Davies & Murdoch, 2001)

El ensayo Microtox emplea la bacteria *Vibrio fischeri*, para realizar el ensayo de luminiscencia, utilizando el ATP como se mostró en la Figura 2. Es un ensayo sensible a gran variedad de sustancias tóxicas, incluso cuando están en bajas concentraciones. Por tanto, es un buen método que no requiere de personal especializado ni de un importante gasto en instrumental.

En un estudio realizado por Abbas et al. 2018, se encontraron ventajas comentadas anteriormente, además de la versatilidad de su utilización en multitud de matrices diferentes como son aguas residuales, aguas de ríos, lodos activos, lixiviados de vertederos, para detección de compuestos orgánicos, inorgánicos y metales. (Abbas, et al., 2018)

Se pueden utilizar para industrias cerveceras, de bebidas no alcohólicas, almazaras y alimentarias. En la Figura 3, se puede observar una comparación del comportamiento de los tests de bioluminiscencia en industria cervecera, de bebidas no alcohólicas, almazaras e industrias alimentarias, todas ellas situadas en Córdoba, obteniendo unos valores de luminiscencia muy bajos en las almazaras ya que generan muchos residuos contaminantes orgánicos (Perona, et al., 2006):

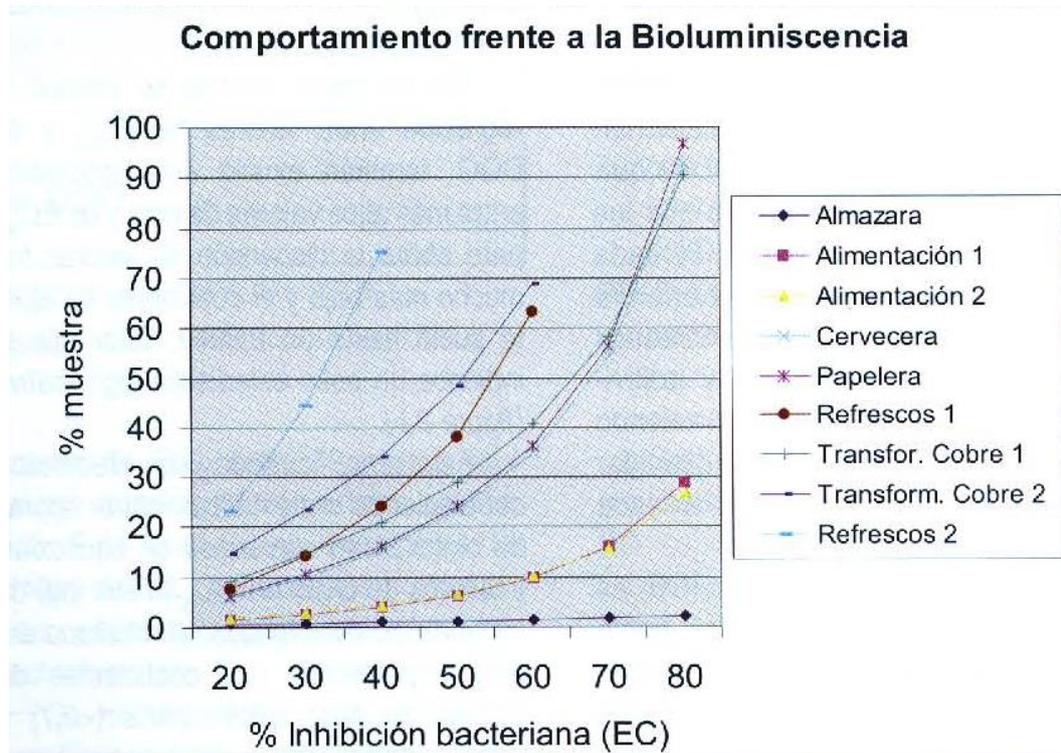


Figura 3. Respuesta luminiscente derivada de los diferentes efluentes industriales alimentarios de la provincia de Córdoba. (Perona, et al., 2006)

2.1.2. Bioensayo de inhibición de la nitrificación

Existe una norma ISO 9505:1989, por la cual está estandarizada la prueba de inhibición de la nitrificación. (ISO 9509:1989)

En el ensayo de inhibición de la nitrificación se emplean dos microorganismos, por un lado, *Nitrosomonas sp.* (oxidante de amonio) y, por otro lado, *Nitrobacter sp.* (oxidante de nitrito), los cuales son incubados en tubos de ensayo junto a las muestras durante 4 horas. El consumo de amonio y de nitrito se determina colorimétricamente.

El ensayo consiste en la conversión de amonio a nitrato a través de nitrito, por los grupos de bacterias nombrados anteriormente, que están presentes en el lodo activo. La inhibición conduce a la acumulación de amonio y nitrito y como consecuencia una falta de nitrato presente en el lodo activo. (Dalzell, et al., 2002)

La inhibición de la nitrificación depende de muchos factores como son el pH, la temperatura, la concentración de sustancias inhibidoras (compuestos orgánicos, metales pesados) y el contenido en oxígeno. (Juliastuti, et al., 2003)

Hockenbury y Grady (1977) enumeraron 20 compuestos que inhiben la nitrificación a concentraciones de 100 mg/L y nombraron 3 sustancias que inhibían la nitrificación a concentraciones bajas, menos de 1 mg/L.

La nitrificación también depende del pH y de la alcalinidad de las aguas residuales. Realizar vertidos de efluentes en condiciones no adecuadas al medio ambiente podría resultar tóxico para las especies que habitan en la zona. (João, et al., 2011)

2.1.3. Bioensayo con peces

Los bioensayos con peces parten de la suposición de que éstos son indicadores particularmente sensibles a la contaminación. Los peces muestran diferentes respuestas de conducta y fisiológicas a las sustancias tóxicas. (Ziglio, et al., 2006) Estos bioensayos se basan principalmente en ensayos de crecimiento larvario y de supervivencia o letalidad.

En los ensayos de letalidad de peces, se expone el pez al agua residual hasta un máximo de 96 horas. Los resultados obtenidos se indican como el porcentaje en volumen que es letal para el 50% de los organismos. Hay dos tipos de tests usados para la toxicidad aguda:

- Estático, se introduce al organismo y el lodo en el mismo tanque y se mantienen allí durante toda la prueba.
- Flujo continuo, el lodo se va reemplazando durante el tiempo que dure el bioensayo.

Escoger un tipo u otro depende del tipo de efluente y de los recursos disponibles. Otro tipo de bioensayos con peces se basan en el crecimiento de las larvas, mediciones de supervivencia de las larvas y medidas de la cantidad de ATP como indicador del estrés energético en tejidos musculares de pescado blanco. (Tothill & Turner, 1996)

Para comprobar la cantidad de ATP que se encuentra en el tejido muscular, se anestesian los peces y se les extrae una pequeña cantidad de tejido muscular blanco, se rompe la integridad de las células musculares mediante inmersión en nitrógeno líquido y

el ATP se extrae finalmente con un disolvente orgánico, dimetilsulfóxido. (Couture, et al., 1989)

Los peces tienen una buena respuesta a la toxicidad del agua, pero es difícil mantener las condiciones ideales de temperatura y oxígeno en el agua. Por otro lado, el material necesario para llevar a cabo estos bioensayos es costoso. Además de los costes, son tests de letalidad de animales; por tanto, existe cierto rechazo hacia estos ensayos, por lo que se están dejando de llevar a cabo, y se están empezando a sustituir por ensayos con cultivos de células de peces. (Babich & E., 1991)

Tabla 1. Bioensayos de vertebrados, indicando especie, parámetro a medir y referencia

Vertebrados		
Especies	Parámetros de medidas	Referencias
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Tasa de crecimiento	ISO10229-1994; (Munkittrick, et al., 1991)
<i>Pez cebra</i>	Crecimiento y supervivencia	(Zhang, et al., 2012)
<i>Pimephales promelas</i>	Mortalidad	(Munkittrick, et al., 1991)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Nivel ATP	(Couture, et al., 1989)

La ventaja de la utilización de peces como bioensayo responde a que los peces son animales acuáticos que son sensibles a la toxicidad y están presentes en todos los medios acuáticos, que es donde finalmente terminarían los efluentes. Por el contrario, se necesitan tiempos muy largos de análisis y no son sensibles a niveles bajos de contaminación, además de necesitar material específico y operarios cualificados. (Ziglio, et al., 2006)

2.1.4. Bioensayo con invertebrados

Se utilizan principalmente invertebrados de la especie Cladocera (*Daphnia* y *Ceriodaphnia*) como organismos modelo. Son unos invertebrados con una alta sensibilidad a las condiciones ambientales y con un ciclo reproductivo corto. Los parámetros medidos son la mortalidad y la reproducción. Estos tests se realizan poniendo los organismos bajo condiciones controladas de temperatura, luz y nutrientes que son

necesarias para el correcto desarrollo de estos organismos y que así sean solo los contaminantes presentes en la muestra lo que afecte a su crecimiento. (Cantú, et al., 2008)

Las pruebas de letalidad aguda con *Daphnia* están estandarizadas y establecidas (ISO 6341:2012). La prueba consiste en exponer el microorganismo a los contaminantes bajo condiciones controladas, para después de un periodo de tiempo, realizar un recuento del número de microorganismos. (Tothill & Turner, 1996)

La mayor ventaja que presentan estos bioensayos, en el caso de la *Daphnia*, es su sensibilidad para los compuestos tóxicos. Como consecuencia, se puede utilizar incluso en los efluentes de las industrias más contaminantes. Otra ventaja es que se pueden realizar test continuos en los que se introducen los microorganismos y se puede ir viendo la evolución de éstos.

En la Tabla 2 se muestran una serie de microorganismos invertebrados que se utilizan para llevar a cabo los ensayos de toxicidad.

Tabla 2. Bioensayo de invertebrados, indicando especie, parámetro a medir y referencia

Invertebrados		
Especies	Parámetros de medidas	Referencias
<i>Daphnia magna</i>	Mortalidad	(ISO 6341:2012)
<i>Vibrio fischeri</i>	Luminiscencia	(Dalzell, et al., 2002)
<i>Heterocypris incongruens</i>	Mortalidad e inhibición del crecimiento	(Oleszczuk, 2008)
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Viabilidad y crecimiento	(Janssen, et al., 1994); (ISO 20666:2008)
<i>Artemia salina</i>	Número de dáfidos	(Ruebhart, et al., 2008)

2.1.5. Bioensayo con plantas y algas

Aunque no son muy utilizados, también se han desarrollado bioensayos de toxicidad basados en plantas como organismo modelo. Los biomarcadores de las plantas

ofrecen ciertas ventajas, como un bajo costo de mantenimiento y una activación rápida de la prueba, con posibilidades para la evaluación de la parte tóxica de residuos sólidos.

Por otro lado, los bioensayos de toxicidad con algas se utilizan con efluentes salinos de la industria o agua de mar. Se cultivan las algas durante 72-96 horas y transcurrido ese tiempo se lleva a cabo un recuento para ver cuantas algas hay y así comprobar la toxicidad. (Farré & Barceló, 2003)

Las algas se utilizan principalmente para la detección de metales en aguas residuales. En cambio, los análisis de plantas son potencialmente sensibles a contaminantes orgánicos. (Tothill & Turner, 1996)

La falta de reproducibilidad en los análisis y la dificultad en el cultivo de las plantas y algas, además del tiempo de análisis requerido que en el caso de las plantas puede llegar a 30 días, son las principales limitaciones de este tipo de bioensayos. En la Tabla 3 se muestran una serie de algas y plantas que se utilizan en los análisis de toxicidad.

Tabla 3. Bioensayos de plantas y algas indicando especie, parámetro a medir y referencia

Plantas y algas		
Especies	Parámetros de medidas	Referencias
<u>Algas</u>		
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inhibición del crecimiento	(Ferrari, et al., 1999)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Inhibición del crecimiento	(Morales-Caselles, et al., 2008)
<i>Skeletonema costatum</i>	Inhibición del crecimiento	ISO 10253:1995
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Inhibición del crecimiento	(Ferrari, et al., 1999)
<u>Plantas</u>		
<i>Brassica campestris</i>	Germinación	(Ferrari, et al., 1999)
<i>Avena sativa</i>	Germinación	(Ferrari, et al., 1999)
<i>Latuca sativa</i>	Longitud de raíz	(Flores & Morales, 2018)
<i>Brassica chinensis</i>	Germinación	(Wong, et al., 2001)

2.2. Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos, que combinan varios elementos. Por un lado, disponen de un sensor biológico (como una enzima, ADN, microorganismo), y, por otro lado, requieren de un transductor, que traduce la señal biológica en una señal medible. Las señales se muestran de forma óptica (fluorescencia) o eléctrica (voltamperometría). (Neethirajan, et al., 2018)

El funcionamiento de estos dispositivos se basa en la interacción entre el analito de interés y el sensor biológico que se encuentra fijo en el biosensor. El resultado de esta interacción es una variación en una o varias propiedades fisicoquímicas que son detectadas por el transductor y convertidas a una señal medible, que posteriormente es la señal que se estudia. El funcionamiento se muestra a continuación, en la Figura 3. Consiste en introducir una pequeña cantidad de muestra en el biosensor o introducir el biosensor donde se encuentra la muestra y comienza el funcionamiento que se observa en la Figura 3.

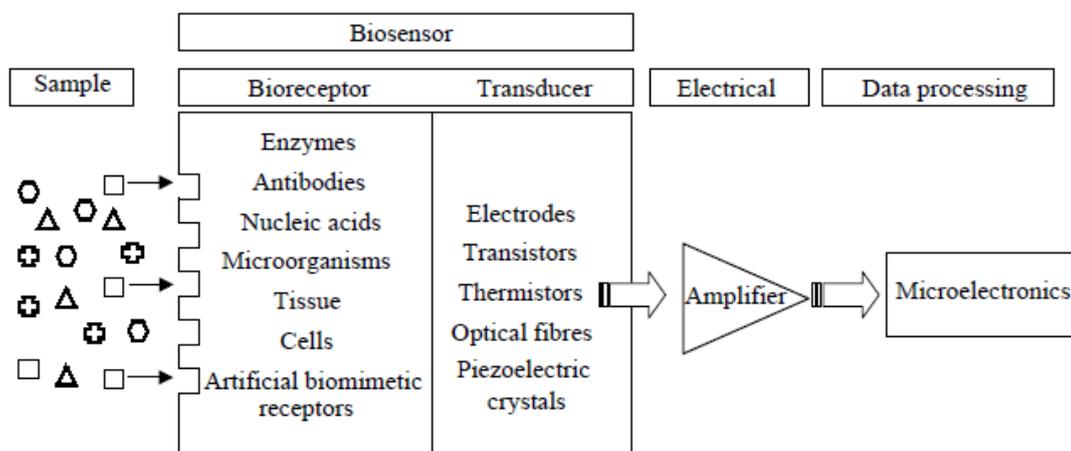


Figura 4. Principio de funcionamiento de un biosensor. (Velasco-Garcia & Mottram, 2003)

Una clasificación general para los biosensores es difícil, ya que podría hacerse en función del elemento biológico que genera la señal, del tipo de analito que se va a detectar, o del lugar o la industria en la que se va a utilizar. En la figura 4 se muestra la clasificación

más generalmente aceptada, en la que se engloba el elemento biológico y el transductor utilizados:

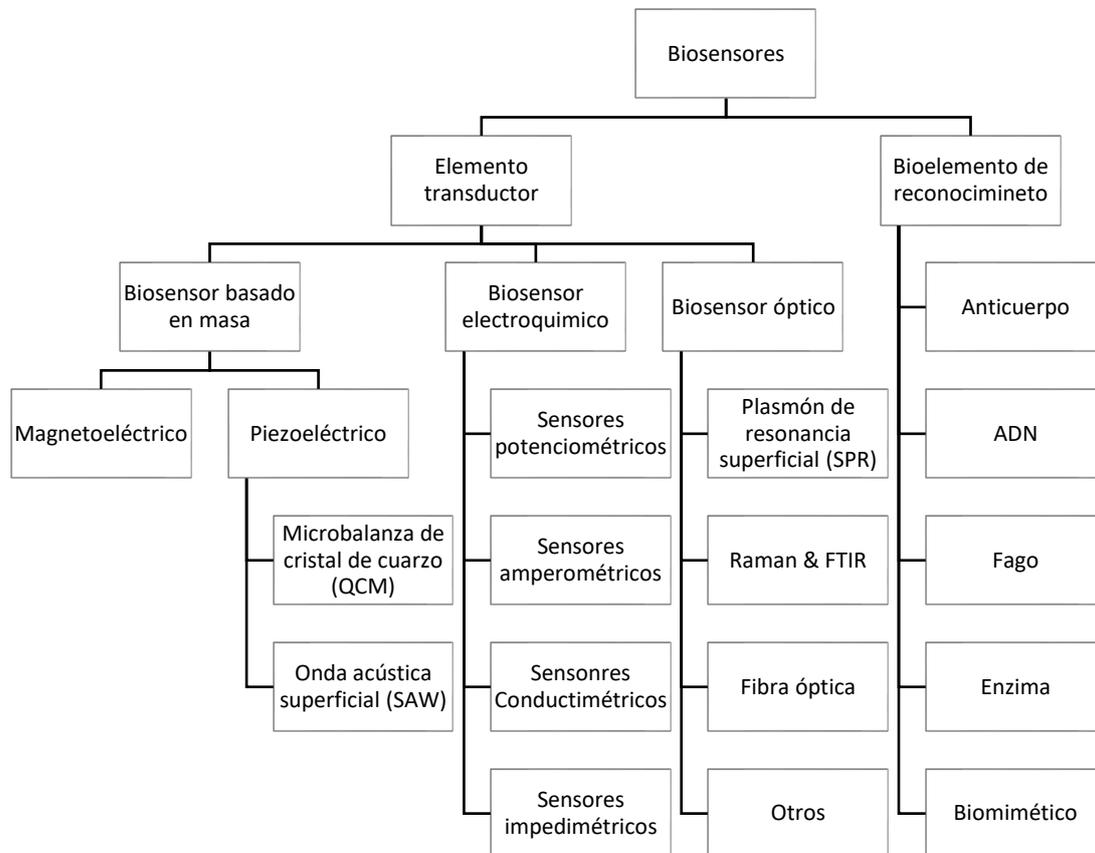


Figura 5. Clasificación de los biosensores (Suresh Neethirajan, 2018)

De todos los elementos biológicos que pueden formar un biosensor, las enzimas son las que más interés están generando, ya que presentan unas características muy ventajosas a la hora de llevar a cabo un análisis. Estas características son la elevada selectividad, respuesta rápida, gran variedad de enzimas disponibles, simplicidad de construcción de los dispositivos y son autorregenerables. (Garcia & Mottram, 2003) Debido a todas estas características, no generarían apenas desechos. Normalmente, las enzimas se utilizan en su forma natural, pero en ocasiones se les hacen modificaciones para mejorar sus propiedades. (Neethirajan, et al., 2018) . A veces se utiliza un mineral arcilloso de capas naturales como soporte donde inmovilizar la enzima. Este soporte es biocompatible y no altera la enzima al ser inmovilizada. (An, et al., 2015)

El interés en la industria alimentaria por los biosensores es enorme, debido a que los métodos convencionales de análisis de alimentos son costosos, se necesita gente cualificada y requieren elevados tiempos para llevarse a cabo. Por el contrario, los biosensores son poco costosos debido a la posibilidad de fabricación en serie, el fácil manejo de estos equipos y la gran capacidad de adaptación de los equipos.

Los biosensores también pueden ser específicos de un determinado contaminante. Esto se conseguiría incorporando al sensor biológico el microorganismo más específico y sensible para cada contaminante. (Farré & Barceló, 2003)

En cambio, los métodos analíticos convencionales proporcionan una medida de la concentración total de sustancias tóxicas, y no una respuesta específica para un solo compuesto. Es por esto que los biosensores no proporcionan una evaluación real del impacto tóxico hacia organismos vivos. (Rodríguez-Mozaz, et al., 2005)

Es indispensable que no existan sustancias que puedan alterar la membrana que contiene el microorganismo. Esto es una desventaja importante a la hora de decidir si utilizar un biosensor o no. Por otro lado, también existen las desventajas de poca reproducibilidad de los análisis y poca sensibilidad para ciertas sustancias. Tienen una ventaja importante que es la capacidad de realizar mediciones in situ en las aguas residuales, ya que no les afecta la turbidez de éstas. (Farré & Barceló, 2003)

2.3. Análisis químicos completos

Se utilizan métodos analíticos como son cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) unidos a espectrometría de masas (MS). Son métodos muy sensibles para la detección de sustancias, tanto volátiles (cromatografía de gases), como polares (cromatografía líquida), llegando a detectar concentraciones de ng/L. La combinación de varios de estos métodos provoca la detección de compuestos orgánicos contaminantes que se encuentran en el agua residual y en los lodos activos.

Debido a la complejidad en la composición de los lodos activos, es imprescindible que se lleven a cabo unas etapas de pretratamiento y tratamiento de las muestras previas al análisis. El proceso de pretratamiento generalmente consiste en separar el lodo del agua

residual. Normalmente primero se elimina el agua y después se lleva a cabo una preconcentración, mediante extracción en fase sólida, para posteriormente poder utilizarla en el análisis químico. (Pozo, et al., 2019)

En el caso de la industria agrícola, tanto de vegetales como de frutas, se utilizan multitud de pesticidas y otras sustancias químicas para obtener productos de calidad, todo ello conlleva que al preparar los alimentos y procesarlos, se necesita lavar esa fruta, esos vegetales y las zonas donde se llevó a cabo su preparación. Como consecuencia, se generan una gran cantidad de residuos contaminantes, con un amplio abanico de sustancias tóxicas, por eso son necesarios métodos analíticos efectivos y que puedan determinar muchas sustancias en un solo análisis. (Łozowicka, et al., 2016)

Dependiendo del tipo de sustancia tóxica que se pretenda determinar se utiliza un método u otro. En el caso de GC-MS se detectan PCBs, PAHs, dioxinas y plaguicidas de polaridad baja. Por el contrario, aquellos plaguicidas de polaridad elevada, micotoxinas, acrilamida y residuos veterinarios se determinan por LC-MS. (González, et al., 2007)

Preparación de la muestra

Estos métodos necesitan una fase de preparación de muestra. Esto es necesario para eliminar los interferentes y preparar la matriz para el análisis.

El primer paso es eliminar el agua de los lodos activos, obteniendo un sólido seco, para seguidamente introducir la matriz en un disolvente adecuado y concentrar la cantidad de contaminantes a través de diferentes métodos. Una extracción eficiente es imprescindible para obtener una buena purificación y un buen aislamiento de los analitos. (Pozo, et al., 2019)

Las técnicas clásicas de extracción, tales como soxhlet o agitación mecánica, siguen siendo utilizadas hoy en día, pero hay otras técnicas preferentes como extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonidos y extracción líquida presurizada. Además, son técnicas en las que se utiliza una menor cantidad de disolvente para portar los contaminantes de los lodos activos; como consecuencia, se están utilizando con más frecuencia.

La extracción asistida por ultrasonidos consiste en introducir una sonda en la muestra que se quiere analizar y aplicarle la energía de ultrasonidos. Introduciendo la sonda en la muestra, se lleva a cabo una aplicación más intensa y localizada de los ultrasonidos. La cavitación acústica genera muchas burbujas lo que conduce a la erosión de los sólidos y a la ruptura de partículas, en caso de ser una muestra líquida, mejora la transferencia de masa. (Ahmad-Qasem, et al., 2013) En cambio, la extracción líquida presurizada consiste en utilizar disolventes a una elevada presión para disminuir el punto de ebullición de los líquidos. De este modo, la solubilidad y la tasa de transferencia de los analitos aumenta, obteniendo tiempos cortos de extracción, así como el empleo de una menor cantidad de disolvente. (Pozo, et al., 2019)

Una forma de extraer las sustancias de interés para realizar su análisis es mediante el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Las palabras que componen su acrónimo son algunas de sus principales características. Es un método de extracción rápida que se utiliza principalmente para determinar pesticidas en alimentos y productos agrícolas. (Robles, et al., 2017); (Łozowicka, et al., 2016) En la figura 5 se muestran los pasos que se llevan a cabo en la extracción QuEChERS, para el tratamiento de muestras. Los pasos serían como se indica en la imagen: el primer paso sería el tamizado, seguidamente se introduce la muestra en un tubo de teflón, se adiciona el reactivo para la extracción y se agita manualmente. Después se añade el reactivo QuEChERS y se vuelve a agitar. Posteriormente se centrifuga y se extrae una alícuota del sobrenadante y al extraer la alícuota se realiza un filtrado de ésta poniendo en la jeringuilla un filtro, para finalmente introducir la muestra en un vial y llevar a cabo la medida.

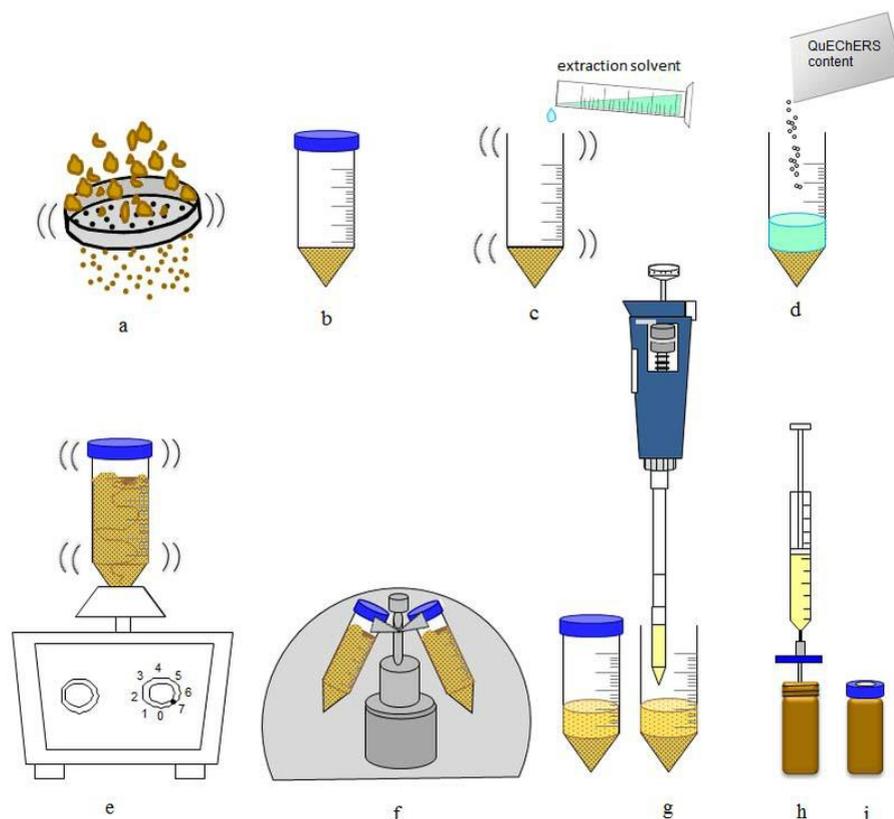


Figura 6. Pasos del método de extracción QuEChERS. a-Tamizado, b-Tubo de teflón con la muestra, c-Adición del disolvente de extracción y mezcla manual, d-Se añade el reactivo QuEChERS, e-Agitar, f-Centrífuga, g-Alícuota del sobrenadante, h-Filtrado de la muestra con jeringuilla, i-Muestra preparada (Paíga, et al., 2015)

El método QuEChERS se basa en la extracción de una sal con un disolvente orgánico, seguido de una extracción en fase sólida dispersiva con la que se pretende limpiar la matriz de posibles interferentes. (Robles, et al., 2017)

Método GC-MS

Esta técnica de análisis es empleada para compuestos volátiles, ya que se introduce la muestra líquida y se volatiliza para detectarla y obtener una señal en forma de pico. En caso de que los compuestos tengan una temperatura de vaporización demasiado elevada, se incorpora una reacción de derivatización. Mediante esta reacción se obtiene un compuesto análogo al analito de interés, pero con una menor temperatura

de vaporización. Todo esto provoca que CG-MS sea una técnica más sensible, selectiva y con mayor resolución de picos (separación entre los analitos) que la LC-MS.

En la Figura 7, se adjunta un esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, en el cual se señalan las partes que lo conforman y por donde circula la muestra vaporizada junto con el gas portador.

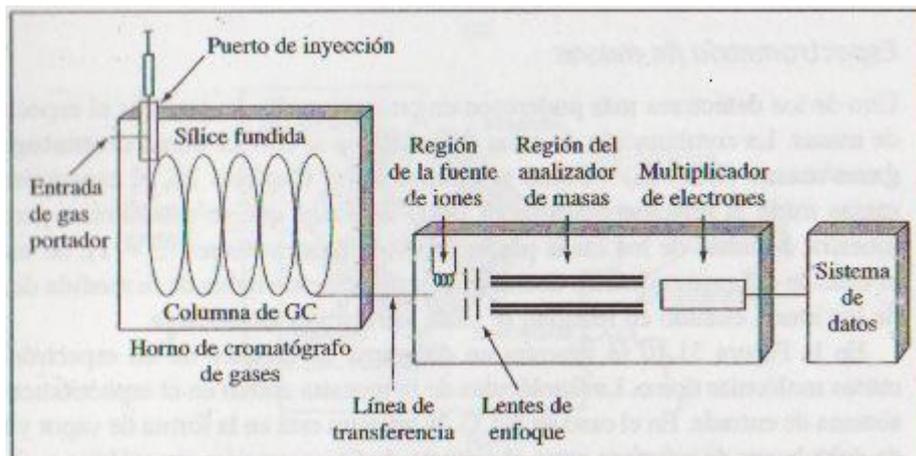


Figura 7. Esquema GC-MS (Skoog, et al., 1997)

El espectrofotómetro de masas proporciona una gran selectividad y sensibilidad de compuestos, dependiendo del tipo de ionización que se utilice. La ionización más utilizada para la determinación de contaminantes en lodos activos es la ionización por electrospray.

Existe un estudio para la detección de compuestos alquilfenólicos en comida para bebés, en concreto purés. (Chia-Tien et al. 2007)

Método LC-MS

La cromatografía líquida acoplada a un detector de masas es especialmente adecuada para analizar contaminantes alimentarios, ya que un sólo análisis proporciona información sobre una mezcla compleja y permite la detección, confirmación y cuantificación de sustancias contaminantes. (Malik, et al., 2010)

En la Figura 8, se muestra un esquema del instrumento de cromatografía líquida acoplada a un detector de masas, en el cual se señalan sus principales partes y cómo circulan la fase móvil, la fase estacionaria y la muestra.

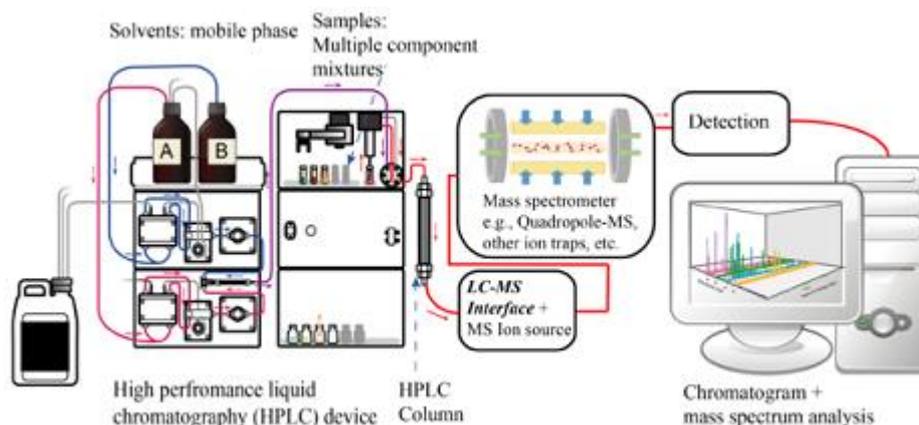


Figura 8. Esquema de LC-MS. (Anon., s.f.)

La combinación cromatografía líquida con detector de masas permite una alta sensibilidad y selectividad de compuestos muy polares, térmicamente inestables y de alto peso molecular.

Esta técnica, que detecta compuestos orgánicos en matrices líquidas, se emplea a menudo en industrias alimentarias relacionadas con la agricultura, para la detección de pesticidas, herbicidas y demás compuestos químicos que no pueden estar presentes en el alimento. Como es una técnica con un límite de detección pequeño, es decir, como detecta concentraciones muy bajas de sustancias contaminantes, garantiza que no exista ese contaminante, tanto presente en el alimento como presente en los efluentes de este tipo de industria.

Para la detección de pesticidas en aguas residuales procedentes de la industria alimentaria, se debe realizar un pretratamiento previo al análisis de la muestra, en estos casos se emplea el método QuEChERS. Se hace un análisis de las aguas residuales y de los lodos activos para detectar concentraciones inferiores a 100 partes por millón de los

pesticidas y así determinar su toxicidad (Laura et al. 2017; Bozena et al. 2016). También se emplea en seguridad alimentaria, ya que es una herramienta que en un solo análisis puede detectar entre 100-150 compuestos diferentes, dependiendo de la velocidad del análisis. (Malik, et al., 2010)

2.4. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis cuantitativo que caracteriza las poblaciones celulares a nivel de una sola célula, a medida que estas células son iluminadas con un láser. La intensidad de las señales ópticas generadas, son señales de dispersión y/o fluorescencia, posteriormente se correlacionan con los parámetros estructurales y/o funcionales de cada célula. (Díaz, et al., 2010)

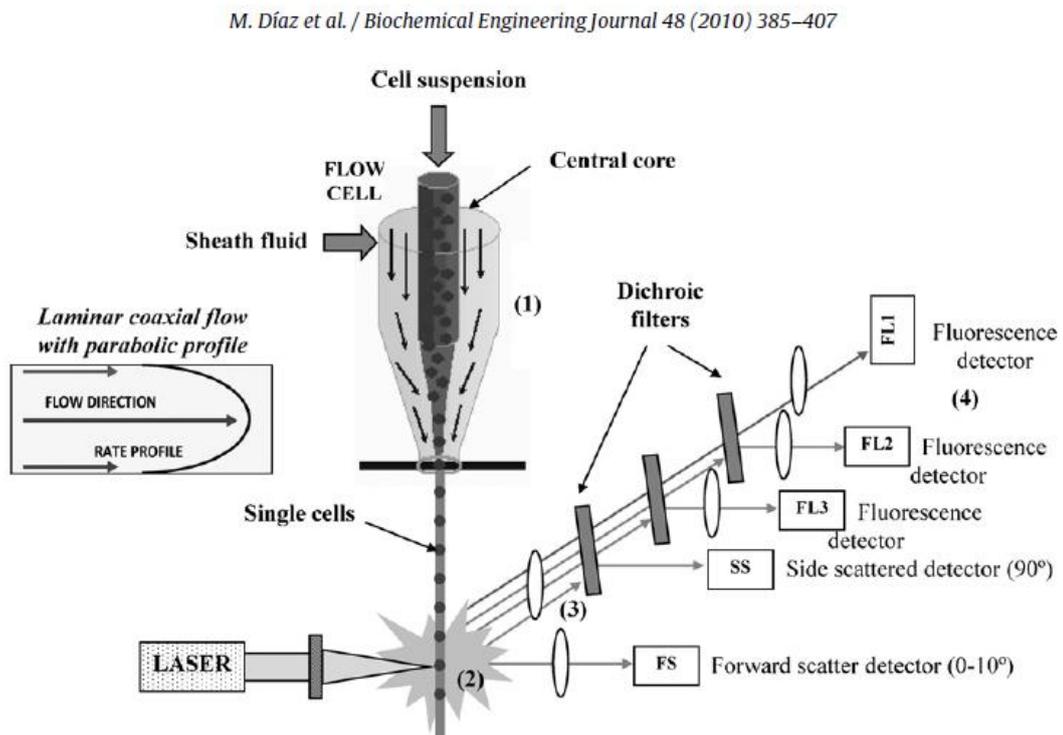


Figura 9. Representación esquemática del funcionamiento de la citometría de flujo (Díaz, et al., 2010)

Por todo lo dicho anteriormente, es un método de análisis microbiológico que se fundamenta en el estado de las células para indicar la toxicidad de la muestra analizada.

Se dice que la citometría de flujo es como un microscopio automático, con las ventajas de sensibilidad, precisión, objetividad y alta tasa de análisis. (Díaz, et al., 2010)

Para obtener estas señales fluorescentes, se utilizan fluorocromos, que son unos compuestos que presentan fluorescencia con la incidencia de un haz de luz o láser y tiñen ciertas estructuras celulares, dependiendo de sus propiedades. Al pasar el haz láser de una determinada longitud de onda, dependiendo del fluorocromo que se haya adherido a cada célula, se obtiene una señal u otra. Por tanto, como se ve en la Figura 9, existen varios detectores para detectar las posibles desviaciones que se producen.

Los fluorocromos más utilizados para llevar a cabo citometría de flujo en lodos activos serían SYBR Green, PI, cFDA, BCECF-AM. Se utilizan para la viabilidad de las células, para marcar aquellas células que tienen actividad celular y para la cuantificación de una población bacteriana que no toda es igual. (Collado, et al., 2017)

Para la detección de la integridad de membrana se utiliza un fluorocromo SYBR Green y yoduro de propidio (PI), el cual se une a las membranas celulares que no están dañadas y al realizar la citometría de flujo correspondiente se podrían ver las células viables y no viables. (Foladori, et al., 2010a), (Ma, et al., 2013), (Andreottola, et al., 2002)

Para la detección de actividad enzimática y células no viables, aquellas que no tienen actividad metabólica, que tienen una membrana plasmática permeable o están en descomposición, se utilizan los tintes cFDA y BCECF-AM. (Ziglio, 2002)

La citometría de flujo tiene una ventaja con respecto a otras técnicas y es la rápida cuantificación de células viables, activas o muertas en suspensión. Se realiza un análisis rápido, se pueden analizar gran cantidad de muestras por día, proporcionando unos resultados relevantes. (Foladori, et al., 2010a)

Cuánto mayor número de tintes se utilicen, más compleja será la señal que hay que interpretar y también habrá más interferencias en la señal obtenida. El fluorocromo

debe ser biológicamente inerte y mostrar altas intensidades de fluorescencia asociadas para que pequeñas concentraciones se puedan detectar dentro de la célula. Además, debe presentar un espectro de emisión estrecho, para evitar la superposición, ser fotoestable, de baja toxicidad y soluble en agua. (Díaz, et al., 2010)

Por otro lado, existe el problema de los flóculos presentes en el lodo activo. En estos flóculos se encuentran las células que se pretenden teñir y, al estar en los flóculos, es complicado. Para conseguir disgregar estos flóculos antes del teñido se realiza un pretratamiento, el cual puede hacerse con agitación mecánica o mediante ultrasonidos. En la agitación mecánica se usa un rotor que “corta” los flóculos del lodo activo, alterando la cantidad de células viables y no viables detectadas mediante citometría. Además, tampoco es posible aplicar una intensidad estandarizada de las fuerzas de corte a todo el lodo activo. En la Figura 10, se puede observar en la imagen A cómo están formados los flóculos con las células de interés en el interior y en la imagen B se puede observar cómo el flóculo ya está disgregado en las células.

Por su parte, los ultrasonidos sí permiten emplear un nivel de energía homogéneo para la gran variedad de flóculos presentes en el lodo activo. (Foladori, et al., 2010a)

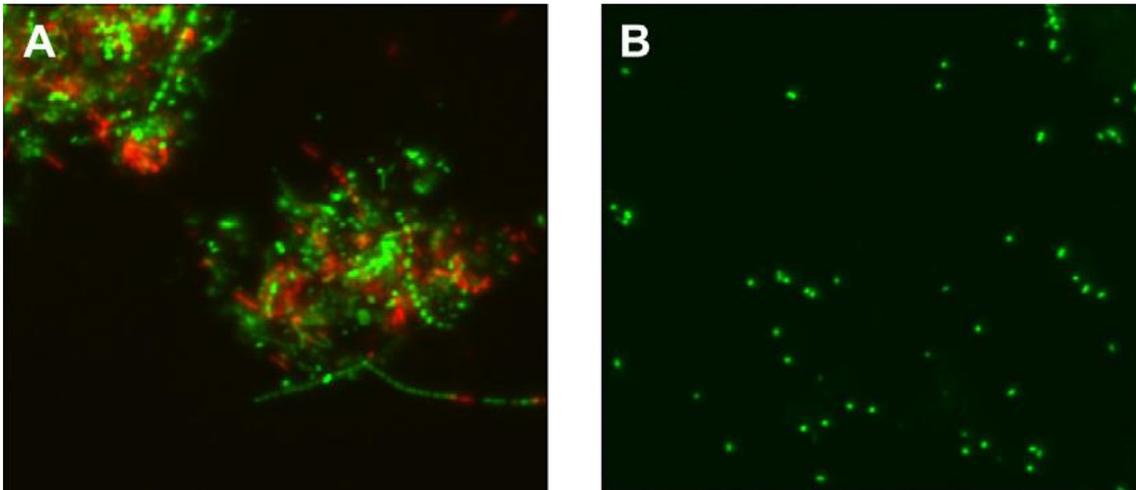


Figura 10. A. Ejemplo de flóculos de lodos activos. B. Ejemplo de una suspensión de bacterias después de llevar a cabo los ultrasonidos para romper los flóculos. (Foladori, et al., 2010a)

En la industria alimentaria se utiliza principalmente para el control de calidad de materias primas. Por ejemplo, para controlar el estado en el que llega la leche a la fábrica, para controlar que la limpieza de los tanques de almacenamiento es la adecuada y no contaminan la leche, para el control de productos finales, para realizar un análisis de las levaduras y asegurarse que hay suficientes microorganismos y que están en las condiciones de viabilidad adecuadas para provocar una correcta fermentación en el pan, el vino y la cerveza y para monitorizar el estado de los productos. También se han encontrado estudios de monitorización de los tratamientos biológicos de las aguas residuales industriales. (Díaz, et al., 2010)

Por otro lado, se han encontrado estudios en lodos activos de plantas de tratamiento de residuos urbanos (Ziglio, 2002), pero no relacionados con lodos activos procedentes de industrias alimentarias. Foladori (2014) propuso utilizar esta técnica como ensayo rápido de toxicidad para evaluar el potencial de inhibición que tendrían los residuos líquidos vertidos por una industria. Esta técnica también se utilizó para la detección de colonias de virus en plantas de tratamiento de residuos urbanos (Brown, et al., 2015), también para la detección de *Escherichia coli*. (Lee, et al., 2016)

Actualmente se está empezando a mejorar la técnica con nueva instrumentación y hay algún estudio del uso de la citometría de flujo en combinación con un compuesto fluorocromo para la caracterización del estado fisiológico en el que se encuentran las células del lodo activo y así poder saber la toxicidad que este presenta. (Yoshida & Hiraishi, 2004)

Tabla 4. Aplicaciones de la citometría de flujo en la industria alimentaria y aguas residuales urbanas

Aplicación	Referencia
Materia prima en la industria	(Tomáska, et al., 2006)
Alimento como producto final	(Laplace-Builhé, et al., 1993)
Tanques de almacenado de alimentos	(Holm, et al., 2004)
Caracterización del estado fisiológico de las células en lodos activos	(Yoshida & Hiraishi, 2004)
Aguas residuales urbanas	(Ziglio, 2002)

2.5. Respirometría

La respirometría se fundamenta en el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que se encuentran en el fango activo genuino del reactor biológico procedente de una estación depuradora (Serrano, s.f.)

Este consumo de oxígeno se mide a través de diversos parámetros (Surcis, s.f.):

- Velocidad de consumo de oxígeno (Tasa de respiración, OUR, mg O₂/L.h), es la velocidad a la cual los microorganismos consumen el oxígeno presente en la muestra.
- Velocidad específica de consumo de oxígeno (Tasa de respiración específica, SOUR, mg O₂/g.h), este parámetro está íntimamente relacionado con el OUR, y para obtener este valor, se divide el OUR entre la concentración de sólidos volátiles en la muestra. Es un parámetro importante porque sirve para comparar distintos fangos entre sí, ya que cada lodo tendría una concentración de sólidos volátiles propia.
- Cantidad de oxígeno consumido (OC, mg O₂/L)
- DQO biodegradable (DQOb, mg O₂/L) o DQO soluble rápidamente biodegradable (DQOrb, mg O₂/L), es la medida de la parte biodegradable incluida en la DQO total, y se compone de la DQOrb y DQOIb (lentamente biodegradable).
- Tasa de utilización del sustrato (U, mg DQO/L.h), es el valor que se obtiene del consumo de sustrato que realizan los microorganismos.
- Tasa de utilización del sustrato específica (q, mg DQO/mg VSS.d).

El principal parámetro utilizado en respirometría es la tasa de respiración, es una medida del metabolismo energético de las bacterias, y la mayor parte de esta energía se usa para su biosíntesis y crecimiento. La tasa de respiración es un buen estimador de la salud del lodo activo. Tanto la tasa de respiración como la tasa de crecimiento también están relacionados con la tasa de biodegradación de los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales. (Davies & Murdoch, 2001) Estos tres parámetros se relacionan mediante la ecuación de Monod, con la cantidad de un nutriente limitante para el crecimiento de microorganismos, en este caso el nutriente limitante sería el oxígeno. La

tasa de crecimiento está relacionada con el número de microorganismos presentes en el lodo, si hay más crecimiento, hay más microorganismos y por lo tanto mayor tasa de biodegradación. (Díaz, 2014)

La medición de la respiración celular puede llevarse a cabo de distintas formas: respirometría electrolítica, respirometría manométrica y por la disminución directa de la concentración de oxígeno disuelto. (Kilroy & Gray, 1995)

El funcionamiento del respirómetro, instrumento utilizado en la respirometría, está basado en un método *batch* de circuito cerrado, por medio de medidas en régimen continuo del oxígeno disuelto en el fango activo y la mezcla formada por el fango y la muestra a analizar, en un mismo vaso reactor. Este oxígeno es utilizado en la respiración de los microorganismos del fango activo en su proceso de metabolización de la materia orgánica y su propio consumo.

Se utiliza la frecuencia respiratoria de un cultivo de microorganismos, ya que responde rápidamente a la medida de inhibidores, como son los contaminantes en el agua, y es una respuesta rápida y simple de analizar. Aunque no todos los inhibidores afectan por igual a la respiración celular, una célula todavía puede respirar a pesar de no poder crecer ni dividirse, es decir, es activo, pero no viable. La pérdida de la respiración significaría la muerte celular, sería un parámetro de toxicidad aguda. (Kilroy & Gray, 1995)

En el caso de la inhibición de la respiración, se mide la inhibición del consumo de oxígeno por parte de las bacterias presentes en el lodo activo o en el agua residual, esta variación se mide con un electrodo de oxígeno. Este electrodo detecta los cambios de potencial debidos al consumo de oxígeno y genera unos valores por medio de unos algoritmos y estos serían los resultados que se analizarían. (Tothill & Turner, 1996)

Tzoris et al. (2002) (Tzoris, et al., 2002) comprobaron la efectividad del baroxímetro, un instrumento portátil para comprobar la toxicidad de las aguas. El dispositivo se basa en el monitoreo de la respiración de una bacteria de cultivo mediante mediciones de presión y de inhibición de la respiración. Esta prueba de toxicidad empleada por Tzoris tiene una respuesta de 5 minutos, es un dispositivo portátil y de fácil

uso. El dispositivo tiene un sensor que detecta cambios de presión de oxígeno muy pequeños debidos a la respiración bacteriana, en concreto de *Pseudomona putida*.

Liao et al. (2001) llevaron (Liao, et al., 2001) a cabo la utilización de un biosensor que mide la inhibición de la respiración en bacterias presentes en los lodos activos. Las bacterias están unidas a un electrodo, el cual genera una corriente eléctrica proporcional a las reacciones bioquímicas y electroquímicas que tengan lugar en la superficie de ese electrodo, entre el sensor y el oxígeno presente en la muestra.



Figura 11. Respirómetro BM-EVO (Serrano, s.f.)

El instrumento de medida está conectado a un ordenador con un programa en particular, que nos permite hacer diferentes ensayos, proporcionando la información precisa del lodo activo para obtener una gráfica llamada respirograma, Figura 11. En ese programa se pueden variar diferentes parámetros para establecer unas condiciones al reactivo que se introduce en la celda.

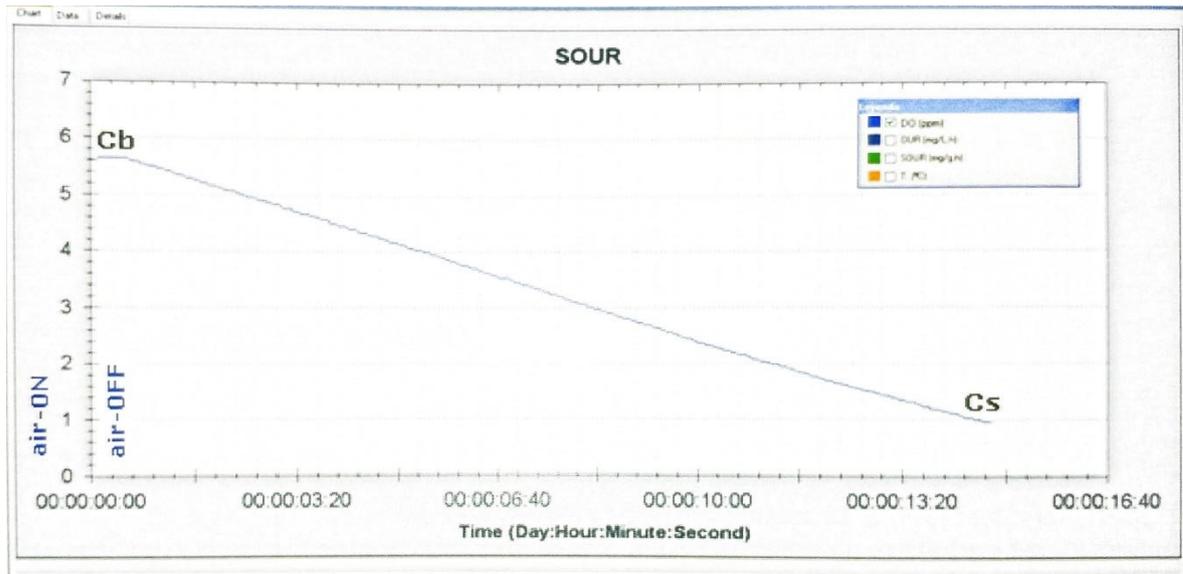


Figura 12. Respirograma, mide la Tasa de respiración específica. Cb: concentración inicial de oxígeno. Cs: concentración final de oxígeno. (Serrano, s.f.)

Por tanto, la respirometría es una técnica muy utilizada para el estudio de la oxidación de compuestos tóxicos mediante microorganismos. Esta técnica ha sido empleada para la determinación de la demanda biológica de oxígeno (Spanjers, et al., 1994) y parámetros cinéticos (Čech, et al., 1984), para estudiar toxicidad y calidad de las aguas residuales (Rui & Quinta-Ferreira, 2011). Además, la velocidad de respiración (OUR) de los microorganismos es una variable importante, debido a que el consumo de oxígeno está directamente relacionado con el crecimiento de biomasa y la asimilación del sustrato. (Lobo, et al., 2012)

Es un ensayo económico, simple y capaz de evaluar rápidamente el posible efecto perjudicial de los compuestos presentes en una corriente de agua residual que se alimenta a un reactor biológico.

2.6. Otros

Se está empezando a estudiar, al igual que en muchas ramas de la ciencia, el empleo de compuestos nanométricos de carbono, en este caso, en forma de *quantum dots*.

Los *quantums dots* de carbono son nanopartículas de carbono, de un tamaño en torno a 3 nm. Son nanomateriales que presentan un confinamiento cuántico en sus tres

dimensiones del espacio, debido a que los electrones se mueven en regiones muy pequeñas. Como consecuencia del movimiento de los electrones al ser excitados por una fuente de excitación, producen fluorescencia, y presentan propiedades fotoluminiscentes y optoelectrónicas (punto de unión entre los sistemas ópticos y sistemas electrónicos) ajustables.

Como se puede observar en diferentes estudios, estos *quantums dots* tienen unas propiedades muy interesantes en el tratamiento de aguas residuales y posterior eliminación de contaminantes. Estas propiedades son:

- Gran estabilidad
- Gran biocompatibilidad (Lim, et al., 2018)
- Baja toxicidad
- Bajo coste de fabricación
- Alta capacidad de dispersión en el agua
- Excelente fotoestabilidad (Das, et al., 2018)

También tienen gran especificidad de usos para diferentes contaminantes; esto es producto de la posibilidad de funcionalizar la superficie de estos *quantums dots*, es decir, adaptar las superficies de los *quantums dots* para tener mayor afinidad por los compuestos contaminantes que se quieren detectar, y así poder degradar cada contaminante de manera individual. (Rani, et al., 2020)

En los lodos activos, hay multitud de sustancias contaminantes, tales como cationes, aniones, biomoléculas o compuestos orgánicos como son los pesticidas y herbicidas. El fundamento del mecanismo para el uso como sensores consiste en el apagado inducido por el analito, es decir, *el quantum dot* emite luz y cuando se une a la sustancia contaminante se apaga, o viceversa: *el quantum dot* está apagado y cuando se une al contaminante emite luz.

Existe el problema de la contaminación en agua por metales, y se está observando que los *quantums dots* son un sensor muy interesante para la detección de metales como Hg, Cd, Pb, Co, Fe, Zn, Ni, en agua, así como algunos aniones derivados de metales tóxicos (AsO_4^{3-} , AsO_3^{3-} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, SeO_3^{2-} , etc.). (Anon., 2019)

Utilizando la propiedad fluorescente de los *quantums dots*, combinado con microscopia de fluorescencia, se pueden emplear para la detección de bacterias en aguas residuales. De tal forma que los *quantums dots* se enlazan a las proteínas de las membranas de las bacterias y después de 30 minutos de cultivo a 40°C, se observarían al microscopio las bacterias con fluorescencia. (Mandal & Parvin, 2011)

Hay artículos en los cuales se habla de la posibilidad de fabricación de *quantum dots* a partir de desechos de alimentos y su posterior aplicación en la seguridad alimentaria. (Fan, et al., 2020) Los *quantums dots* pueden fabricarse con diversas materias primas entre las que se encuentran ácido cítrico, leche desnaturalizada, desechos de comida, ácido ascórbico. La utilización de estas materias primas para la fabricación de *quantum dots* ayuda a disminuir el nivel de desechos que se producen en las industrias alimentarias. La materia prima más utilizada hasta el momento ha sido el ácido cítrico debido a su composición de grupos carbonilo, carboxilo e hidroxilo.

3. Discusión

En la siguiente tabla se comentarán de forma esquemática ventajas e inconvenientes de cada método de análisis.

Tabla 5. Tabla comparativa de todos los métodos

Método de análisis	Ventajas	Desventajas
<u>Bioensayos</u>		
Luminiscencia	Rápido Sensible Reproducible	Bacteria marina
Inhibición de la nitrificación	Muchos compuestos inhiben la nitrificación	Tiempos elevados Muchos factores que interfieren
Peces	Acumulación de contaminantes en el pez Buena respuesta a la toxicidad	Elevados tiempos de análisis No detectan niveles bajos de contaminantes Dificultad para mantener condiciones de T y O ₂
Invertebrados	Índice de toxicidad Monitorización	Dificultad para mantener condiciones adecuadas
Plantas y algas	Muy sensibles Bajo coste	Falta de reproducibilidad Dificultad en el cultivo
<u>Biosensores</u>	Rápido Fácil uso Altamente específicos Sin pretratamiento, mediciones <i>in situ</i>	Reutilización Estabilidad Fabricación en masa Inmovilización de biomoléculas
<u>Análisis químico</u>		
GC-MS	Muestras volátiles Muchas sustancias en un único análisis Límites de detección bajos	Coste del equipo Personal cualificado Pretratamiento de la muestra Derivatización de algunos compuestos
LC-MS	Muestras polares Muchas sustancias en un único análisis Límites de detección muy bajos	Coste del equipo Personal cualificado Pretratamiento de la muestra
<u>Citometría de flujo</u>	Rápido Monitorización del estado del lodo	Dificultad para teñir células Muchos fluorocromos complican la señal
<u>Respirometría</u>	Rápido Sin pretratamiento	Eliminación de sólidos en suspensión
<u>Quantum dots</u>	Posibilidad de monitorizar Rápido	Falta de investigación

En la tabla anterior se comentan ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de manera esquemática.

A la hora de escoger un método entre los anteriormente nombrados, habría que mirar varios factores. ¿Es necesario saber exactamente qué sustancias tóxicas hay para tratar de eliminarlas? Si la respuesta es sí, se escogería un método de análisis químico. Si la respuesta es no y simplemente se necesita saber la toxicidad, se utilizaría un método rápido y portátil, ya que, si es portátil, probablemente tiene un funcionamiento más sencillo, además de ser más barato.

Una vez decidido que solo queremos saber la toxicidad, necesitamos saber qué productos elabora la industria en cuestión, para tener una noción de los contaminantes que puedan tener sus efluentes, porque unos van a ser más biodegradables que otros, unos pueden ser de índole orgánica y otros, inorgánica, pero todos ellos afectarían a las células presentes en el lodo activo.

Descartamos los bioensayos de toxicidad de letalidad de peces, ya que levantan recelo por la utilización de animales vivos. Sin embargo, los ensayos de inhibición de la nitrificación presentan unas características más apropiadas y tienen una buena sensibilidad, además de servir para la detección de la toxicidad de multitud de compuestos, ya sean de naturaleza orgánica o metales pesados.

Una opción a tener en cuenta son los biosensores, ya que requieren unos tiempos de análisis pequeños (por ejemplo, el tiempo de detección de los biosensores de inhibición de la respiración estaría alrededor de los 5 minutos), y no se necesitan personas cualificadas, pero generalmente son instrumentos que únicamente tienen esa función y solo detectan un único parámetro. En comparación con los biosensores, el análisis químico tiene una ventaja muy grande, y es que, en un único análisis se detectan muchos compuestos tóxicos. Por el contrario, son instrumentos de elevado coste, que no son portátiles y se necesita gente cualificada para llevar a cabo los análisis e interpretar los resultados. Además de todo esto, para el análisis químico es necesario una fase previa de pretratamiento y esto conlleva que la toma de medidas para solucionar el problema se dilate en el tiempo.

Con la citometría de flujo estaríamos en la misma situación que con los análisis químicos. Se necesita un instrumento muy costoso, y requiere de personas cualificadas,

no tanto para interpretar los resultados sino para la preparación del equipo y la preparación de la muestra.

En cambio, la respirometría se podría utilizar directamente con los lodos activos. Solamente se necesitaría llevar a cabo una filtración para eliminar posibles interferencias de sólidos. Es una opción interesante y que no requiere de un tiempo excesivo.

Los *quantums dots* son una opción que se está estudiando, ya que los compuestos nanométricos de carbono están creciendo, por su fácil síntesis y sus buenas propiedades. Estos compuestos tienen la capacidad de detectar cualquier sustancia, debido a que se le puede cambiar la superficie de contacto y así adaptar el nanomaterial al compuesto que se quiere detectar. También tienen la posibilidad de monitorizar el lodo activo y esto es algo muy a tener en cuenta, porque en caso de detectar toxicidad se podría actuar mucho más rápido que con la mayoría de los métodos mencionados, pues, exceptuando algunos tipos de biosensores y el bioensayo con invertebrados, el resto no se pueden monitorizar.

Si lo que buscamos como indicador del estado de los lodos activados es el oxígeno, se podrían utilizar biosensores de inhibición de la respiración celular o respirometría, si por el contrario se buscan sustancias de índole orgánica e inorgánica que afecten y alteren las células, sus funciones vitales y su composición, como por ejemplo alterar las membranas plasmáticas de las células, se podrían utilizar bioensayos de toxicidad, biosensores, citometría de flujo o *quantum dots*.

4. Conclusiones

Cada técnica tiene unas características que se ajustan mejor a una sustancia tóxica u otra. Dependiendo del tipo de industria, se generan unos residuos tóxicos y se podría escoger qué método se ajusta mejor a las sustancias que se van a encontrar. Por esto, es difícil decantarse por uno de los métodos. Pero hay que buscar el método que mayor reproducibilidad, mejores límites de detección presente y más variedad de sustancias tóxicas detecte. Como se comentó anteriormente, todos tienen sus ventajas y sus inconvenientes.

Lo más coherente sería que cada industria, dependiendo de las sustancias tóxicas generadas, escogiera el método que mejor se adaptase a sus contaminantes.

Pero en mi opinión, los métodos que menos tardan en realizar un análisis son los más interesantes. Y estos son la respirometría, el bioensayo de luminiscencia, los *quantum dots* y los biosensores.

En cuanto al bioensayo de luminiscencia su rapidez y su versatilidad para multitud de matrices hace que sea una opción muy interesante.

La respirometría, tiene la ventaja de que utiliza el lodo activo directamente sacado del tanque de aireación, sin tratamiento previo y esto favorece la rapidez del análisis, además de dar una idea del estado de salud del lodo.

Con los *quantum dots*, además, se generan menos residuos, porque se pueden utilizar desechos alimentarios de las propias industrias y usarlos en el posterior análisis de lodos activos y aguas residuales.

Los biosensores pueden realizar mediciones *in situ* y obtener los resultados en pocos minutos para determinar los contaminantes que están presentes.

5. Acrónimos

ATP	Adenosín trifosfato
DQO	Demanda química de oxígeno
DQOb	Demanda química de oxígeno biodegradable
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía líquida
MS	Espectrometría de masas
ng/L	nanogramos/litro
Nm	nanómetro
OUR	Oxygen Uptake Rate (Tasa de respiración)
PAHs	hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCBs	policlorobifenilos
Q	Tasa de utilización de sustrato específica
SOUR	Specific Oxygen Uptake Rate (Tasa de respiración específica)
U	Tasa de utilización de sustrato

6. Bibliografía

Abbas, M. y otros, 2018. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, Volumen 626, pp. 1295-1309.

Ahmad-Qasem, M. y otros, 2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volumen 17, pp. 120-129.

Altes, A. S., 20018. *iagua*. [En línea]
Available at: <https://www.iagua.es/blogs/alejandro-santos-altes/reduccion-dqo-dbo-aguas-residuales>
[Último acceso: 20 Mayo 2020].

Andreottola, G., Foladori, P., Gelmini, A. & Ziglio, G., 2002. Biomass active fraction evaluated by a direct method and respirometric techniques. *Water Science & Technology*, 46(1-2), pp. 371-379.

An, N. y otros, 2015. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science*, Volumen 114, pp. 283-296.

Anon., 2015. *iagua*. [En línea]
Available at: <https://www.iagua.es/noticias/espana-mexico-portugal/soluciones-medioambientales-y-aguas/16/02/15/que-es-proceso-lodos>
[Último acceso: 6 Abril 2020].

Anon., 2019. Recent Advances in Carbon Quantum Dot-Based Sensing of Heavy Metals in Water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 114, pp. 171-195.

Anon., s.f. *Manual Respirómetro BM-EVO*. s.l.:Surcis S.L..

Anon., s.f. *sawakinome*. [En línea]
Available at: <https://es.sawakinome.com/articles/science/unassigned-4619.html>
[Último acceso: 13 Junio 2020].

Babich, H. & E., B., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. *Toxicol In Vitro*, 5(1), pp. 91-100.

Brown, M. y otros, 2015. Flow cytometric quantification of viruses in activated sludge. *Water Research*, Volumen 68, pp. 414-422.

Cantú, Romero, P. & Mendoza, A., 2008. *Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México*. Primera ed. México D.F.: SEMARNAT.

Čech, J. S., Chudoba, J. & Grau, P., 1984. Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. *Water Science and Technology*, 17(2-3), pp. 259-272.

Collado, S., Oulengo, P., Alonso, S. & Díaz, M., 2017. *Flow cytometric characterization of bacterial abundance and physiological status in a nitrifying-denitrifying activated sludge system treating landfill leachate*, Oviedo: Springer.

- Couture, P., Blaise, C., Cluis, D. & Bastien, C., 1989. Zirconium Toxicity Assessment Using Bacteria, Algae and Fish Assays. *Water, Air and Soil Pollution*, Volumen 47, pp. 87-100.
- Dalzell, D. y otros, 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, 47(5), pp. 535-545.
- Das, R., Bandyopadhyay, R. & Pramanik, P., 2018. Carbon quantum dots from natural resource: A review. *Materials Today Chemistry*, Volumen 8, pp. 96-109.
- Davies, P. & Murdoch, F., 2001. The increasing importance of assessing toxicity in determining sludge health and management policy. *Measurement and Control*, 35(8), pp. 238-242.
- Davies, P. & Murdoch, F., 2001. The Increasing Importance of Assessing Toxicity in Determining Sludge Health and Management Policy. *Measurement and Control*, 35(8), pp. 238-242.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L. & Quirós, C., 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, Issue 48, pp. 385-407.
- Díaz, M., 2014, Apuntes Equipos y Biorreactores de la industria alimentaria, Universidad de Oviedo.
- Fan, H., Zhang, M., Bhandari, B. & Yange, C., 2020. Food waste as a carbon source in carbon quantum dots technology and their applications in food safety detection. *Trends in Food Science and Technology*, Volumen 95, pp. 86-96.
- Farré, M. & Barceló, D., 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), pp. 299-310.
- Ferrari, B., Radetski, C., Veber, A. & Ferard, J., 1999. Ecotoxicological assessment of solid wastes: A combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6), pp. 1195-1202.
- Flores, B. & Morales, J., 2018. Tratamiento de lodos residuales de una industria cervecera a través de fermentación homoláctica para la producción acelerada de abono orgánico. *Ecología Aplicada*, 17(1), pp. 107-118.
- Foladori, P., Bruni, L., Tamburini, S. & Ziglio, G., 2010a. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Research*, 44(13), pp. 3807-3818.
- Foladori, P. T. S. B. L., 2010b. Bacteria permeabilization and disruption caused by sludge reduction technologies evaluated by flow cytometry. *Water Research*, 44(17), pp. 4888-4899.
- Garcia, M. N. & Mottram, T., 2003. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), pp. 1-12.

- González, R. y otros, 2007. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española de Salud Pública*, 81(5), pp. 461-474.
- Hazen and Sayer, 2011. CAR. [En línea]
Available at: <https://www.car.gov.co/uploads/files/5aec916f61396.pdf>
[Último acceso: 1 Julio 2020].
- Hockenbury, M. & G. C., 1977. Inhibition of Nitrification-Effects of Selected Organic Compounds. *Journal Water Pollution Control Federation*, 49(5), pp. 768-777.
- Holm, C., Mathiasen, T. & Jespersen, L., 2004. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), pp. 935-941.
- ISO 10253:1995: *Water quality — Marine algal growth inhibition test with Skeletonema costatum and Phaeodactylum tricorutum* (1995) ISO.
- ISO 20666:2008: *Water quality — Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h* (2008) ISO.
- ISO 6341:2012: *Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test* (2012) ISO.
- Janssen, C., Persoone, G. & Snellb, T., 1994. Cyst-based toxicity tests. VIII. Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology*, 28(3-4), pp. 243-258.
- João, B., Dezotti, M. & Sant'Anna Jr., G., 2011. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), pp. 242-248.
- Juliastuti, S., Baeyens, J. & Creemers, C., 2003. Inhibition of Nitrification by Heavy Metals and Organic Compounds: The ISO 9509 Test. *Environmental Engineering Science*, 20(2), pp. 79-90.
- Kappe, S., 2015. *industriaquímica*. [En línea]
Available at: <https://www.industriaquimica.es/articulos/20151112/carbono-organico-total-cot#.Xwh7-SgzbIV>
[Último acceso: 15 Mayo 2020].
- Kilroy, A. & Gray, N., 1995. Treatability, Toxicity and Biodegradability Test Methods. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 70(2), pp. 243-275.
- Laplace-Builhé, C. y otros, 1993. Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biology of the Cell*, 78(1-2), pp. 123-128.
- Lee, Y. y otros, 2016. Inactivation efficiency of *Escherichia coli* and autochthonous bacteria during ozonation of municipal wastewater effluents quantified with flow cytometry and adenosine tri-phosphate analyses. *Water Research*, Volumen 101, pp. 617-627.

- Liao, J., Wang, S. & Hsu, D., 2001. Studies on the early detection of wastewater's toxicity using a microbial sensing system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumen 72, pp. 167-173.
- Lim, H., Liu, Y., Kim, H. & Son, D., 2018. Facile synthesis and characterization of carbon quantum dots and photovoltaic applications. *Thin Solid Films*, Volumen 660, pp. 672-677.
- Lobo, C., Nora, B. & Contreras, E. M., 2012. *Biooxidación individual y conjunta de compuestos fenólicos por lodos activados*. Buenos Aires, s.n.
- Łozowicka, B. y otros, 2016. New rapid analysis of two pesticides in food wastewater by QuEChers-Liquid chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Ecological Engineering*, 17(3), pp. 97-105.
- Malik, A., Blasco, C. & Picó, Y., 2010. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), pp. 4018-4040.
- Ma, L. y otros, 2013. Rapid quantification of bacteria and viruses in influent, settled water, activated sludge and effluent from a wastewater treatment plant using flow cytometry. *Water Science & Technology*, 68(8), pp. 1763-1769.
- Mandal, T. & Parvin, N., 2011. Rapid Detection of Bacteria by Carbon Quantum Dots. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(6), pp. 846-848.
- Morales-Caselles, C. y otros, 2008. Assessing sediment quality in Spanish ports using a green alga bioassay. *Ciencias Marinas*, 34(3), pp. 329-337.
- Munkittrick, K. R., Power, E. A. & Sergy, G. A., 1991. The Relative Sensitivity of Microtox®, Daphnid, Rainbow Trout, and Fathead Minnow Acute Lethality Tests. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(1), pp. 32-65.
- Neethirajan, S., Ragavan, V., Weng, X. & Chand, R., 2018. Biosensors for Sustainable Food Engineering: Challenges and Perspectives. *Biosensors*, 8(23), p. 34.
- Oleszczuk, P., 2008. *Heterocypris incongruens* as a tool to estimate sewage sludge toxicity. *Environmental Technology and Chemistry*, 27(4), pp. 864-872.
- Paíga, P. y otros, 2015. QuEChERS: a sample preparation for extraction of carbaryl from rat feces. *Environmental Chemistry and Technology*, 97(6), pp. 687-699.
- Pariante, M., 2017. *aguasresiduales*. [En línea]
Available at: <https://www.aguasresiduales.info/revista/noticias/problematika-de-las-aguas-residuales-de-la-industria-alimentaria-jiISR>
[Último acceso: 12 Mayo 2020].
- Perona, I., Galvín, R., Pérez, I. & de Siles, L., 2006. Aplicación del biotest de la bioluminiscencia a algunos efluentes industriales de la ciudad de Códoba. *Tecno ambiente*, 16(160), pp. 123-127.
- Pozo, L. y otros, 2019. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. *Talanta*, 192(15), pp. 508-533.

Rani, U., Ng, L., Ng, C. & Mahmoudi, E., 2020. A review of carbon quantum dots and their applications in wastewater treatment. *Advances in Colloid and Interface Science*, Volumen 278, pp. 102-124.

Robles, L. y otros, 2017. Determination of pesticides in sewage sludge from an agro-food industry using QuEChERS extraction followed by analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 409(26), pp. 6181-6193.

Rodriguez-Mozaz, S., Alda, M., Marco, M.-P. & Barceló, D., 2005. Biosensors for environmental monitoring: A global perspective. *Talanta*, 65(2), pp. 291-297.

Ruebhart, D., Cock, I. & Shaw, G., 2008. Brine shrimp bioassay: Importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. *Environmental Toxicology*, 23(4), pp. 555-560.

Rui, C. & Quinta-Ferreira, R., 2011. Phenolic wastewaters depuration and biodegradability enhancement by ozone over active catalysts. *Desalination*, 270(1-3), pp. 90-97.

Serrano, E., s.f. *BM-EVO Respirómetro. Manual de funcionamiento*, Barcelona: Surcis, S.L..

Skoog, D., West, D. & Holler, F., 1997. *Fundamentos de Química Analítica*. 4 ed. Barcelona: Reverté.

Spanjers, H., Olsson, G. & Klapwijk, A., 1994. Determining short-term biochemical oxygen demand and respiration rate in an aeration tank by using respirometry and estimation. *Water Research*, 28(7), pp. 1571-1583.

Surcis, S., s.f. *surcis*. [En línea]
Available at: https://www.surcis.com/es/glosario-depuración-aguas-residuales_16600.pdf
[Último acceso: 20 Junio 2020].

Tchobanoglous, G., Burton, F. & Stensel, H., 2002. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4 ed. Asia: McGraw-Hill Education.

Tobajas, M. & Molina, C., 2017. Evaluación de la toxicidad de contaminantes prioritarios y emergentes en aguas. *CIC*, pp. 50-54.

Tomáška, M. y otros, 2006. The application of flow cytometry in determining the bacteriological quality of raw sheep's milk in Slovakia. *Lait*, 86(2), pp. 127-140.

Tothill, I. & Turner, A., 1996. Development in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. *Trends in Analytical Chemistry*, 15(5), pp. 178-188.

Tzoris, A., Fearnside, D., Lovell, M. & Hall, E., 2002. Direct toxicity assessment of wastewater: Baroxymeter, a portable rapid toxicity device and the industry perspective. *Environmental Toxicology Chemistry*, 17(3), pp. 284-290.

- Vrilecologico, 2017. *vril ecológico*. [En línea]
Available at: <https://vrilecologico.wordpress.com/2017/05/20/luciferina-y-luciferasa/>
[Último acceso: 5 Mayo 2020].
- Water quality — Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h* (2008) ISO 20666.
- Wong, J., Li, K., Fang, M. & Su, D., 2001. Toxicity Evaluation of Sewage Sludges in Hong Kong. *Environment International*, 27(5), pp. 373-380.
- Xiao, Y., De Araujo, C., Sze, C. & Stuckey, D., 2014. Toxicity Measurement in Biological Wastewater Treatment Processes: A Review. *Journal of Hazardous Materials*, Volumen 286, pp. 15-29.
- Yoshida, N. & Hiraishi, A., 2004. An Improved Redox Dye-Staining Method Using 5-Cyano-2,3-Diteryl Tetrazolium Chloride for Detection of Metabolically Active Bacteria in Activated Sludge. *Microbes and Environment*, 19(1), pp. 61-70.
- Zhang, W. y otros, 2012. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. *Journal of Environmental Science*, 24(11), pp. 2019-2027.
- Ziglio, G. A. G. B. S. B. G. B. L. F. P. V. R., 2002. Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Research*, 36(2), pp. 460-468.
- Ziglio, G., Siligardi, M. & Flaim, G., 2006. *Biological Monitoring of Rivers: Applications and Perspectives*. 1 ed. London: Wiley.