

<sup>(135)</sup> Jiménez, L.; Angulo, V.; García, E. y Rodríguez, A. (2004): «Cellulosic pulp from vine tendrils». *Afinidad*, 61, 511, 194-203.

<sup>(136)</sup> Idarraga, G.; Ramos, J.; Zuniga, V.; Sahin, T. y Young, R.A. (1999): «Pulp and paper from blue agave waste from tequila production». *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10, 4450-4455.

<sup>(137)</sup> Kulkarni, H.G.; Sirmokadam, N.N.; Shenvi, A.K.; Hegde, G.M.; Padwalkar, S.N. y Guha, S.R.D. (1994): «Organosolv pulping of Agave sisalana». *IPPTA*, 6, 1, 15-18.

<sup>(138)</sup> Araujo, G.T. y Curvelo, A.A.S. (1997): «Organosolv pulping of Mimosa hostilis Benth. Kinetics of ethanol-water delignification». *9<sup>th</sup> International Symposium on Wood and Pulp Chemistry*, 4, 1-4. Montreal. Canada.

<sup>(139)</sup> Visperas, R.V.; Estreellado, A.R.; Lasmarias, V.B. y Pamplona, B.S. (1984): «A preliminary study on ethanol pulping of abaca fibers». *FPRDI Journal*, 13, 2, 20-24.

<sup>(140)</sup> El-Sakhawy, M.; Fahmy, Y.; Ibrahim, A.A. y Lonngberg, B. (1995): «Organosolv pulping. 2. Ethanol pulping of cotton stalks». *Cellulose Chemistry and Technology*, 29, 3, 315-329.

## Ensayos microbiológicos de detección de la toxicidad. Aplicación a sistemas de depuración de aguas residuales

Laura Isac y Carmen Arnáiz\*

Grupo de Biotecnología Ambiental, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Escuela Universitaria Politécnica, Universidad de Sevilla. Sevilla, España

*Microbiological tests of detection of the toxicity. Application to systems of residual water purification*

*Assaigs microbiològics de detecció de la toxicitat. Aplicació a sistemes de depuració d'aigües residuals*

Recibido: 2 de marzo de 2006; aceptado: 12 de junio de 2006

### RESUMEN

El funcionamiento de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) está influenciado en gran parte por la calidad de la biomasa que se desarrolla en el reactor biológico. Por esta razón, la detección de la inhibición/toxicidad ejercida por un cierto influente sobre el fango activo se convierte en un procedimiento necesario que debería ser evaluado sobre la propia biomasa del sistema. Sin embargo, este planteamiento no es seguido en la mayoría de los ensayos de toxicidad que se realizan, para predecir los efectos de las descargas de aguas residuales portadoras de compuestos xenobióticos, sobre el tratamiento biológico.

En este trabajo se realiza una revisión de los ensayos microbiológicos de toxicidad tradicionales, algunos de ellos de aplicación específica a los fangos activos, así como de las nuevas tendencias en el campo de la técnica y la biotecnología que, en un futuro próximo, desempeñarán un papel decisivo en los estudios medioambientales, en general, y en el sector de las aguas residuales en particular.

**Palabras clave:** Bioluminiscencia. Biosensores. Ensayos microbiológicos de toxicidad. Fangos activos. Inhibición de la nitrificación.

### SUMMARY

The purifying capacity of a municipal sewage treatment plant is directly related with the activity and quality of the biomass into the biological system. Since toxicants in influent wastewater may inhibit the biological activity of the activated sludge and cause treatment plant process upsets, influent wastewater should be monitored for toxicity in order to take protective actions. In the same way, wastewater toxicity to activated sludge should be assessed by means of methods that use representative organisms of the whole system. However, few studies use a consortium of microorganisms isolated from the treatment process or activated sludge itself.

The main purpose of this work is to review conventional and advanced microbial toxicity tests and recent technical developments that, in an early future, will carry out a very important role in the environmental studies.

**Key words:** Activated sludge. Bioluminescence. Biosensors. Microbial toxicity tests. Nitrification inhibition assays.

### RESUM

El funcionament d'una estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) està influenciat en gran part per la qualitat de la biomassa que es desenvolupa en el reactor biològic. Per aquesta raó, la detecció de la inhibició/toxicitat exercida per un determinat influent sobre el fang actiu es converteix en un procediment necessari, que hauria d'ésser avaluat sobre la pròpia biomassa del sistema. Tanmateix, aquest plantejament no es segueix en la majoria dels assaigs de toxicitat que es realitzen per predir els efectes de les descarregues d'aigües residuals portadores de compostos xenobiòtics sobre el tractament biològic.

En aquest treball, es realitza una revisió dels assaigs microbiològics de toxicitat tradicionals, alguns d'ells d'aplicació específica als fangs actius, així com de les noves tendències en el camp de la tècnica i de la biotecnologia, que en un futur proper tindran un paper decisiu en els estudis mediambientals en general, i en el sector de les aigües residuals en particular.

**Mots clau:** Bioluminiscència. Biosensores. Assaigs microbiològics de toxicitat. Fangos actius. Inhibició de la nitrificació.

\* Autor para la correspondencia:  
Carmen Arnáiz  
Teléfono: 95-4552812  
Fax: 95-4282777  
e-mail: mcarnaiz@us.es

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista práctico del explotador de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), la determinación de la actividad biológica debe servir para poder anticiparse a estados de baja eficiencia en la depuración, relacionados con el nivel de viabilidad y estado fisiológico de la biomasa en el reactor, para así adoptar las medidas preventivas adecuadas. Ciertos estados de bajos rendimientos en la depuración se deben a efectos tóxicos o inhibitorios ejercidos por algunos contaminantes que, llegados al sistema, son detectados como bajos niveles de actividad biológica<sup>(1)</sup>.

En relación con esto, es sabido que es preferible y más económico prevenir los efectos de una posible contaminación en un ecosistema, aunque se trate de un ecosistema artificial como el de fangos activos, que su posterior recuperación. Esto implica que, como requisito indispensable, el cultivo microbiológico utilizado para la detección de la toxicidad debe conservar unas características similares a la microfauna contenida en el fango activo. Es más, cualquier método de detección o análisis de esta inhibición/toxicidad que no esté referido al propio fango activo, es de poca utilidad para la protección del tratamiento. De hecho, las bacterias del fango activo (Figura 1), organismos descomponedores primarios y principales constituyentes de este ecosistema frente a otros pobladores como los protozoos<sup>(2,3)</sup>, pueden adaptarse a los tóxicos habituales del sistema, desempeñando su función depuradora sin síntomas de toxicidad<sup>(4,5,6)</sup>. Además, la diversidad de las comunidades bacterianas, ante la presencia de ciertos tóxicos, queda afectada por la diferente capacidad de resistencia a la toxicidad de estos microorganismos<sup>(7)</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los ensayos de medida de la toxicidad se llevan a cabo mediante la adición de tóxicos o mezclas de éstos a un sistema biológico distinto al de la microbiota de fangos activos<sup>(8,9)</sup>. Un ejemplo de esta situación lo constituyen los ensayos de bioluminiscencia, algunos ampliamente comercializados como MICROTOX<sup>®</sup>, TOXALERT<sup>®</sup> y LUMISTOX<sup>®</sup>. El empleo más o menos sistemático de estos ensayos ha puesto de manifiesto que la sensibilidad de algunos microorganismos, en este caso la bacteria marina *Vibrio fischeri*, es mayor que la de la población bacteriana del fango activo, heterogénea y adaptada a las condiciones medioambientales<sup>(6,10,11,12,13,14)</sup>. Esta situación sugiere que aunque, efectivamente, se traten de métodos eficaces que ponen de manifiesto rápidamente la toxicidad de un gran número de muestras y la agresión medioambiental que supondría el vertido de las mismas, este tipo de ensayos no debería ser aplicado de forma exclusiva para determinar el efecto potencial ejercido por un contaminante desconocido sobre el fango activo de una EDAR específica.

También han sido abundantes los estudios de bioluminiscencia realizados con microorganismos manipulados genéticamente que, en algunas ocasiones, han empleado bacterias aisladas del fango activo de plantas de tratamiento de aguas industriales<sup>(11,15,16)</sup>. Otra modificación del ensayo de bioluminiscencia con *V. fischeri* es la adición de una suspensión de fango activo<sup>(17)</sup>. Para paliar los inconvenientes anteriormente citados, el ensayo POLYTOX<sup>®</sup> es un test de inhibición respiratoria que, si bien no es realizado sobre el propio fango activo como en el ensayo de inhibición respiratoria, por ejemplo, emplea bacterias heterótrofas aisladas de dicho sistema<sup>(15)</sup>. Igualmente, ciertos ensayos de inhibición de la nitrificación y de inhibición del crecimiento microbiano, están basados en la respuesta de organismos habituales en la biomasa de un fango activo, mejores representantes del sistema que aquellos otros ajenos al mismo.

## 2. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DE TOXICIDAD

Los ensayos microbiológicos concebidos para la medida de la inhibición química o de la toxicidad letal son relativamente recientes, respecto a aquellos que emplean organismos acuáticos superiores. Numerosos estudios han demostrado que no existe un método sencillo que pueda satisfacer plenamente el intento de proteger un sistema acuático, ya se trate de una depuradora o de un cauce natural. Por lo tanto, una constante debe ser el empleo de forma combinada de más de un test en la evaluación de la toxicidad de un determinado influente o producto químico. Esta cuestión es de especial interés cuando se trata de evaluar la toxicidad de ciertos efluentes sobre aguas superficiales o se quiere conocer la posibilidad de reutilización de un efluente. En estos casos, el control y seguimiento de la calidad del agua deberá emplear organismos de diferentes niveles tróficos mediante baterías de ensayo en las que se combinen distintos métodos biológicos de detección de la toxicidad, como puedan ser: ensayos de letalidad con peces, rotíferos (*Brachionus* spp.) o crustáceos (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Artemia salina*, etc.); tests de inhibición del crecimiento bacteriano (*Pseudomonas putida*) o de algas (*Raphidocelis subcapitata*, anteriormente *Selenastrum capricornutum*); tests de inhibición de actividades enzimáticas (ureasa y acetilcolinesterasa); ensayos de genotoxicidad tales como el test Ames, el «umu-test» o el comercializado MUTATOX<sup>®</sup>; tests de teratogenicidad sobre anfibios (*Xenopus laevis*), etc.<sup>(18,19,20,21,22,23,24,25)</sup>

Son muchos los estudios de toxicidad que emplean especies bacterianas por sus innumerables ventajas (Tabla I) pero, con frecuencia, se percibe la ausencia de ensayos destinados a valorar los efectos tóxicos de las descargas de aguas residuales sobre la propia biomasa de un sistema de fangos activos<sup>(26,27,12)</sup>. En este sentido, las determinaciones de la actividad biológica de tipo bioquímico y cinético así como la cuantificación de ciertos componentes celulares específicos (Tabla I), son métodos que pueden ser adaptados a la evaluación de la toxicidad de un determinado influente con la ventaja de ser empleados sobre la propia suspensión biológica de fango activo. Esta aplicación de las medidas de la actividad biológica y de la biomasa ha sido revisada recientemente<sup>(28)</sup>. En estos estudios, la inhibición inducida por el influente o compuesto químico sometido a estudio se calcula como el porcentaje de reducción de la actividad biológica de la suspensión, tomando como referencia el nivel de actividad de la misma en ausencia de las sustancias estudiadas<sup>(14,29,30,31,32,33,34,35,36)</sup>.

Entre las ventajas de aplicar bioensayos microbiológicos destacan:

- Los microorganismos poseen rutas metabólicas presentes en organismos superiores, por lo que las respuestas tóxicas a muchas sustancias químicas se producen a través de mecanismos similares a los organismos superiores<sup>(27)</sup>.
- La tasa de crecimiento de los microorganismos es elevada y el ciclo de vida corto, lo que hace que los ensayos sean más rápidos.
- Los microorganismos son de fácil manipulación, y su crecimiento y mantenimiento más económicos.
- El gran número de individuos utilizados en cada test ofrece ventajas estadísticas sobre otros ensayos en los que el número de individuos es menor. En los ensayos microbiológicos hay contenida una suspensión biológica con más de un millón de individuos por mililitro.

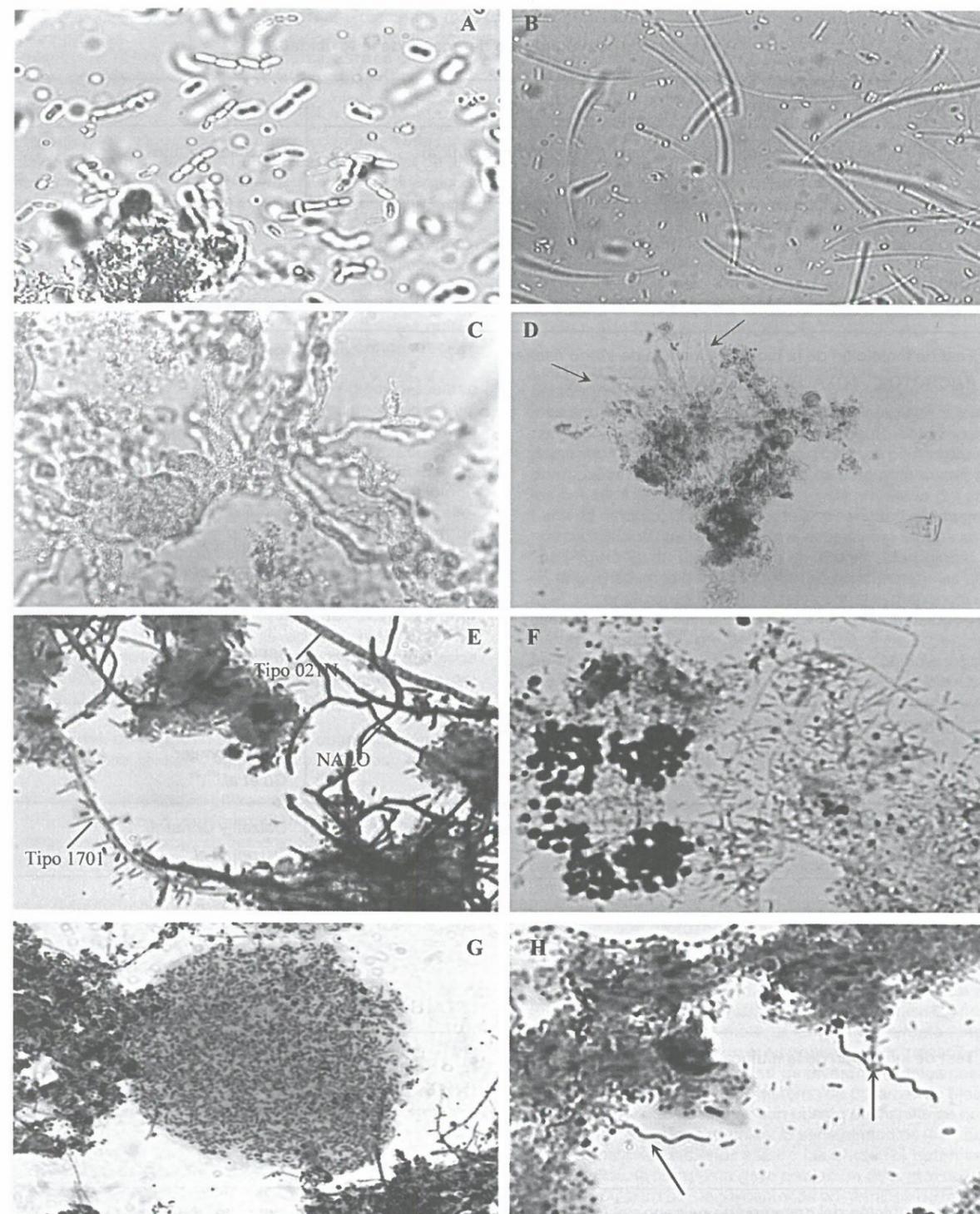


Figura 1. Bacterias en el fango activo. (A) Bacterias de morfología bacilar en disolución *in vivo*. 400X, campo claro. (B) Bacterias filamentosas en disolución del género *Flexibacter in vivo*. 100X, campo claro. (C) *Zoogloea* sp., bacteria implicada en la formación del flóculo de fango activo *in vivo*. 400X, campo claro. (D) Flóculo de fango activo en cuya estructura se distingue a la bacteria *Zoogloea* sp. (→). 100X, campo claro. (E) Bacterias filamentosas formando puentes interfloculares y proyectándose de los flóculos (Tipo 1701, «*Nocardia amarae* like organisms» [NALO] o más recientemente «*Gordonia amarae* like organisms» [GALO] y Tipo 021N). Tinción Gram, 1000X, campo claro. (F) Bacterias floculantes acumuladoras de polifosfato junto a filamentos *Neisser* negativos. Tinción *Neisser*, 1000X, campo claro. (G) Colonia de bacterias nitrificantes en fango activo procedente de un sistema con eliminación de nutrientes. Tinción Gram, 1000X, campo claro. (H) Bacterias helicoidales del grupo de los espirilos y espiroquetas (→). Tinción Gram, 1000X, campo claro.

**TABLA I**  
Ensayos microbiológicos de detección de la toxicidad.

Método/ Parámetro indicador	Autores
Test de inhibición del crecimiento bacteriano ( <i>Pseudomonas putida</i> )	Broecker y Zahn <sup>(4)</sup> Slabbert y Venter <sup>(9)</sup>
Test de genotoxicidad	Slabbert y Venter <sup>(9)</sup> Ono <i>et al.</i> <sup>(20)</sup> Takigami <i>et al.</i> <sup>(21)</sup> Castillo <i>et al.</i> <sup>(24)</sup>
Test de inhibición de la bioluminiscencia de <i>Vibrio fischer</i> (MICROTOX®, TOXALERT® y LUMISTOX®)	Grau y Da-Rin <sup>(1)</sup> Gutiérrez <i>et al.</i> <sup>(12)</sup> Ricco <i>et al.</i> <sup>(14)</sup> Hoffmann y Christofi <sup>(17)</sup> Tisler y Zagorc-Koncan <sup>(22)</sup> Tonkes <i>et al.</i> <sup>(23)</sup> Castillo <i>et al.</i> <sup>(24)</sup> Dalzell <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> Bogaerts <i>et al.</i> <sup>(59)</sup> Chen <i>et al.</i> <sup>(69)</sup> Farré <i>et al.</i> <sup>(70)</sup> Jennings <i>et al.</i> <sup>(71)</sup> Freitas dos Santos <i>et al.</i> <sup>(72)</sup>
Test de inhibición de la bioluminiscencia (microorganismos manipulados genéticamente del fango activo)	Kelly <i>et al.</i> <sup>(11, 16)</sup> Ren y Frymier <sup>(15)</sup> Gu <i>et al.</i> <sup>(74, 75)</sup>
Test de inhibición de la producción de ATP (luminiscencia)	Dalzell y Christofi <sup>(13)</sup> Dalzell <i>et al.</i> <sup>(27)</sup>
Test de inhibición de la actividad enzimática deshidrogenasa	Awong <i>et al.</i> <sup>(29)</sup> Anderson <i>et al.</i> <sup>(30)</sup> Kim <i>et al.</i> <sup>(31)</sup> Isac <sup>(35)</sup> Caravelli <i>et al.</i> <sup>(36)</sup>
Test de inhibición de la nitrificación	Jönsson <i>et al.</i> <sup>(6)</sup> Ren y Frymier <sup>(15)</sup> Andreadakis <i>et al.</i> <sup>(26)</sup> Dalzell <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> Christofi <i>et al.</i> <sup>(41)</sup>
Test de inhibición del consumo de oxígeno del fango activo	Gutiérrez <i>et al.</i> <sup>(12)</sup> Ricco <i>et al.</i> <sup>(14)</sup> Ren y Frymier <sup>(15)</sup> Kelly <i>et al.</i> <sup>(16)</sup> Dalzell <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> Madoni <i>et al.</i> <sup>(32)</sup> Coello <i>et al.</i> <sup>(33)</sup> Isac <sup>(35)</sup> Nirmalakhandan <i>et al.</i> <sup>(38)</sup> Liao <i>et al.</i> <sup>(64)</sup>

- Este tipo de sistemas permite abordar situaciones más complejas que en el caso de ensayos que emplean organismos de niveles tróficos superiores. Este es el caso de la evaluación de los cambios en la diversidad de las poblaciones de un fango activo<sup>(38)</sup>.

Los auténticos influentes industriales contienen una mezcla de productos químicos que pueden interactuar de distinta manera y con distintos efectos entre sí (sinérgicos, antagónicos o aditivos), los cuales han sido estudiados gracias a los ensayos microbiológicos, como en el caso de los metales pesados<sup>(5, 39)</sup>. Y es que, cuanto más complejo es el sistema, también lo es el estudio analítico para la detección y expresión tanto de los efectos tóxicos/inhibitorios sobre los organismos, como los cambios químicos ocurridos en los tóxicos por transformaciones químicas como volatilización, biodegradación, concentración, etc.<sup>(40)</sup>

En cualquier caso, los ensayos microbiológicos presentan los inconvenientes propios de trabajar con un sistema vivo, es decir, los resultados están sujetos a una gran varianza que, en muchas ocasiones, no es controlable. Los sistemas biológicos son conocidos por la falta de unicidad en la respuesta debido a diferencias en los estados fisiológicos de los microorganismos. Una de las formas para minimizar esta desventaja es precisamente la utilización de microorganismos, fundamentalmente bacterias. La búsqueda de biotests rápidos, sencillos y económicos, que permitan de manera simultánea la puesta en marcha de una batería o serie de ensayos en la que unos tests puedan complementar a otros, ha llevado durante los últimos años a un gran desarrollo de los ensayos microbiológicos en sus distintas variantes<sup>(9, 15, 25, 27)</sup>. Dichas variantes, con aplicación al campo de las aguas residuales, incluyen:

- El empleo de métodos directos de cuantificación de la biomasa (por ejemplo, agentes fluorocromos).
- El empleo de métodos indirectos de cuantificación de la biomasa, es decir, determinación de la actividad biológica a través de actividades enzimáticas (ATPasa, deshidrogenasa, fosfatasa, ureasa, esterasa, catalasa, etc.).
- La determinación de la tasa de consumo/producción de un sustrato (tasa de utilización de amonio, AUR; tasa de respiración, OUR; tasa de respiración específica, SOUR; tasa de utilización de nitrato, NUR).
- Estimación de componentes celulares (por ejemplo, ATP).
- Inhibición de la bioluminiscencia
- Medidas *in situ* y aplicaciones de técnicas moleculares (FISH -*fluorescent in situ hybridization*-, microsensores, etc.).
- La medida directa de los efectos tóxicos o inhibitorios sobre las tasas de crecimiento de cultivos puros o mixtos (por ejemplo, *Tetrahymena pyriformis*).

En la mayoría de estos ensayos, se evalúan características bioquímicas, fisiológicas, tasas de crecimiento, etc., de cultivos bacterianos puros o mixtos. En algunas ocasiones, el ensayo de la toxicidad se realiza sobre la propia suspensión de fango activo<sup>(26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 41, 42)</sup>, mientras que en otras, bacterias aisladas del mismo son posteriormente cultivadas como en el caso del ensayo POLYTOX<sup>(15)</sup>.

Aunque las bacterias constituyen aproximadamente el 95% de la materia seca suspendida presente en una muestra de fango activo<sup>(43)</sup>, no son los únicos integrantes del com-

ponente biótico de un sistema de lodos activados. El restante 5% lo forman protozoos, organismos presentes en una proporción media de 50.000 individuos por mililitro, y cuyas implicaciones en el proceso de floculación y de regulación de las poblaciones bacterianas en el reactor son muy importantes<sup>(43)</sup>. Los micrometazoos, aunque muy minoritariamente, son también componentes de la biomasa de estos sistemas de depuración<sup>(44)</sup>. Si bien existen ensayos de toxicidad que emplean micrometazoos, tal es el caso de los rotíferos<sup>(23)</sup>, constituyen una parte minoritaria de este ecosistema y se considera que la principal respuesta a evaluar es la ofrecida por las poblaciones de bacterias heterótrofas y protozoos.

### 3. LOS PROTOZOOS COMO MICROORGANISMOS «TIPO» EN LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Los protozoos son excelentes indicadores de la contaminación y de las condiciones medioambientales en sistemas acuáticos<sup>(43, 45, 46)</sup>. Si en una EDAR son empleados para conocer las condiciones de funcionamiento del proceso depurado<sup>(47)</sup>, experiencias llevadas a cabo en pilotos ponen de manifiesto el interesante papel de esta comunidad en los estudios de toxicidad<sup>(48)</sup>. Independientemente del sistema de estudio, un descenso de la diversidad en los grupos de ciliados que constituyen el ecosistema fangos activos (Figura 2), un desequilibrio en la diversidad global, o un descenso en la densidad total, son circunstancias que indican condiciones limitantes tales como la presencia de sustancias tóxicas en el influente<sup>(48, 49, 50, 51)</sup>, fluctuaciones en la carga orgánica<sup>(52)</sup>, etc.

Además de ser organismos sensibles a las condiciones del medio, reúnen requerimientos muy deseables para ser empleados en bioensayos: son fácilmente cultivables y de sencillo manejo en el laboratorio, presentan un ciclo de vida corto, etc. Además de la gran sensibilidad de estos microorganismos a los tóxicos, el cada vez mayor conocimiento de los mecanismos de resistencia a la toxicidad (síntesis de metalotioneínas, adsorción externa, etc.), proporcionado por los estudios de citotoxicidad de ciertas especies de ciliados frecuentes en fangos activos<sup>(53)</sup>, auguran un buen futuro para estos microorganismos en aplicaciones como los biosensores.

Otros autores presentan trabajos en los que los «organismos-test» son protozoos ciliados de agua dulce, aislados y cultivados en laboratorio, sobre los que se realizan ensayos de toxicidad aguda a distintos metales pesados y de los que se obtienen distintas sensibilidades al metal en función de la especie protista<sup>(54, 55)</sup>. En esta misma línea, aunque tomando como material biológico el propio fango activo de un reactor, y con él su población protozoaria, ha podido estudiarse la toxicidad de diversos metales pesados sobre la biomasa de un sistema de tratamiento biológico<sup>(35, 50, 51)</sup>. Diversos estudios han puesto de manifiesto que, en el caso de algunos metales, la sensibilidad de la población protista era superior a la de las bacterias heterótrofas. En ellos, la respuesta de la población de protozoos se midió y comparó con la de bacterias en términos de la actividad enzimática deshidrogenasa y de la tasa de consumo de oxígeno<sup>(30, 32, 33, 35)</sup>.

El protozoo *Tetrahymena pyriformis* ha sido empleado durante las últimas décadas en estudios de toxicidad y fue el primero en ser cultivado bajo condiciones de laboratorio. Sobre él se han llevado a cabo ensayos de distinta naturaleza: de crecimiento, de viabilidad/mortalidad, contenido en ATP, actividad fosfatasa ácida, actividad esterasa, actividad respiratoria medida con colorantes redox o como medida del consumo de oxígeno, etc.<sup>(9, 15, 56, 57, 58, 59, 60)</sup>

Los bioensayos de inhibición del crecimiento y de mortalidad con estos organismos, basados en la observación microscópica y en la detección de cambios morfológicos,

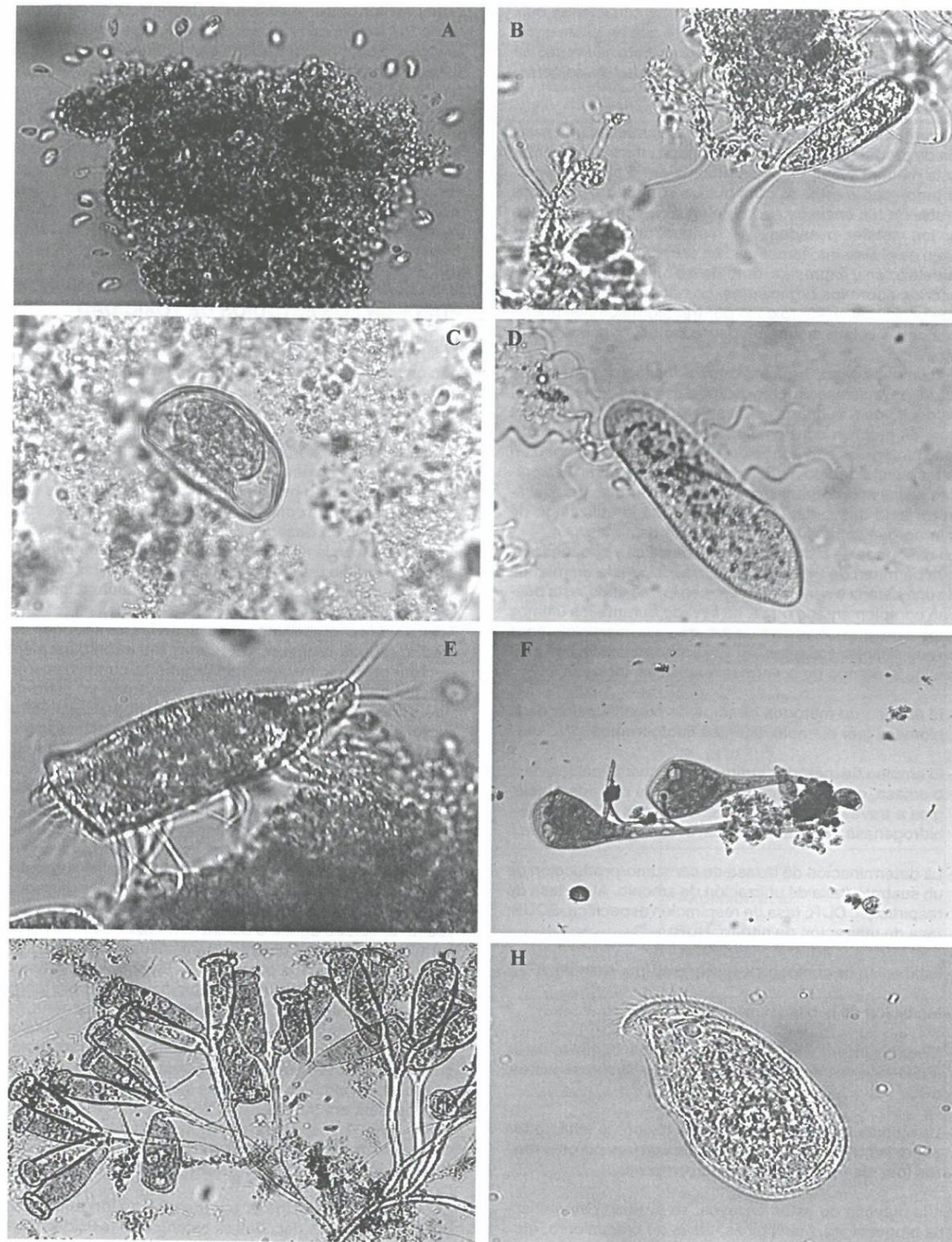


Figura 2. Protistas en el «ecosistema fango activo». (A) Pequeños flagelados en torno a un flóculo de oxidación total (*Bodo saltans*). 400X, campo claro. (B) Flagelado (*Peranema* sp.). 400X, campo claro. (C) Ameba testácea (*Arcella* sp.) de perfil sobre flóculo de fango. 400X, campo claro. (D) Oligohimenóforo peniculino (*Paramecium* sp.). 400X, campo claro. (E) Espirotrico esticotrico (*Euplotes* sp.) de perfil sobre flóculo. 400X, campo claro. (F) Heterotrico (*Stentor* sp.). 400X, campo claro. (G) Oligohimenóforo peritrico (*Epistylis* sp.). 400X, campo claro. (H) Filofaringeo chilodonélido. 400X, campo claro.

presentan importantes limitaciones en el caso de algunos tóxicos<sup>(57, 59)</sup>, ante los que resulta difícil establecer la frontera entre la falta de motilidad y la muerte celular. En situaciones como ésta, la microscopía óptica se muestra insuficiente.

Avances en la microscopía de epifluorescencia y el desarrollo de nuevos fluorocromos permiten realizar dobles marjajes en los que se combina la detección de una determinada actividad enzimática sobre el total de la población de células marcadas<sup>(58, 61)</sup>. Además, el empleo de métodos basados en la fluorescencia permite la adaptación de nuevas técnicas como la citometría de flujo o el análisis digital de imágenes, que permiten procesar las muestras rápidamente y evaluar los efectos de citotoxicidad sobre los protozoos.

#### 4. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DE DETECCIÓN DE LA TOXICIDAD DE APLICACIÓN A SISTEMAS DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

##### 4.1. Inhibición de la nitrificación

Un grupo de enzimas de actividad muy específica es el implicado en los procesos de nitrificación, asociado frecuentemente sólo con los géneros bacterianos *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Sin embargo, estudios filogenéticos han demostrado que son más los grupos de organismos implicados en la oxidación del amonio a nitrito y del nitrito a nitrato, y que su abundancia relativa podría estar relacionada con los niveles de amonio y nitrito presentes en el medio<sup>(62, 63)</sup>.

La gran sensibilidad de este grupo bacteriano ha llevado a contemplar la inhibición de la nitrificación como un parámetro indicativo de la toxicidad global del proceso de fangos activos en una gran variedad de ensayos *batch*<sup>(6, 26, 41)</sup>. En ciertos trabajos<sup>(64, 65)</sup> se encuentra desarrollado un método en el que son empleados cultivos puros de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, en un procedimiento que permite la evaluación independiente de la oxidación del amonio y del nitrito, ante la presencia de una sustancia potencialmente tóxica. En este caso, la inhibición enzimática se cuantifica a través de las tasas de consumo de los sustratos, amonio y nitrito, que son comparadas con las del ensayo control.

Trabajos recientes<sup>(27)</sup>, en los que se combinan distintas medidas de la toxicidad, han ensayado la inhibición de la nitrificación de un fango activo mediante la determinación del amonio acumulado y la reducción de los niveles de nitrato<sup>(66)</sup>. En este trabajo se concluye que este método es apropiado para la detección de toxicidad, pero no para la medida exacta de la inhibición de la nitrificación, para cuyo fin remite a otras publicaciones.

Un estudio comparativo entre los métodos anteriormente expuestos<sup>(64, 66)</sup> mostró que el mayor nivel de correlación es el existente entre el ensayo que emplea a *Nitrosomonas* sp. en cultivo puro y el basado en el empleo de la suspensión de fango activo enriquecida en esta población bacteriana<sup>(6)</sup>. Otros autores<sup>(15)</sup> concluyen que la inhibición de la actividad nitrificante de una suspensión enriquecida en *Nitrosomonas* sp., cuando se combina con otro ensayo de tipo microbiológico que aporta información complementaria (ensayo de bioluminiscencia con *Shk1*, POLYTOX<sup>®</sup>, inhibición respiratoria del fango activo o ensayo de inhibición del crecimiento con *Tetrahymena*), es un ensayo apropiado para la evaluación de la toxicidad sobre un sistema de fangos activos.

La gran sensibilidad de los organismos nitrificantes a los tóxicos es una razón para que estos ensayos microbiológicos hayan sido adaptados al campo de los biosenso-

res<sup>(42, 67)</sup>. En una de sus aplicaciones<sup>(67)</sup>, se presenta un sistema biosensor en el que la inhibición de la oxidación de *Nitrosomonas europaea* es empleada como medida de la inhibición respiratoria. De hecho, una alternativa a los procedimientos anteriormente expuestos es la determinación respirométrica de la inhibición del proceso de nitrificación. Puesto que la nitrificación se realiza por oxidación y consumo de oxígeno, ésta puede medirse separando la respiración o consumo de oxígeno efectuado por la biomasa autótrofa, de la respiración efectuada por la biomasa heterótrofa. En algunos estudios respirométricos<sup>(68)</sup> se han determinado las tasas máximas de crecimiento específico de la biomasa autótrofa, bajo condiciones inhibitorias inducidas por tóxicos (metales pesados y compuestos orgánicos), así como bajo condiciones de «normalidad». La ventaja, nuevamente, es que la toxicidad es evaluada sobre la propia biomasa del reactor.

##### 4.2. Ensayos de bioluminiscencia con *Vibrio fischeri*

Los ensayos de bioluminiscencia basados en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (anteriormente *Photobacterium phosphoreum*) son los ensayos de toxicidad bacteriana más extendidos y ampliamente comercializados (MICROTOX<sup>®</sup>, TOXALERT<sup>®</sup> y LUMISTOX<sup>®</sup>) (Tabla I). Este organismo emite luz mediante una reacción que implica una enzima luciferasa bacteriana acoplada a la respiración mediante NADH y flavín nucleótidos. La detección de la toxicidad se basa en la reducción de la luz emitida y no en la muerte del organismo tras su contacto con el tóxico. La bioluminiscencia está en clara dependencia con el estado metabólico de la célula, de manera que el daño inducido por un tóxico al nivel celular que sea (enzimático, pared o membrana celular, transporte electrónico, etc.), repercutirá sobre el estado celular y se manifestará como un descenso de la bioluminiscencia.

Su resultado se presenta como la EC<sub>50</sub> (concentración efectiva media), es decir, la concentración de tóxico capaz de reducir la intensidad de la luz emitida en un 50%. Pero, tal y como propuso la Agencia de Protección Medioambiental Norteamericana (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*), este resultado también puede ser expresado en términos de «unidades de toxicidad» (TU, *toxic unit*), que se relaciona con la EC<sub>50</sub> de la siguiente manera: TU<sub>50</sub> = 100/EC<sub>50</sub>.

La bioluminiscencia ha sido aplicada en la detección de la toxicidad de efluentes industriales y compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, en comparación con otros sistemas y en sus distintas variantes<sup>(12, 14, 15, 22, 24, 59, 69, 70, 71, 72)</sup>.

Además de *V. fischeri*, nuevas estirpes bacterianas obtenidas mediante ingeniería genética a partir de especies como *Pseudomonas putida* o *Escherichia coli*, con capacidad luminiscente (por ejemplo, *P. fluorescens*), han sido empleadas en el ensayo de la toxicidad de diversas aguas residuales<sup>(11, 15, 16, 73, 74, 75, 76)</sup>. Si bien la respuesta de la estirpe *Shk1* sigue un mecanismo similar a la de *V. fischeri*, en el que la toxicidad se manifiesta como una disminución de la luminiscencia<sup>(11, 15, 16, 73)</sup>, en otros microorganismos manipulados genéticamente la presencia del operón *luxCDABE* y la activación de los genes *lux*, dan lugar a una inducción de la luminiscencia ante la presencia de ciertos tóxicos<sup>(73, 74, 75)</sup>. En este segundo caso, la incorporación de genes *lux* codificadores de luciferasas bacterianas, fusionados a promotores del sistema de reparación del ADN (*recA*, *recN*, *uvrA*, etc.), permiten la activación de éstos con la consecuente emisión de luminiscencia ante la presencia de agentes genotóxicos. Es decir, se utilizan promotores de estrés como sensores de toxicidad.

El empleo de la bioluminiscencia como ensayo de la toxicidad está extendiéndose a otro tipo de aplicaciones, como la de sistemas biosensores con aplicación a los estudios de seguimiento medioambiental y a sistemas diseñados específicamente para estudios de toxicidad<sup>(16, 18, 73, 74, 75, 76)</sup>.

Ese es el caso de algunos autores<sup>(74, 75)</sup>, los cuales desarrollaron un sistema de control de la toxicidad dispuesto en dos canales o reactores: en el primero de ellos se estimula el crecimiento de la estirpe bacteriana con capacidad bioluminiscente y en el segundo se produce la exposición de las células al tóxico que, dependiendo del mecanismo de respuesta del microorganismo ante la toxicidad, será de inhibición o activación de la bioluminiscencia. Otros autores realizaron un estudio comparativo entre los resultados obtenidos con sensores bioluminiscentes inmovilizados en microplacas y los datos obtenidos en un estudio de toxicidad con *Daphnia magna*<sup>(76)</sup>. Un caso aparte dentro de los ensayos *in vitro* de bioluminiscencia es la medida del ATP mediante la técnica basada en la reacción luciferina-luciferasa<sup>(26)</sup>. Entre sus aplicaciones, esta determinación indirecta de la biomasa ha sido empleada en la detección de la toxicidad de distintos compuestos o efluentes industriales sobre fangos activos<sup>(27, 34)</sup>. Sin embargo, si bien la cuantificación del ATP se considera un ensayo adecuado para la determinación de la actividad biológica, el método bioluminiscente de cuantificación de este componente celular se muestra más complejo y menos apropiado que los ensayos bioluminiscentes que emplean células enteras<sup>(34)</sup>.

#### 4.3. Nuevos avances en el campo de la técnica y la biotecnología: Biosensores

Los biosensores son instrumentos analíticos que transforman procesos biológicos en señales eléctricas. Para ello, constan de un material biológico inmovilizado (superficie detectora) en íntimo contacto con un sistema transductor adecuado, que convierte una señal bioquímica en una señal eléctrica cuantificable.

Desde el punto de vista medioambiental y de los estudios de toxicidad, son tres las principales aplicaciones de un biosensor: (1) La detección de contaminantes específicos, para lo que suelen utilizarse preferentemente mecanismos de alta especificidad como los enzimáticos y los anticuerpos monoclonales. (2) La detección de cambios medioambientales inespecíficos, con frecuencia adaptados a mecanismos de control *on-line*, en los que se emplean biosensores de célula entera y enzimáticos. (3) La detección de los efectos tóxicos de contaminantes y la cuantificación de los cambios medioambientales producidos, para lo que suele ser frecuente la incorporación de células bacterianas a la superficie detectora del sensor<sup>(77, 78)</sup>.

Para los estudios de toxicidad, pues, el desarrollo de un biosensor requiere de la identificación de un sistema biológico capaz de detectar adecuadamente cambios en el medio ambiente con efectos perturbadores sobre el componente biológico, así como que dicho sistema biológico pueda ser incorporado al propio sensor. Una vez ocurrida

la reacción biológica, la señal eléctrica obtenida se compara con una señal de referencia, normalmente producida por un sistema biológico similar colocado en un medio que carece de la sustancia potencialmente tóxica. La diferencia entre ambas señales es amplificada, procesada y mostrada o almacenada<sup>(78)</sup> (Figura 3).

Los biosensores basados en enzimas purificadas han sido los más ampliamente utilizados en estudios medioambientales dada la gran especificidad analítica y de actividades (óxido-reductasas e hidrolasas, principalmente). Pese a estas ventajas, las enzimas purificadas son caras e inestables, a lo que se suma que el 90% de las enzimas conocidas son intracelulares<sup>(79)</sup>. Además, este tipo de aproximación requiere, en algunas ocasiones, que tanto el contaminante como la sensibilidad del sistema enzimático seleccionado hacia dicho contaminante sean conocidos. En otras, la interacción irreversible entre algunos analitos y sus enzimas inactivan el material activo del sensor que ha de ser regenerado. En este sentido, el empleo de células enteras, tanto viables como no viables, es una alternativa en el caso de algunos procesos industriales.

Las células enteras presentan un mayor campo de respuestas ante un incidente de toxicidad aguda producido por un agente desconocido, lo que en cierta forma las capacita para ser empleadas en el control *on-line*<sup>(77)</sup>.

El empleo de células no viables se produce en situaciones en las que simplemente se persigue el empleo de éstas como almacén de enzimas intracelulares, recurriéndose entonces a técnicas de permeabilización celular<sup>(79)</sup>.

Las células viables se emplean principalmente cuando la capacidad de asimilación de los microorganismos se toma como un indicador de la actividad metabólica (por ejemplo, respiratoria). En la aplicación de este tipo de sensor microbiano<sup>(80, 81)</sup>, el cual emplea células enteras, los organismos utilizados son *Bacillus sp.* y *Trichosporon cutaneum*, respectivamente, inmovilizados sobre un electrodo de oxígeno en un sistema acondicionado para la determinación de la DBO (demanda bioquímica de oxígeno), con un tiempo de respuesta inferior a 1 minuto. *P. putida* también ha sido empleada en un sistema biosensor de estas características, cuya aplicación es, nuevamente, la medida de la DBO en muestras biológicas de baja carga contaminante (masas de agua dulce)<sup>(82)</sup>.

Los sistemas biosensores que emplean células enteras también han sido evaluados para estudiar la toxicidad de distintos efluentes industriales en EDAR<sup>(72, 83)</sup>.

El sensor amperimétrico (*CellSense*) utiliza a *Escherichia coli* y permite determinar las corrientes asociadas a los electrones involucrados en los procesos redox, principalmente respiratorios, y en el que el efecto tóxico de los contaminantes es estimado rápidamente como un cambio en la magnitud de dicha corriente de transporte electrónico<sup>(83)</sup>.

Este sensor se aplicó en muestras de aguas residuales y compuestos orgánicos con buenos resultados<sup>(18, 83)</sup>. En otros estudios también se ha empleado el biosensor *CellSense*, aunque los microorganismos empleados como sensores han sido tres: *P. putida*, microorganismos del fango activo y *V. fischeri*<sup>(72)</sup>. Estos autores compararon los resultados obtenidos con el método TOXALERT<sup>®</sup> 10 (*V. fischeri*) y un método de medida indirecta de la respiración en 96 microplacas a través de la reducción de sales de tetrazolio (Biolog MT2<sup>®</sup>). Si bien los autores reconocen la mayor idoneidad del sistema Biolog MT2<sup>®</sup>, al utilizar el propio fango activo, los resultados cuantitativos más consistentes fueron aportados por el TOXALERT<sup>®</sup> 10 que, además, presentó mejor reproducibilidad y repetitividad.

Este mismo planteamiento es el seguido por otros autores, quienes describen un sensor para la medida de la toxicidad basado en la inhibición respiratoria que, en la línea del procedimiento deseable, emplea como microorganismo a una bacteria aislada del propio sistema de depuración en el que se pretende evaluar la toxicidad de varios compuestos<sup>(84)</sup>. En este sistema, cuando se produce inhibición respiratoria por toxicidad, una mayor cantidad de oxígeno es capaz de cruzar la membrana del biosensor, afectando a las reacciones de óxido-reducción que ocurren en la membrana. Este sensor demostró un importante grado de correlación con parámetros de uso tradicional como la medida del oxígeno disuelto en su aplicación al cálculo de la tasa de respiración.

A diferencia con otros sensores basados en la medida amperimétrica del oxígeno<sup>(18, 72, 83)</sup>, en otros estudios<sup>(77)</sup> se propone un sistema fundamentado en la medida *on-line* del CO<sub>2</sub> producido en forma gaseosa, con la valiosa incorporación de biomasa del fango activo dispuesta sobre un pequeño reactor de lecho fluidizado.

En los últimos años, la metodología más comúnmente desarrollada para el seguimiento y control de EDAR es la respirometría, en sus distintas variantes<sup>(85)</sup>.

Los sistemas biosensores basados en la luminiscencia natural de algunos microorganismos como *V. fischeri* o *Photobacterium luminescens* o en la bioluminiscencia de microorganismos manipulados genéticamente, constituyen otra alternativa. Estos sistemas suelen estar dirigidos al control de contaminantes orgánicos (por ejemplo, pesticidas) o metales pesados. En algunos casos, se basan en la construcción de un plásmido en el que los genes codificadores de la luciferasa están controlados por un promotor que reconoce al analito de interés. Cuando los microorganismos metabolizan el contaminante, el mecanismo de control genético pone en marcha la síntesis de la enzima luciferasa, que produce luz que es cuantificada por un luminómetro<sup>(79, 86)</sup>.

Los biosensores representan una línea muy interesante de la biotecnología pero, a pesar de ello, todavía no han alcanzado todo su potencial en el campo de la evaluación de la toxicidad.

Con aplicación a la detección y seguimiento de contaminantes en aguas residuales, pero sin aplicación directa a la evaluación de la toxicidad, los sensores químicos aportan información muy valiosa, con posibilidades de incorporación al control *on-line*<sup>(87, 88)</sup>. Una nueva y prometedora área de aplicación es la representada por los biosensores específicos dirigidos a la detección de contaminantes y a su seguimiento, con aplicación a la protección medioambiental. Esta aplicación, que atiende a la creciente atención pública, centrada en ciertos compuestos xenobióticos con efectos perjudiciales sobre la salud, permitirá progresos tecnológicos que pronto derivarán en la evaluación de la toxicidad y en la determinación de la respuesta biológica, en términos de inhibición, de procesos biológicos en el tratamiento de las aguas residuales.

## 5. CONCLUSIONES

Uno de los principales objetivos medioambientales en el seno de la Unión Europea es la reducción de la contaminación de las aguas superficiales causada, entre otros, por las descargas procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. La Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas de 21 de mayo de 1991 sobre Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas (91/271/CEE), exige a los Estados miembros el control de las descargas de aguas residuales procedentes de las plantas de tratamiento, así como sus efectos sobre el medio ambiente. Sin embargo, la llegada de residuos potencialmente tóxicos a las estaciones depuradoras es una situación habitual, que obliga al tratamiento biológico a mantener una alta capacidad asimilativa, sometiendo a la comunidad biótica a un estrés ambiental que repercute negativamente sobre la estabilidad y eficacia del proceso. Adicionalmente, estas descargas de origen industrial dan lugar a una serie de subproductos resultado del proceso depurador, cuyos efectos sobre los seres vivos no son evaluados. Tradicionalmente, el control y caracterización de los efluentes de depuración, así como de los efluentes industriales que ingresan en planta, se han efectuado mediante parámetros físico-químicos inespecíficos como la DQO o DBO, sin más atención a los efectos biológicos de dichas descargas.

En este trabajo se expone la necesidad de disponer de sistemas de ensayo que permitan determinar rápidamente la toxicidad de un influente sobre la biomasa de un reactor, resaltándose el papel desempeñado por los ensayos microbiológicos en los últimos años, los cuales han desplazado a otros tests en los que los organismos empleados son más complejos y requieren un mantenimiento que no es ni sencillo, ni rápido, ni económico.

Como así ha sido recogido ampliamente en la literatura, la información derivada de aquellos ensayos de toxicidad que no tienen como base organismos propios del sistema, ha de ser complementada con la de otros en los que sí exista una base común con el propio sistema de tratamiento. El empleo de microorganismos para este tipo de ensayos, especialmente bacterias, cobra especial interés cuando dichos «microorganismos-test» admiten la posibilidad de ser los mismos que los del sistema sometido a estudio: aislados y posteriormente cultivados o, mejor aún, el mismo cultivo biológico. Algunos de estos ensayos que emplean la propia suspensión biológica sobre la que se quiere estudiar la toxicidad están destinados a la determinación de la actividad biológica de forma bioquímica o cinética sobre el fango activo, mientras que otros estiman de forma indirecta la biomasa. En el primer caso, la toxicidad se mide como una reducción de los niveles de actividad y, en el segundo, como una reducción de la biomasa viva.

Los protozoos responden a este doble criterio de utilización, pues sus reacciones pueden ser estudiadas sobre el cultivo biológico, mantenidos en sus condiciones originales o aislados y, posteriormente, cultivados para ser empleados como «organismos-test».

También, entre los ensayos microbiológicos con aplicación al campo de las aguas residuales se encuentran aquellos que, como se indicó anteriormente, están basados en la respuesta de microorganismos aislados del sistema de tratamiento (inhibición de la nitrificación) o manipulados genéticamente, en los que una actividad enzimática como la bioluminiscente se activa o inhibe ante los daños celulares inducidos por ciertos tóxicos.

La evolución de la biotecnología, la microtecnología y la automatización de procesos ha dado lugar al auge de los biosensores, y a su aplicación en la mejora del funcionamiento y eficacia de los procesos depuradores. Algunos

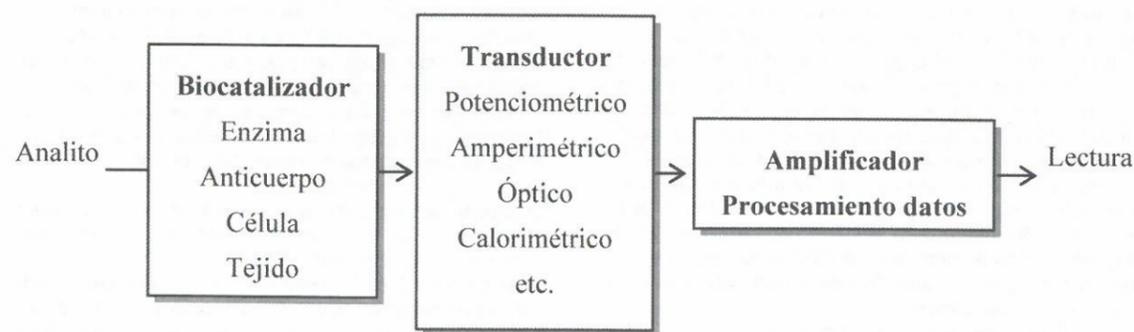


Figura 3. Configuración de un biosensor (En: Rawson, 1998).

biosensores detectan el desarrollo de condiciones poco favorables en los sistemas de tratamiento, tales como una baja actividad metabólica de la biomasa, mientras que otros detectan la presencia de agentes tóxicos en los influentes a planta. En cualquier caso, los esfuerzos en este campo deben estar dirigidos a prevenir o minimizar el deterioro del sistema biológico y, aunque sus posibilidades no estén desarrolladas en su totalidad, reúnen condiciones muy favorables para ser empleados en el campo de las aguas residuales, con resultados rápidos a la vez que precisos.

## 6. AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Grupo Bioindicación Sevilla, por ceder la microfotografía de colonias nitrificantes de la Figura 1.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Grau, P. y Da-Rin, B. P. (1997): «Management of toxicity effects in a large wastewater treatment plant». *Water Sci. Technol.* 36, 1-8.
- (2) Glaser, D. (1988): «Simultaneous consumption of bacteria and dissolved organic matter by *Tetrahymena pyriformis*». *Microbiol. Ecol.* 15, 189-201.
- (3) Holubar, P.; Grudke, T.; Moser, A.; Strenn, B. y Braun, R. (2000): «Effects of bacterivorous ciliated protozoans on degradation efficiency of a petrochemical activated sludge process». *Water Res.* 34, 7, 2051-2060.
- (4) Broecker, B. y Zahn, R. (1977): «The performance of activated sludge plants compared with the results of various bacterial toxicity tests- a study with 3,5-dichlorophenol». *Water Res.* 11, 165-172.
- (5) Beyenal, N.Y.; Özbelge, T.A. y Özbelge, H.Ö. (1997): «Combined effects of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on activated sludge process». *Water Res.* 31, 4, 699-704.
- (6) Jönsson, K.; Grunditz, C.; Dalhammar, G. y Jansen, J. la C. (2000): «Occurrence of nitrification inhibition in Swedish municipal wastewaters». *Water Res.* 34, 9, 2455-2462.
- (7) Tsai, Y.-P.; You, S.-J.; Pai, T.-Y. y Chen, K.-W. (2005): «Effect of cadmium on composition and diversity of bacterial communities in activated sludges». *Internat. Biodeterior. Biodegrad.* 55, 285-291.
- (8) Coombe, V. T.; Moore, K. W. y Hutchings, M. J. (1999): «Tie and Tre: an abbreviated guide to dealing with toxicity». *Water Sci. Technol.* 39, 10-11, 91-97.
- (9) Slabbert, J. L. y Venter, E. A. (1999): «Biological assays for aquatic toxicity testing». *Water Sci. Technol.* 39, 10-11, 367-373.
- (10) Yoshioka, Y.; Nagase, H.; Ose, Y. y Sato, T. (1986): «Evaluation of the Test Method "Activated sludge, respiration inhibition test" proposed by de OECD». *Ecotox. Environ. Saf.* 12, 206-212.
- (11) Kelly, C.J.; Lajoie, C.A.; Layton, A.C. y Sayler, G.S. (1999): «Bioluminescent reporter bacterium for toxicity monitoring in biological wastewater treatment systems». *Water Environ. Res.* 71, 31-35.
- (12) Gutiérrez, M.; Etxebarria, J. y de las Fuentes, L. (2002): «Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between MICROTOX<sup>®</sup> and activated sludge oxygen uptake inhibition». *Water Res.* 36, 919-924.
- (13) Dalzell, D. J. B. y Christofi, N. (2002): «An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sewage sludge process». *Water Res.* 36, 1493-1502.
- (14) Ricco, G.; Tomei, M.C.; Ramadori, R. y Laera, G. (2004): «Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox<sup>®</sup>». *Water Res.* 38, 2103-2110.
- (15) Ren, S. y Frymier, P. D. (2003): «Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components». *Water Res.* 37, 1655-1661.
- (16) Kelly, C. J., Tumsaraj, N. y Lajoie, C. A. (2004): «Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system». *Water Res.* 38, 2, 423-431.
- (17) Hoffmann, C. y Christofi, N. (2001): «Testing the toxicity of influents to activated sludge plants with the *Vibrio fischeri* bioassay utilising a sludge matrix». *Environ. Toxicol.* 16, 422-427.
- (18) Farré, M. y Barceló, D. (2003): «Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis». *Tr. Analyt. Chem.* 22, 5, 299-310.
- (19) Crane, M.; Delaney, P.; Mainstone, C. y Clarke, S. (1995): «Measurement by in situ bioassay of water quality in an agricultural catchment». *Water Res.* 29, 11, 2441-2448.
- (20) Ono, Y.; Somya, I.; Kawaguchi, T. y Mohri, S. (1996): «Evaluation of toxic substances in effluents from a wastewater treatment plant». *Desalination* 106, 255-261.
- (21) Takigami, H.; Taniguchi, N.; Shimizu, Y. y Matsui, S. (1998): «Toxicity assays and their evaluation on organic polymer flocculants for municipal sludge dewatering». *Water Sci. Technol.* 38, 7, 207-215.
- (22) Tisler, T. y Zagorc-Koncan, J. (1999): «Toxicity evaluation of wastewater from the pharmaceutical industry to aquatic organisms». *Water Sci. Technol.* 39, 10-11, 71-76.
- (23) Tonkes, M.; de Graaf, P. J. F. y Graansma, J. (1999): «Assessment of complex industrial effluents in the Netherlands using a whole effluent toxicity (or wet) approach». *Water Sci. Technol.* 39, 10-11, 55-61.
- (24) Castillo, M.; Alonso, M.C.; Riu, J.; Reinke, M.; Klöter, G.; Dizer, H.; Fischer, B.; Hansen, P. D. y Barceló, D. (2001): «Identification of cytotoxic compounds in European wastewaters during a field experiment». *Anal. Chim. Acta* 426, 265-277.
- (25) Békaert, C.; Ferrier, V.; Marty, J.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Bispo, A.; Jourdain, M. J.; Jauzein, M.; Lambalez-Michel, L. y Billard, H. (2002): «Evaluation of toxic and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils». *Waste Management* 22, 241-247.
- (26) Andreadakis, A. D.; Kalergis, C. M.; Kartsonas, N. y Anagnostopoulos, D. (1997): «Determination of the impact of toxic inflows on the performance of activated sludge by wastewater characterization». *Water Sci. Technol.* 36, 2-3, 45-52.
- (27) Dalzell, D. J. B.; Alte, S.; Aspichueta, E.; de la Sota, A.; Etxebarria, J.; Gutiérrez, M.; Hoffmann, C. C.; Sales, D.; Obst, U. y Christofi, N. (2002): «A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge». *Chemosphere* 47, 535-545.
- (28) Isac, L. y Arnáiz, C. (2005): «Determinación de la actividad biológica y de la biomasa en sistemas de depuración. Aplicación en la detección de estados de inhibición o toxicidad». *Afinidad* 62, 517, 197-210.
- (29) Awong, J.; Bitton, G. y Koopman, B. (1985): «ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams». *Water Res.* 19, 7, 917-921.
- (30) Anderson, K.; Koopman, B. y Bitton, G. (1988): «Evaluation of INT-dehydrogenase assay for heavy metal inhibition of activated sludge». *Water Res.* 22, 3, 349-353.
- (31) Kim, C.-W.; Koopman, B. y Bitton, G. (1994): «INT-dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge». *Water Res.* 28, 5, 1117-1121.

- (32) Madoni, P.; Davoli, D. y Guglielmi, L. (1999): «Response of SOUR and AUR to heavy metal contamination in activated sludge». *Water Res.* 33, 10, 2459-2464.
- (33) Coello Oviedo, M<sup>a</sup> D.; Sales Márquez, D. y Quiroga Alonso, J. M<sup>a</sup> (2002): «Toxic effects of metals on microbial activity in the activated sludge process». *Chem. Biochem. Eng. Q.* 16, 139-144.
- (34) Dalzell, D. J. B. y Christofi, N. (2002): «An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sewage sludge process». *Water Res.* 36, 1493-1502.
- (35) Isac, L. (2003): «Determinación de la actividad biológica aerobia. Aplicación en procesos de depuración de aguas residuales urbanas e industriales». Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- (36) Caravelli, A.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. (2004): «Effect of chlorine on filamentous microorganisms present in activated sludge as evaluated by respirometry and INT-dehydrogenase activity». *Water Res.* 38, 9, 2395-2405.
- (37) Trevizo, C. y Nirmalakhandan, N. (1999): «Prediction of microbial toxicity of industrial organic chemicals». *Water Sci. Technol.* 39, 10-11, 63-69.
- (38) Nirmalakhandan, N.; Arulgnanendran, V.; Mohsin, M.; Sun, B. y Cadena, F. (1994): «Toxicity of mixtures of organic chemicals to microorganisms». *Water Res.* 28, 3, 543-551.
- (39) Wang, J.; Zhang, M.; Xu, J. y Wang, Y. (1995): «Reciprocal effect of Cu, Cd, Zn on a kind of marine alga». *Water Res.* 29, 1, 209-214.
- (40) Mayfield, C. I. (1998): «Microbial Systems. En: Handbook of Ecotoxicology». Ed. Peter Calow. Blackwell Science Ltd. Osney Mead, Oxford.
- (41) Christofi, N.; Aspichueta, E.; Dalzell, D.; de la Sota, A.; Etxebarria, J.; Fernández, T.; Gutiérrez, M.; Morton, J.; Obst, U. y Schmellenkamp, P. (2003): «Congruence in the performance of model nitrifying activated sludge plants located in Germany, Scotland and Spain». *Water Res.* 37, 177-187.
- (42) Principi, P.; Villa, F.; Bernasconi, M. y Zanardini, E. (2006): «Metal toxicity in municipal wastewater activated sludge investigated by multivariate analysis and in situ hybridization». *Water Res.* 40, 99-106.
- (43) Curds, C. R. (1982): «The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes». *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 27-46.
- (44) Salvadó, H. (1994): «Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastewater treatment plants based on a proposed model». *Water Res.* 28, 1315-1321.
- (45) Lee, S.; Basu, S.; Tyler, C. W. y Wei, I. W. (2004): «Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant». *Adv. Environ. Res.* 8, 3-4, 371-378.
- (46) Senler, N. G. y Yildiz, I. (2004): «Faunistic and morphological studies on Ciliates (Protozoa, Ciliophora) from a small pond, with responses of ciliate populations to changing environmental conditions». *Turk. J. Zool.* 28, 245-265.
- (47) Madoni, P. (1994): «A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis». *Water Res.* 28, 1, 67-75.
- (48) Nicolau, A.; Martins, M.J.; Mota, M. y Lima, N. (2005): «Effect of copper in the protistan community of activated sludge». *Chemosphere* 58, 5, 605-614.
- (49) Abraham, J.V.; Butler, R.D. y Sigee, D.C. (1997): «Ciliate populations and metals in an activated-sludge plant». *Water Res.* 31, 5, 1103-1111.
- (50) Madoni, P.; Davoli, D.; Gorbi, G. y Vescovi, L. (1996): «Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community». *Water Res.* 30, 135-141.
- (51) Puigagut, J.; Salvadó, H. y García, J. (2005): «Short-term harmful effects of ammonia nitrogen on activated sludge microfauna». *Water Res.* 39, 4397-4404.
- (52) Salvadó, H. y Gracia, M. P. (1993): «Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis». *Water Res.* 27, 891-895.
- (53) Martín-González, A.; Díaz, S.; Borniquel, S.; Gallego, A. y Gutiérrez, J. C. (2006): «Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants». *Res. Microbiol. En prensa.*
- (54) Madoni, P. (2000): «The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates». *Environ. Pollut.* 109, 1, 53-59.
- (55) Madoni, P. y Romeo, M. G. (2005): «Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists». *Environ. Pollut.* 1-7. En prensa.
- (56) Nicolau, A.; Mota, M. y Lima, N. (1999): «Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to copper, zinc, cycloheximide and Triton X-100». *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 209-216.
- (57) Nicolau, A.; Dias, N.; Mota, M. y Lima, N. (2001): «Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment». *Res. Microbiol.* 152, 621-630.
- (58) Nilsson, J. R. (2003): «How Cytotoxic is Zinc? A study on Effects of Zinc on Cell Proliferation, Endocytosis, and Fine Structure of the Ciliate *Tetrahymena*. *Acta Protozool.* 42, 19-29.
- (59) Bogaerts, P.; Bohatier, J. y Bonnemoy, F. (2001): «Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure-Activity relationships of xenobiotics: comparison with the Microtox». *Test. Ecotox. Environ. Saf.* 49, 293-301.
- (60) Nicolau, A.; Mota, M. y Lima, N. (2004): «Effect of different toxic compounds on ATP content and acid phosphatase activity in axenic cultures of *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotox. Environ. Saf.* 57, 129-135.
- (61) Stevik, T. K.; Hanssen, J. F. y Jenssen, P. D. (1998): «A comparison between DAPI direct count (DDC) and most probable number (MPN) to quantify protozoa in infiltration systems». *J. Microbiol. Meth.* 33, 13-21.
- (62) Schramm, A.; de Beer, D.; Wagner, M. y Amann, R. (1998): «Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor». *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 9, 3480-3485.
- (63) Koops, H.-P. y Pommerening-Röser, A. (2001): «Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species». *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 1-9.
- (64) Grunditz, C.; Gumaelius, L. y Dalhammar, G. (1998): «Comparison of inhibition assays using pure cultures of nitrogen removing bacteria-application to industrial wastewater». *Water Res.* 32, 10, 2995-3000.
- (65) Grunditz, C. y Dalhammar, G. (2001): «Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*». *Water Res.* 35, 2, 433-440.
- (66) Arvin, E.; Dyreborg, S.; Menkc, C. y Olsen, J. (1994): «A mini-nitrification test for toxicity screening, MINNTOX». *Water Res.* 28, 9, 2029-2031.
- (67) Cui, R.; Chung, W.-J. y Jahng, D. (2004): «A rapid and simple respirometric biosensor with immobilized cells of *Nitrosomonas europaea* for detecting inhibitors of ammonia oxidation». *Biosens. Bioelectron.* 20, 9, 1788-1795.
- (68) Juliastuti, S.R.; Baeyens, J.; Creemers, C.; Bixio, D. y Lodewyckx, E. (2003): «The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge». *J. Hazard. Mat. B* 100, 271-283.

<sup>(68)</sup> Chen, C.-Y.; Chen, J.-N. y Chen, S.-D. (1999): «Toxicity assessment of industrial wastewater by microbial testing method». *Water Sci. Tech.* 39, 10-11, 139-143.

<sup>(70)</sup> Farré, M.; García, M.-J.; Tirapu, L.; Ginebreda, A. y Barceló, D. (2001a): «Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by TOXALERT<sup>®</sup> and MICROTOX<sup>®</sup> bioluminescence inhibition assays». *Anal. Chim. Acta* 427, 181-189.

<sup>(71)</sup> Jennings, V.L.K.; Rayner-Brandes, M.H. y Bird, D.J. (2001): «Assessing chemical toxicity with bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems». *Water Res.* 35, 14, 3448-3456.

<sup>(72)</sup> Freitas dos Santos, L.; Defrenne, L. y Krebs-Brown, A. (2002): «Comparison of three microbial assay procedures for measuring toxicity of chemical compounds: ToxAlert<sup>®</sup> 10, CellSense and Biolog MT2 microplates». *Anal. Chim. Acta* 456, 41-54.

<sup>(73)</sup> Ren, S. (2004): «Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments». *Environ. Internat.* 30, 1151-1164.

<sup>(74)</sup> Gu, M.B.; Gil, G.C. y Kim, J.H. (1999): «A two-stage mini-bioreactor system for continuous toxicity monitoring». *Biosens. Bioelectron.* 14, 355-361.

<sup>(75)</sup> Gu, M.B. y Gil, G.C. (2001): «A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity». *Biosens. Bioelectron.* 16, 661-666.

<sup>(76)</sup> Kim, B.C.; Park, K.S.; Kim, S.D. y Gu, M.B. (2003): «Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay». *Biosens. Bioelectron.* 18, 821-826.

<sup>(77)</sup> Vaiopoulou, E.; Melidis, P.; Kampragou, E. y Aivasidis, A. (2005): «On-line load monitoring of wastewater with a respirographic microbial sensor». *Biosens. Bioelectron.* 21, 365-371.

<sup>(78)</sup> Rawson, D. M. (1994): «Bioprobes and Biosensors». En: *Handbook of Ecotoxicology*. Ed. Peter Calow. Blackwell Science Ltd. Osney Mead, Oxford.

<sup>(79)</sup> D'Souza, S. F. (2001): «Microbial biosensors». *Review. Biosens. Bioelectron.* 16, 337-353.

<sup>(80)</sup> Riedel, K.; Renneberg, R.; Kuehn, M. y Scheller, F. (1988): «A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensor». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 316-318.

<sup>(81)</sup> Riedel, K.; Lange, K.-P.; Stein, H.-J.; Kühn, M.; Ott, P. y Scheller, F. (1990): «A microbial sensor for BOD». *Water Res.* 24, 7, 883-887.

<sup>(82)</sup> Chee, G.-J.; Nombra, Y. y Karube, I. (1999): «Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand». *Anal. Chim. Acta* 379, 185-191.

<sup>(83)</sup> Farré, M.; Pasini, O.; Alonso, M.-C.; Castillo, M. y Barceló, D. (2001b): «Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor». *Anal. Chim. Acta* 426, 155-165.

<sup>(84)</sup> Liao, J.-D.; Wang, S.-H. y Hsu, D.-J. (2001): «Studies on the early detection of wastewater's toxicity using a microbial sensing system». *Sens. Actuators B Chem.* 72, 167-173.

<sup>(85)</sup> Working Group No. 4: «Biological Processes» (2002): Report of the Working Group Meeting: Biosensors in WWTPs. *European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research, COST 624 «Optimal Management of Wastewater Systems»*. Milán (Italia), Junio de 2002.

<sup>(86)</sup> Sticher, P.; Jaspers, M. C. M.; Stemmler, K.; Harms, H.; Zehnder, A. J. B. y van der Meer, J. R. (1997): «Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples». *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4053-4060.

<sup>(87)</sup> Bourgeois, W.; Gardey, G.; Servieres, M. y Stuetz, R.M. (2003): «A chemical sensor array based system for protecting wastewater treatment plants». *Sens. Actuators B* 97, 109-116.

<sup>(88)</sup> Vanrolleghem, P. A. y Lee, D. S. (2003): «On-line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art». *Water Sci. Technol.* 47, 2, 1-34.

# Influencia de la estructura química y concentración de dos blanqueadores ópticos en la mejora del UPF de tejidos de Modal y Modal Sun

Ascensión Riva\*, Inés M. Algaba, Remedios Prieto

Instituto de Investigación Textil de Terrassa (INTEXTER) - Universidad Politécnica de Cataluña (UPC)

Colón 15, 08222 Terrassa, España

*Influence of the Chemical Structure and Concentration of Two Optical Brightening Agents on the Improvement of the UPF of Modal and Modal Sun Fabrics*

*Influència de l'estructura química i concentració de dos blanquejadors per la millora del UPF de teixits de Modal i Modal Sun*

Recibido: 18 de mayo de 2006; aceptado: 9 de julio de 2006

## RESUMEN

En el presente trabajo se exponen los resultados del estudio de la protección contra la radiación ultravioleta proporcionada por dos blanqueadores ópticos, de diferente estructura química, al ser aplicados sobre tejidos de Modal y Modal Sun. Se ha evaluado la influencia de la estructura química y de la concentración de ambos productos. Para ello se han determinado los espectros de absorción de radiación ultravioleta de ambos productos y los espectros de transmitancia difusa de los tejidos tratados con cada producto a las diferentes concentraciones. Se han calculado los valores del UPF (Ultraviolet Protection Factor) de los tejidos no tratados y tratados, estableciendo la efectividad de cada producto en relación a su acción en las zonas UVA y UVB del espectro.

**Palabras clave:** Blanqueador óptico. Factor de Protección Ultravioleta (UPF). Radiación ultravioleta. Transmitancia. Tejido celulósico.

## SUMMARY

The present paper shows the results of the study of two optical brightening agents, with a different chemical structure, when applied on Modal and Modal Sun fabrics. The influence of the chemical structure and the concentration of both products has been evaluated. To this aim the ultraviolet absorption spectra of the products have been determined as well as the diffuse transmittance spectra of the fabrics treated with different concentrations of the products. The UPF (Ultraviolet Protection Factor) of the untreated and treated fabrics has been calculated, establishing the effectiveness of each product regarding their action in the UVA and UVB zones of the spectrum.

**Key words:** Optical brightening agent. Ultraviolet Protection Factor (UPF). Ultraviolet radiation. Diffuse transmittance. Cellulose woven fabrics.

## RESUM

En el present treball, s'exposen els resultats de l'estudi de la protecció contra la radiació ultravioleta proporcionada per dos blanquejadors òptics, de diferent estructura química, al ser aplicats a teixits de Modal i Modal Sun. S'han avaluat la influència de l'estructura química i de la concentració de cada producte. Amb aquest objectiu s'han determinat els espectres d'absorció de la radiació UV d'ambdós productes i els espectres de transmitància difosa dels teixits tractats amb cada producte a diferents concentracions. S'han calculat els valors del UPF (Ultraviolet Protection Factor) dels teixits tractats i no tractats, establint l'efectivitat de cada producte en relació a la seva acció a les zones UVA i UVB de l'espectre.

**Mots clau:** Blanquejador òptic. Factor de Protecció Ultravioleta (UPF). Radiació ultravioleta. Transmitància. Teixit cel·lulòsic.

\* E-mail: ariva@intexter.upc.edu  
Teléfono: +34 93 739 82 70  
Fax: +34 93 739 82 72