

VALORACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES MEDIANTE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS Y BIOLÓGICOS

WASTEWATER EVALUATION BY ANALYTICAL AND BIOLOGICAL PROCEDURES

M. Carballo¹, S. Aguayo¹, J. Roset¹, E. de la Peña², E., A. de la Torre¹, M. J. Muñoz¹

¹ Centro de Investigación de Sanidad Animal - INIA. C/ Valdeolmos. 28130 Madrid

² CSIC Centro de Ciencias Medioambientales. C/ Serrano 115 dpdo, 28006 Madrid

RESUMEN: Ciertos procedimientos, basados en aproximaciones analíticas y biológicas, están demostrando ser útiles en la valoración del riesgo de las aguas residuales urbanas procedentes de las Plantas de Tratamiento. Estos efluentes, considerados “mezclas complejas”, compuestos por sustancias de muy diferente naturaleza, origen y características toxicológicas y medio ambientales, requieren una valoración realista. Con el fin de colaborar al conocimiento de una parte de la realidad de nuestro país, presentamos un estudio sobre once depuradoras urbanas en las que se ha realizado un perfil de compuestos orgánicos y una valoración toxicológica mediante tests de toxicidad agudos, crónicos, de estrogenicidad, mutagenicidad y teratogenia. Los resultados muestran que 7 efluentes presentan toxicidad aguda, 3 toxicidad crónica y 4 estrogenicidad. Destacamos el hecho de que los 4 efluentes que presentan estrogenicidad, poseen al menos 3 de las sustancias estrogénicas detectadas mediante el perfil cromatográfico. Este tipo de consideraciones nos hace reflexionar sobre la necesidad de incorporar este tipo de metodologías para disponer de un conocimiento más realista de estas situaciones.

PALABRAS CLAVE: aguas residuales urbanas, mezclas complejas, toxicidad aguda y crónica, estrogenicidad, mutagenicidad, teratogenia, microcontaminantes orgánicos

Metodologías para valorar efectos potenciales de los efluentes de las depuradoras:

El control de los vertidos de las aguas residuales procedentes de Plantas de Tratamiento está regulado por diferentes normativas ¹⁻⁴, con el fin de establecer las características y los límites de vertido a los cauces públicos. El objetivo es establecer un canon de emisión de esos efluentes, para proteger el medio receptor y conseguir una calidad adecuada para su reutilización como agua de riego y recarga de acuíferos, una práctica muy importante en nuestro país. Estos efluentes, al igual que las emisiones industriales, pueden presentar una gran com-

ABSTRACT: Some procedures, based on analytical and biological methods, are useful tools for risk assessment of treatment plant wastewater. In fact, urban effluents, called “complex mixtures” due to their nature, origin and toxicologic and environmental variability, need a more realistic evaluation. In this study, 11 municipal wastewater effluents were studied. Chemical analysis (GC/MS) and biological methods (acute and chronic toxicity bioassays and estrogenicity, mutagenicity and teratogeny tests) were carried out to identify the most frequent organic compounds and toxic effluents. Results showed 7 effluents with acute toxicity, 3 with chronic toxicity and 4, with estrogenic effects. When toxicity and analytical results were compared, it was observed that in effluents with estrogenic effects, at least 3 estrogenic substances were identified. Attending all these results, the inclusion of combined methodologies must be considered to get more realistic information about these situations.

KEYWORDS: urban wastewater, complex mixtures, acute and chronic toxicity, estrogenicity, mutagenicity, teratogeny, organic micro pollutants.

plejidad debido a la presencia de contaminantes muy diversos, provenientes de multitud de orígenes y actividades. Por ello, constituyen “mezclas complejas” cuya valoración requiere un nivel de profundización que no permiten los parámetros físico-químicos convencionales, que obligan las normativas actuales ⁵⁻⁶. Así mismo, si se pretende realizar una valoración, no resulta práctico identificar, cuantificar e interpretar la presencia de todas las sustancias que puedan estar presentes. Esta es una de las principales razones de que se vengán utilizando desde hace años ciertos sistemas biológicos basados en tests de toxicidad, que expresan, con la ayuda de determinados organismos, los efectos potenciales de las mues-

Correspondencia: E. de la Peña. CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales. C/Serrano 115 dpdo, 28006. Madrid.

tras que se ensayan. Aunque existen actualmente numerosos ensayos ya normalizados, (ISO, ASTM, DIN, CEN, AENOR), lo cierto es que tienen una implantación muy deficitaria en la legislación medioambiental, tanto en nuestro país como en la mayoría de los países de nuestro entorno. Es todavía un hecho que la práctica totalidad de los esfuerzos que se realizan en el control de vertidos se basan en el control físico-químico de compuestos específicos sin que, en la mayoría de los casos, estos tengan algo que ver con la naturaleza y origen del vertido.

Los tests de toxicidad más comunes que se han empleado para valorar la toxicidad de los efluentes de depuradoras utilizan peces y/o invertebrados acuáticos (Tabla 1). Estos ensayos han servido por ejemplo, para

la menor concienciación existente en materia de toxicología ambiental. Básicamente un WET consiste en una caracterización del efluente en función de dos cosas: por un lado, la información disponible sobre su origen, naturaleza, sistema de depuración, etc. y por otro, la valoración de la toxicidad del "efluente total" que va a ser emitido. Esta valoración se realiza mediante un test de toxicidad agudo que utiliza una especie, sensible y representativa del medio acuático. Actualmente se está empleando además un ensayo crónico rápido que implementa considerablemente la información toxicológica del efluente. Una excelente revisión de los WET ha sido realizada por Oris y Klaine ²⁰.

Si el resultado toxicológico que resulta del WET es positivo, se recurre posteriormente a otros procedimientos

Tabla 1: Ensayos de aparición más frecuente en la normativa y procedimientos de control de vertidos de aguas residuales urbanas en las CC. AA. de nuestro país:

Expresión de efectos	Nombre del Ensayo	Duración del ensayo	N.º Referencia
Agudos	Bioluminiscencia (<i>Vibrio fischeri</i>)	horas	7
	Toxicidad aguda <i>Daphnia magna</i>	48 horas	8
	Toxicidad aguda en rotíferos	48 horas	9
	Toxicidad aguda en <i>Tamnocephalus</i>	48 horas	10
	Toxicidad aguda <i>Artemia salina</i>	48 horas	11
	Toxicidad aguda <i>Ceriodaphnia dubia</i>	24 horas	12
	Toxicidad aguda en peces (varias especies)	96 horas	13, 14
Subagudos	Inhibición del crecimiento en <i>Chlorella vulgaris</i>	72 horas	15, 16
Crónicos	Ensayo sobre la reproducción en <i>Daphnia magna</i>	21 días	17
	Ensayo sobre la reproducción en <i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 días	18

detectar la toxicidad de efluentes diversos y para demostrar que la variabilidad de esa toxicidad puede llegar a ser muy grande¹⁹, del orden de 5 órdenes de magnitud. Este tipo de valoración realizada mediante bioensayos es indicativa del potencial de daño que tendría un efluente sobre las poblaciones acuáticas, por lo que constituye un sistema predictivo para valorar el impacto del efluente sobre el medio receptor. Hay que tener en cuenta que, el impacto real debería conocerse mediante estudios "in situ", entre los que destacamos aquellos que utilizan peces en jaulas ubicadas en el punto de emisión, los estudios de biomasa y biodiversidad de macroinvertebrados béticos o, los que miden biomarcadores que expresan exposición y/o efecto en los individuos y las poblaciones que viven en las aguas receptoras.

Progresivamente en la valoración de los efluentes, hemos asistido al desarrollo de ciertos procedimientos analíticos en los que se han ido integrando algunas metodologías biológicas. Estos procedimientos han demostrado ser tremendamente útiles para conocer los efectos potenciales de los efluentes. Países como EEUU, han sido pioneros en la investigación y posterior aplicación de un sistema de control y autorización de vertidos, en los que se incorporan criterios físico-químicos y biológicos (WET o Whole Effluent Toxicity). Este enfoque, en mayor o menor medida, es la base de los que en la actualidad se están planteando por parte de muchos países de la Unión Europea. Sin embargo, en la UE el desarrollo es muy lento, dada la larga duración de los programas de investigación y de demostración previos (véase el caso del Reino Unido y Holanda), y

(TIE ²¹), que valoran más profundamente estas situaciones. Estos procedimientos se emplean cuando interesa identificar los agentes más problemáticos o para intervenir en programas de reducción de la contaminación. Básicamente, consisten en la utilización de sistemas mixtos, analíticos y biológicos y se basan en la concentración y fraccionamiento del efluente, permitiendo obtener a partir de un efluente entero, diferentes fracciones de él. Cada fracción puede ser valorada mediante tests de toxicidad y también analizada más exhaustivamente para identificar grupos de compuestos, sobre los cuales se realizará un análisis más exhaustivo permitiendo identificar las sustancias responsables de los efectos de toxicidad observados.

Según los bioensayos o test de toxicidad que apliquemos, podremos obtener diferente información sobre: niveles de organización biológica (individual, poblacional y ecológica); tiempo de manifestación del efecto (agudo, subagudo y crónico); tipo de expresión del efecto (supervivencia individual o crecimiento, reproducción y supervivencia de la población); efectos específicos (mutagénicos, genotóxicos, teratogénicos, de disrupción endocrina), etc. Entre todos ellos, los ensayos específicos han sido los más recientemente desarrollados. Nos referiremos a dos de ellos.

La sospecha de que en la composición de estos efluentes existan determinadas sustancias con capacidad mutagénica, ha dado lugar a la adaptación de metodologías existentes para la valoración de ese efecto. Este

es el caso del ensayo con *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, utilizado en los procedimientos para la clasificación de sustancias puras e incorporado en las Directivas de Fitosanitarios y Biocidas para la determinación de la capacidad mutagénica. Actualmente se está incorporando en la valoración de muestras ambientales entre las que se incluyen los efluentes de depuradoras ²²⁻²³.

Por otro lado, en los últimos años, se empiezan a evidenciar ciertos efectos, denominados estrogénicos, asociados a una serie de compuestos ²⁴⁻²⁹ en efluentes de depuradora. Se observó que estos efectos estrogénicos eran capaces de alterar el equilibrio hormonal (Disruptores Endocrinos) de los organismos expuestos en las áreas de influencia de estos efluentes. Estos hechos constituyeron el principal motivo que indujo a muchos países a estudiar y caracterizar estos efluentes. Así mismo, para la valoración de ese potencial estrogénico se han ido desarrollando y posteriormente aplicando ensayos "in vitro", a modo de detectores biológicos de actividad estrogénica. Los ensayos más utilizados en estos efluentes se centran en el ensayo con levadura recombinante ^{24,30} el ensayo E-screen, que utiliza un receptor estrogénico humano de células de cáncer de mama MCF-7 ²⁵, el ER competitive ligand binding assay ³¹ y el ER-CALUX o ensayo de activación de la luciferasa ³². Murk y colaboradores ³³ realizan una magnífica revisión sobre la sensibilidad y aplicabilidad de estos ensayos así como los inconvenientes que puedan presentar.

Con respecto a la caracterización química de estos efluentes, recientemente se han investigado y desarrollado métodos de análisis eficaces que ayudan y facilitan la cuantificación de muchos de estos compuestos³⁴.

En nuestro país, a diferencia de otros de nuestro entorno, la información disponible sobre los efluentes de depuradora en cuanto a sus posibles efectos estrogénicos es muy escasa y la existente, proviene del ámbito investigador. Por esta razón, los avances así realizados son puntuales ³⁵⁻³⁸, y aunque si bien suponen un avance en el conocimiento sobre estos compuestos y sus efectos, no se han hecho con el objetivo de aportar información de la realidad que rodea a los efluentes de depuradoras en nuestro país.

Valoración de 11 efluentes de depuradoras

Con el fin de contribuir al conocimiento sobre esta realidad, hemos querido aportar parte de la información generada por dos proyectos de investigación que venimos realizando, sobre diferentes depuradoras convencionales de fangos activados.

Las depuradoras motivo de estudio tratan las aguas residuales de núcleos de población con un número de habitantes equivalentes entre 24.000 y 190.000. Salvo una depuradora que trataba exclusivamente aguas domésticas, en las demás se incluían, como es frecuente, aguas de distinto origen como las aguas residuales de hospitales y pequeñas industrias, algunas de alimentación, farmacéuticas y de cosmética, lavanderías, fábricas de pinturas y talleres mecánicos.

De una forma simplificada diremos que el objetivo de nuestro estudio se centró en la detección de los microcontaminantes orgánicos presentes en los efluentes de estas depuradoras y en predecir los efectos potenciales de estos efluentes. Con ese fin, para realizar la caracterización química de los compuestos orgánicos se realizó un perfil cromatográfico sobre un extracto orgánico de cada efluente. Dicho perfil se realizó mediante cromatografía de gases. Para la predicción de efectos, aplicamos sobre estos mismos extractos, los bioensayos (tests de toxicidad) que se refieren en la Tabla 2.

Resumen de los resultados de la valoración de los extractos metanólicos de las 11 depuradoras.

Con el fin de simplificar la exposición de los datos hemos omitido los factores de concentración de las muestras. Una valoración más exhaustiva requeriría el análisis en profundidad de estos factores y los valores específicos de toxicidad. Sin embargo con el fin de ofrecer una visión general, podemos decir que: Lo primero que llama la atención es que en 7 de las 11 depuradoras se registra toxicidad aguda, lo que significa que el riesgo potencial de estos efluentes sobre el medio receptor, a corto plazo, es elevado. En tres de ellas se detecta toxicidad crónica y cuatro de los efluentes muestran efectos de estrogénicidad. En ninguna de las muestras se detecta mutagenicidad.

Tabla 2: Ensayos utilizados en la valoración de los extractos metanólicos de las once muestras estudiadas

Ensayos	N.º Referencia
Toxicidad aguda	
Toxicidad aguda en <i>Daphnia magna</i>	8
Toxicidad aguda en <i>Chlorella vulgaris</i>	16, 39
Toxicidad crónica	
Test desarrollo embrio-larval y teratogenia con <i>Oryzias latipes</i>	40
Ensayos específicos	
<u>Capacidad estrogénica:</u>	
Ensayo en levadura transfectada	26, 24
<u>Capacidad genotóxica:</u>	
Mutación en <i>Salmonella typhimurium</i> cepas TA98 y TA100 con y sin fracción microsomal S9	23, 41
Test de teratogenia con <i>Oryzias latipes</i>	40, 42

Tabla 3: Resultados de la valoración de los extractos metanólicos de las 11 depuradoras. Los rangos de toxicidad se han establecido en función de la sensibilidad de cada ensayo y los porcentajes de exposición que cada uno permite.

Depuradoras	Toxicidad aguda	Toxicidad crónica	Estrogenicidad	Mutagenicidad	Teratogenia
Testigo					
1				n.d	
2					
3					
4					n.d
5			n.d		
6					n.d
7					
8			n.d		
9					
10			n.d		n.d
11					n.d

n.d = No detectado

Toxicidad y Efectos Específicos:

Nulo	Bajo	Medio	Alto
------	------	-------	------

Los compuestos encontrados en los extractos orgánicos fueron los que se exponen a continuación (Tabla 4). Para facilitar la comprensión y simplificar la información hemos resumido los compuestos cuya frecuencia de aparición es mayor y hemos omitido la cuantificación de ellos. Hemos incorporado datos sobre la Toxicidad, Persistencia, Bioacumulación y, efectos especiales de cada uno de ellos, de acuerdo a las Bases de datos consultadas (Tomes Plus, ChemDat, IUCLID, ECDIN y Ecotox).

Los resultados indican que de los compuestos que aparecen al menos en la tercera parte de los efluentes rastreados, existen 7 de los que no se dispone de información alguna. Así mismo observamos que de los dos compuestos que aparecen en el 100% de los efluentes, uno de ellos, el Octilfenol (que procede de la degradación de surfactantes alquilfenólicos), es un Disruptor Endocrino y figura en la lista de Sustancias Peligrosas Prioritarias en Estudio⁴³, mientras que el otro, el Bisfenol A (que proviene de la fabricación de resinas y pinturas metálicas), aunque se sabe que es un componente habitual de este tipo de efluentes, no está considerado en la reglamentación, posiblemente por su baja persistencia, baja capacidad de bioacumulación y menor efecto de Disrupción Endocrina⁴⁴. De los compuestos que aparecen en el 86% de los efluentes, sólo un compuesto, el Di-etilhexil-ftalato, está considerado actualmente en la reglamentación de la UE⁴³ y de la CAM⁴⁵ y dos compuestos más, el Di-isobutil-ftalato y el Di-etil-ftalato (este último presente en el 57% de las muestras), sólo están contemplados en la CAM. Uno de los hechos destacables es que 6 de los compuestos identificados en el perfil (con una frecuencia de aparición de entre el 57-100% de las muestras), poseen efectos de disrupción endocrina. De entre los 6, dos de ellos, el Bisfenol A y el di-terbutil-fenol no se contemplan en ninguna de las dos legislaciones. Debemos de recordar que solo aquellos compuestos que disponen de suficiente información pueden ser recogidos en la legislación.

Es importante destacar que de las cuatro muestras (con igual factor de concentración) que presentan efectos estrogénicos, en una, se encuentran las 6 sustancias estrogénicas detectadas mediante el perfil y en otra, tres de ellas. Habría que analizar tanto el potencial estrogénico como la cuantificación de cada uno de estos compuestos en cada muestra para valorar adecuadamente estos efectos, pero en principio, ya sabemos que aunque no se detecta toxicidad aguda en esta última, sí que sería importante profundizar en un efluente que muestra esta potencialidad de efectos estrogénicos y que, por tanto, puede producir un riesgo muy importante en el medio acuático. Las otras dos muestras que presentan potencial estrogénico, poseen, además de Bisfenol A y Octilfenol, el Estradiol, que no se recoge en la tabla debido a su porcentaje de aparición menor en este estudio y en una de ellas además de estos tres, contiene otro disruptor endocrino, el di-isobutil-ftalato.

Una interpretación más profunda de este estudio permitirá seguramente acercarnos a la realidad de unos efluentes que van a emitirse al medio acuático.

Todo esto nos permite reflexionar acerca del interés que tiene una correcta caracterización para basar las tareas de control de los efluentes, en una información realista. Aunque como hemos observado, con la información toxicológica disponible no podríamos interpretar el significado de muchas sustancias, y haciendo uso de la reglamentación actual se siguen escapando problemas, lo que está claro es que esa información nos puede facilitar un primer nivel en la predicción del riesgo ambiental. Una valoración más adecuada que cubra esta ausencia de información la podremos conseguir, realizando una correcta valoración de los efectos potenciales a través de metodologías biológicas suficientemente referenciadas y/o estandarizadas. Este tipo de valoraciones serán importantes para diseñar programas de seguimiento basa-

Tabla 4: Listado de los compuestos con mayor frecuencia de aparición registrados en el perfil de GC/MS y la información actual existente sobre ellos

COMPUESTOS	FRECUENCIA DE APARICIÓN	PRESENCIA EN LEGISLACIÓN	PERSISTENCIA	TOXICIDAD	BIOACUMULACIÓN	EFECTOS ESPECIALES
Bisfenol A	100%	NO	No	M	No	DE
Octilfenol	100%	SPPE	No	A	Sí	DE
Dietilhexilftalato	86%	SPP, RTP	Sí	A	Sí	C/DE/M
Disobutilftalato	86%	RTP	No	M	Sí	DE
Dimetilaminobenceno	86%	NO	No	M	No	C
Dietilftalato	57%	RTP	Sí	B	No	DE
Diterbutilfenol	57%	NO	No Información	B-M	No Información	DE
Ac. 9 hexadecanoico metilester	43%	NO	No Información	No Información	No Información	No Información
Ac. hexadecanoico metilester	43%	NO	No Información	No Información	No Información	No Información
Nicotina	43%	NO	Sí	A	No	M/C
7 Metoxi -2,2- dimetil-2H-1 benzotipiram	29%	NO	No Información	No Información	No Información	No Información
3,4,5 trimetoxitolueno (Información disponible sobre el Tolueno)	29%	NO RTP	No	M	No	No Información
Estradion 1,3,5(10)-trien-17-1,3 metoxy	29%	NO	No Información	No Información	No Información	No Información
Butilhidroxianisol	29%	NO	No Información	No Información	Sí	No Información
Butilhidroxitolueno	29%	NO	No	No Información	Sí	No Información
4-(2,2,3,3-tetrametilbutil)-fenol (Información disponible sobre el octilfenol: 4-(1,1,3,3 tetrametilbutil)-fenol)	29%	NO SPPE	No	A	Sí	DE
Tributilfosfato	29%	NO	No	M	No	No Información
2,3-dimetilpiridina	29%	NO	No Información	No Información	No Información	No Información

A: Toxicidad Alta (<1 ppm).

M: Toxicidad Media (1-10 ppm).

B: Toxicidad Baja (10-100 ppm)

DE: Sustancia considerada como Disruptor Endocrino.

C: Sustancia considerada como Carcinogénica

M: Sustancia considerada como Mutagénica.

DE: Sustancia considerada como Disruptor Endocrino.

La presencia de cada compuesto en la Legislación se ha realizado comparando con las Listas siguientes:

SPP: Sustancia Peligrosa Prioritaria por la UE.

SPPE: Sustancia Peligrosa Prioritaria en estudio por la UE. Lista de sustancias publicada en el Anexo X de la Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo publicada en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas ⁴³.RTP: Sustancia considerada como Residuo Tóxico Peligroso por la CA de Madrid ⁴⁵

En gris aparece el compuesto de estructura química similar, del que se ha encontrado información.

dos en la detección realista de los contaminantes presentes peligrosos de cada efluente. Es importante que se utilice esta información para priorizar actuaciones de gestión empleando procedimientos de valoración de riesgo. En caso de no existir información, es fundamental que se utilice el principio de precaución cuando no conocemos o disponemos de suficiente información acerca de determinadas situaciones, compuestos o sus efectos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto SCOO-040 del plan sectorial del INIA y el Proyecto de la CAM 07M/0024/1999.

BIBLIOGRAFÍA

- Ley 46/1999, de 13 de Diciembre, de modificación de la Ley de Aguas de 29/1985, de 2 de agosto. BOE número 298, de 14 de diciembre de 1999
- Real Decreto 1/2001, de 20 de Julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. [en línea] <http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/rdleg1-2001.html> Último acceso el 8/10/2001.
- Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario Oficial n° L 135, de 30 de Mayo.
- Real Decreto Ley 11/1995 de 30 de diciembre de 1995, por el cual se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. BOE núm. 312, de 30 de diciembre.
- Consejo de las Comunidades Europeas (1991). Directiva del Consejo de 21 de Mayo de 1991 concerniente al tratamiento de aguas residuales urbanas (91/271/EEC). Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No.L 135/40-52.
- CCE. Consejo de las Comunidades Europeas (1998). Directiva del Consejo 98/15/EC de 27 de Febrero de 1998 enmendando la Directiva del Consejo 91/271/EEC con respecto a ciertos requerimientos establecidos en el Anexo I. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No L67/29-30.
- ISO 11348 (1-3):1998. Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test).
- ODCE (1984). "Daphnia sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. N° 202."
- American Society for Testing and Materials E1440-91* Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*. Disponible en: <http://www.dtsc.ca.gov/ScienceTechnology/bioassay/E1440-91.html>
- Centeno, M. D. F.; G. Persoone, and M. P Goyvaerts (1994). Cyst-based toxicity tests. IX. The potential of *Thamnocephalus platyrus* as test species in comparison with *treptocephalus proboscideus* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). Env. Tox. and Wat. Qual. (in press) In ACyst-Based Toxicity Tests@ Published by the Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution.
- Persoone G. & Vanhaecke, P. Intercalibration on a short term standard toxicity test with *Artemia nauplii*. Final report. 1981. Contract EEC-ENV-396B(N), 30 p.
- United States Environmental Protection Agency, Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms- 3rd Edition. U.S.EPA, Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA/600/4-85/013. Cincinnati, OH, (1985).
- EPA Test Method: 797.1440. Fish acute toxicity test: static, semi-static and flow through.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Fish, toxicity test on egg and sac-fry stages. Guideline for testing of chemicals. 1996. Organization for Economic Cooperation and Development
- International Organization for Standardization (ISO) (1987) Water Quality-algal growth inhibition test, No. 8692. ISO, Paris.
- OECD (1984). Alga Growth Inhibition test, test Guideline N°201. OECD Guidelines for Testing of chemicals. Paris
- OECD (1998). "Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test."
- EPA (1999). "Daphnid, *Ceriodaphnia dubia*, survival and reproduction test. Method n° 1002.0.
- Bailey, H. C.; Krassoi, R.; Elphick, J. R.; Mulhall, A. M.; Hunt, P.; Tedmanson, L., and Lovell, A. 2000. Whole Effluent toxicity of sewage treatment plants in the Hawkesbury-Nepean Watershed, New South Wales, Australis, to *Ceriodaphnia dubia* and *Selenastrum capricornutum*. Environ Toxicol Chem 2000; 19:72-81.
- Oris, J., and S. Klaine. Whole Effluent Toxicity Testing. Annual Review Issue. In: Environ. Toxicol. Chem. 2000. Vol.19.
- EPA. 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures. EPA/600/6-91/003. Environmental Monitoring Laboratory, Duluth, MN.
- Barrueco, C.; Herrera, A.; de la Peña, E. Mutagenic evaluation of trichlorfon using different assay methods with *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis 1991; 6: 71-76.
- Barrueco, C.; Guadaño, A.; Caballo, C.; Herrera, A.; Valcarce, E., y de la Peña, E. 1999. Evaluación Mutagénica y Genotóxica de los Productos Químicos. En: Evaluación Mutagénica y Genotóxica. E. de la Peña, I. Burguete, A. Guadaño. eds. DGICYT, SEMA, MURCIA '98. Madrid (1999) pp. 271-288.
- Desbrow, C.; Routledge J.; Brighty G.; Sumpter, J. P.; Waldock. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical Fractionation and *in vitro* biological screening. Environ Sci Technol 1998;32:1549-57.
- Korner, W.; Hanf, V.; Schuller, W.; Kempter, C.; Metzger, J.; Hagenmaier, C. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. Sci Total Environ 1999;225: 33-48.
- Routledge, E. J., and Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ Toxicol Chem 1996;15:241-8.
- Routledge, E. J.; Sheahan, D.; Desbrow, C.; Brighty, G. C.; Waldock, M., and Sumpter J.P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. Environ Sci Technol 1998;32:1559-65.
- Servos, M. R.; Bennie, K.; Burnison, J. Sherry, J.; Brown, S. Biological impacts of municipal effluents in Canada: the role of alkylphenolics, natural and synthetic estrogens. 1999. Poster 2j/P041 pp 191.
- Ternes, T. A.; Kreckel, P., and Mueller, J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plant. II Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci Total Environ 1999; 225: 91-99
- Witters, H. E.; Vangenechten, C.; Berckmans, P. Detection of estrogenic activity in Flemish surface waters using an *in vitro* recombinant assay with yeast cells. Wat. Sci Technol 2001;43:117-23
- Schwartz, J. A.; Skafar, D. E. Ligand-mediated modulation of estrogen receptor confirmation by estradiol analogs. Biochemistry 1993. 32:10109-10115.
- Legler, J.; van den Brink, C. E.; Brouwer, A.; Murk, A. J., van der Saag, P. T.; Vethaak, A. D.; van der Burg, B. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. Toxicol Sci 1999- 48:55-66.
- Murk, A. J.; Legler, J.; Marola, M.; Van Lipzig and John, H. N.; Meerman, Belfroid, A. C.; Spenkelink, A.; Van der Burg, B.; Rijs, G. B. J. and Vethaak, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. Environ Toxicol Chem 2002; 21: 16-23.
- Lee, F. P.; Iden, C. R.; Brownawell, B. J. Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Anal Chem 2000;72:4322-30.
- Petrovic, M.; Fernández-Alba, A. R.; Borrull, F.; Marce, R. M.; González E.; Barceló, D. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products and linear

- alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ Toxicol Chem* 2002; 21: 37-46.
36. Olea Serrano, N.; Fernández Cabrera, M. F., y Martín Olmedo, P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I. Estrógenos naturales. *Rev. Salud Ambiental* 2001;1:6-11.
 37. Olea Serrano, N.; Fernández Cabrera, M. F., and Martín Olmedo, P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. II. Estrógenos sintéticos. *Rev. Salud Ambiental* 2001; 1: 64-72.
 38. Lacorte, S.; Céspedes, R.; Viana, P.; Vinhas, T., and Barceló, D. Survey of organic pollutants and endocrine disrupting activity caused by agricultural, industrial and domestic pollution (Portugal, April 1999 - May 2001). In: *Biomarkers of Environmental Contamination*. Pp. 122. Abstracts Book of the Congress: Biomarkers 2001. 24-25 September. University of Porto.
 39. Aguayo, S.; Roset, J.; de la torre, A.; Cuellar, M. L.; Muñoz, M. J. Ensayo de ecotoxicidad miniaturizado en *Chlorella vulgaris* utilizando diferentes parámetros de expresión. 2000. *Revista de Toxicología*, Vol17(1), pp. 41-45.
 40. U.S.EPA: United States Environmental Protection Agency (1991 a). Guidelines for conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). EPA/6003-91/063.
 41. Guadaño, A.; Gutiérrez, C.; De la Peña, E.; Cortes, P., and González-Coloma, A. Insecticidal and Mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. 2000. *J.Nat.Prod.* 63,773-776.
 42. Cuéllar, M.; González, M.; Muñoz, M. J. Toxicidad del metanol en el desarrollo embrionario de *Oryzias latipes*. 1995. *Revista de Toxicología*. Vol. 12. Pp. 109-113.
 43. Decisión N.º 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de noviembre, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 331, de 15 de diciembre.
 44. Tanaka, H.; Yakou, Y.; Takahashi, A.; Higashitani, T.; Komori, K. Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment. *Water Sci Technol* 2001;43(2):125-32
 45. LEY 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento. B.O.C.M. Num.269, de 12 de Noviembre.