

# Aplicación del biotest de la bioluminiscencia a algunos efluentes industriales de la ciudad de Córdoba

El test de la bioluminiscencia, parámetro de control en varias normativas autonómicas y municipales sobre vertidos industriales de nuestro país, sirve para evaluar la biotoxicidad de aguas y efluentes. Este artículo presenta los resultados obtenidos en la aplicación de este bioensayo a algunos efluentes industriales procedentes de distintos sectores de actividad de la ciudad de Córdoba. Los datos indican una importante variabilidad de la respuesta bioluminiscente frente a los efluentes ensayados ( $EC_{50}$  entre 79 y  $<1,3$  equitox/ $m^3$ ) dependiendo del tipo de vertido. También se ha comprobado una correlación estadística significativa entre inhibición de la luminiscencia y log de la DQO de los efluentes investigados, así como una relación entre la  $EC_{50}$  y el contenido en metales pesados. Finalmente, el establecimiento de la potencialidad biotóxica de un agua residual debe considerar varios test de biotoxicidad y no solamente uno.

## Introducción

A medida que se avanza en la caracterización de un agua residual, sea doméstica o industrial, va apareciendo la idea de que no es tan importante el contenido en sustancias, elementos o compuestos químicos que ésta albergue, sino la afección que la suma o el resultado de todos ellos pueda provocar en el medio natural. Y esta idea enlaza con la estrategia seguida, tanto en nuestro país como en la Unión Europea, de que además de exigir el cumplimiento de unos estándares de calidad para las aguas depuradas, también deben conseguirse los denominados objetivos de calidad en los cauces públicos a los que se vierten después estas aguas ya depuradas (RD 849/1986; RD 995/2000; RD 1/2001; RD 606/2003).

**Rafael Marín Galvín**  
Doctor en Ciencias Químicas

**Luis Alonso Pérez de Siles**  
Licenciado en Ciencias Químicas

**Inmaculada Chamber Pérez**  
**Inmaculada Jiménez Perona**  
Licenciadas en Ciencias Biológicas

Empresa Municipal de Aguas de Córdoba, S.A.

El establecimiento pues, de criterios sólidos, homologables y estandarizados que culminen en procedimientos normalizados para cuantificar la potencia biotóxica de un efluente dado es una cuestión no exenta de complejidad. Cualquier método de medida de biotoxicidad consiste, en síntesis, en determinar en condiciones perfectamente controladas y reproducibles el efecto inhibitor de una muestra a testar sobre un determinado organismo vivo (Marín Galvín, 1995).

Dada su simplicidad bioquímica, el empleo de cepas bacterianas ha sido un camino muy utilizado para evaluar la biotoxicidad de efluentes. Así, se han empleado cultivos bacterianos controlados que en presencia de compuestos potencialmente biotóxicos reducían su actividad metabólica lo que podía ponerse de manifiesto, por ejemplo, mediante el descenso en su consumo de oxígeno (Marín Galvín, 1995; 2003). Otros cultivos, en este caso bioluminiscentes, disminuyen más o menos su poder luminiscente en función de la mayor o menor afección que el tóxico produzca en ellos (caso del ensayo de la bioluminiscencia con *Vibrio fischeri* usado en este artículo). En este grupo de técnicas también cabe citarse el conocido test de mutagenicidad de AMES que emplea cepas modificadas

de *Salmonella Typhymurium* (Marín Galvín, 1995).

La inhibición en el crecimiento de poblaciones de algunas algas del tipo de *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* y *Chlorella vulgaris* ha servido y sirve asimismo para estudios de biotoxicidad. Otros organismos empleados han sido crustáceos como *Daphnia magna* que eran total o parcialmente inmovilizados dependiendo de la potencia tóxica del compuesto a estudiar. Además, se pueden citar los bioensayos que emplean moluscos bivalvos como *Crasostrea gigas* (ostra) o *Mytilus edulis* (mejillón). Finalmente, deben referirse los bioensayos que estudian el comportamiento de peces como el *Brachydanio rerio* (zebra) y el *Cyprinus carpio* (carpa común) (Capafons Ros, et al., 2004). Todos estos ensayos en condiciones perfectamente normalizadas pueden arrojar información acerca del poder biotóxico de sustancias puras o complejas que puedan acceder al medio acuático.

Lógicamente, cuantos más ensayos de biotoxicidad estén disponibles de un potencial tóxico, más podremos hacernos una idea completa de la afección de ese tóxico sobre un ecosistema, puesto que éstos se hayan integrados por una extraordinaria variedad de organismos y microorganismos, en compleja interacción, para los cuáles no debe valer sólo un bioensayo dado.

No obstante lo anterior, el empleo del test de la bioluminiscencia con la bacteria marina *Vibrio fischeri* es una técnica de gran implantación en la actualidad a fin de testar la biotoxicidad de aguas residuales y efluentes. Presenta innegables ventajas como son simplicidad operativa, posibilidad de empleo de cultivos criogenizados que, posteriormente, se renaturalizan en óptimas condiciones vitales, buena reproducibilidad

y obtención de secuencias temporales de comportamiento biotóxico para prácticamente cualquier efluente. Todo esto ha hecho que esta técnica se haya implantado en más de veinte normativas autonómicas y municipales sobre vertidos (Capafons Ros, et al., 2004; Orús Lacort, et al., 2004) de nuestro país, siendo un parámetro más de obligado cumplimiento para vertidos industriales. Además en un reciente trabajo se demostró la relación entre valores de toxicidad frente a la bioluminiscencia y sustancias limitadas en el Reglamento Metropolitano de Vertidos de Aguas Residuales Industriales del Área Metropolitana de Barcelona (Capafons Ros, et al., 2004).

De acuerdo a lo comentado más arriba, el presente artículo recoge los primeros resultados obtenidos en la aplicación del test de bioluminiscencia a algunos vertidos industriales de la ciudad de Córdoba, dentro de una línea de investigación a largo plazo llevada a cabo por EMACSA en este campo.

## Metodología

Los datos presentados corresponden al período comprendido entre noviembre de 2004 y enero de 2005, y las muestras de aguas residuales industriales se han tomado aleatoriamente de diferentes vertidos industriales, aunque intentando ofrecer un amplio espectro de las actividades industriales ubicadas en la ciudad de Córdoba: así, se tomaron vertidos de industrias papeleras, cerveceras, de refrescos no alcohólicos, almazaras, alimentarias y de transformación de cobre.

Las aguas residuales se investigaron siguiendo las habituales técnicas empleadas en estudios de aguas (AWWA, 1997; Marín Galvín, 1995; Rodier, 1989). En

particular los  $S_{SUS}$  se determinaron tras filtración (filtro de 45 mm de tamaño de poro) y posterior secado del residuo a 108 °C, la DBO<sub>5</sub> mediante el método del OXITOP™ empleando inhibidor de nitrificación (aliltiurea), y la DQO mediante la técnica del dicromato potásico.

Además, los análisis de metales se llevaron a cabo mediante la técnica de la ICP (Acoplamiento Inducido de Plasma) usando un equipo Varian VISTA-AX y posteriormente a la digestión del agua residual: ésta se llevó a cabo con adición de 3 ml de HCl y 1 ml de HNO<sub>3</sub> concentrados a 20 ml de muestra, introducidos en recipiente cerrado de teflón mantenido a presión y calentado en placa calefactora a 180 °C durante dos horas.

Los ensayos de bioluminiscencia se sirvieron de un equipo comercial LUMIS-TOX™ 300, siguiendo el prontuario suministrado por el fabricante. En síntesis, el modo operativo consiste en comparar la afección de muestras progresivamente más diluidas del agua problema, en condiciones controladas de temperatura (15 °C), salinidad (2% en NaCl), pH (6-8) y tiempo de reacción (quince minutos), sobre un cultivo estándar de bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri*: a medida que el efluente a testar es más biotóxico para este tipo de bacterias, más baja será la bioluminiscencia resultante del cultivo testigo (medida a  $\lambda=490\text{ nm}\pm 40\text{ nm}$ ).

Con este procedimiento se obtienen valores de concentraciones de efluente que provocan diferentes tasas de inmovilización (o muerte) en los cultivos bioluminiscentes, que se denotan como "EC<sub>x</sub>", es decir, concentraciones que causan un descenso de la bioluminiscencia al "x%" de la inicial. El parámetro más empleado en este tipo de estudios es la "EC<sub>50</sub>" o concentración del vertido

que provoca la reducción al 50% de la bioluminiscencia original. Este parámetro se puede expresar directamente como porcentaje de dilución del vertido o como unidades de toxicidad o "equitox/m<sup>3</sup>", teniendo en cuenta que "nº de equitox/m<sup>3</sup> = 100 / EC<sub>50</sub> (en porcentaje de dilución)".

## Resultados y discusión

### Características generales de los vertidos investigados

Las muestras reales testadas han sido nueve y están identificadas como: almazara, alimentación-1, alimentación-2, cervecera, papelera, refrescos-1, transformados de cobre-1, transformados de cobre-2 y refrescos-2. Respecto a la muestra de almazara, se trató de un efluente procedente del lavado directo de aceitunas y aceites de oliva; las dos muestras de alimentación correspondieron a empresas de fabricación de diversas salsas preparadas; las dos de refrescos, a efluentes de empresas de preparación y envasado de bebidas no alcohólicas; las dos muestras de transformados de cobre se obtuvieron de vertidos de empresas de transformación de cobre y fabricación de tubos y accesorios de cobre y latón; por último, las muestras de cervecera y papelera correspondieron al efluente integrado de estos tipos de industrias.

La tabla 1 presenta las características más relevantes de los vertidos estudiados. Puede observarse que las más altas cargas contaminantes (sólidos en suspensión y carga biodegradable) corresponden a la almazara, a las dos industrias alimentarias, a la cervecera y a la papelera. Los efluentes abarcan desde cargas contaminantes muy altas (almazara, alimentación-2- DQO entre 7.500 y 32.000 mg/l)- hasta otras asimilables a

Parámetros	Unidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Conductividad	µS/cm	2.740	2.210	3.740	1.439	761	2.460	1.506	1.267	2.940
pH	u. pH	5,27	5,08	4,04	9,67	7,71	8,68	7,75	7,57	9,54
Sól.Suspens.	mg/l	3.100	1.670	4.000	152	1.270	28	340	36	176
DBO <sub>5</sub>	mg/l	13.000	1.400	4.000	700	500	170	100	27	280
DQO	mg/l	26.000	7.500	32.360	5.070	3.330	566	810	276	2.090
Grasas	mg/l	365	175	225	34	9	12	80	14	25

(1)Almazara; (2)Alimentación-1; (3)Alimentación-2; (4)Cervecera; (5)Papelera; (6)Refrescos-1; (7)Transformados Cobre-1; (8)Transformados Cobre-2; (9)Refrescos-2.

Tabla 1. Algunas características de los vertidos industriales investigados.

Metales	Unidades	(5)	(7)	(8)
Hierro	mg/l	1,50	0,42	0,77
Cobre	mg/l	0,53	1,49	0,36
Aluminio	mg/l	1,60	0,83	1,66
Zinc	mg/l	0,37	<0,03	1,25
Cromo	mg/l	<0,03	1,49	<0,03
Plomo	mg/l	<0,03	0,14	0,14
Boro	mg/l	4,70	0,32	<0,03
Mn,As,Se,Ni,Cd, Hg,Ba,Sr,Ag	mg/l	<0,03	<0,03	<0,03

(5)Papelera; (7)Transformados Cobre-1; (8)Transformados Cobre-2.

Tabla 2. Contenido en metales de algunos vertidos investigados

vertidos domésticos (transformados de cobre-2).

Por otro lado, en la *tabla 2* se ha presentado el contenido en metales totales (tras digestión) de las tres muestras que podrían contener, a priori, este tipo de contaminantes en función de su proceso productivo: la papelera y las dos empresas de transformación de cobre. Como se observa, si bien los niveles de metales totales medidos son bajos, debe destacarse en los tres casos la presencia de hierro (1,5 mg/l máximo en papelera), cobre (1,49 mg/l, máximo en transformados de cobre-1) y aluminio (1,66 mg/l, máximo en transformados de cobre-2), y en algunas de ellas, además de los anteriores metales, la presencia de plomo, cromo, zinc y boro. Las concentraciones del resto de metales investigados fueron siempre inferiores a 0,03 mg/l.

### Comportamiento de los efluentes investigados frente a la bioluminiscencia

Se han sometido las nueve muestras de aguas residuales industriales antes referidas al test de la bioluminiscencia, obteniéndose los resultados recogidos en la *figura 1*. Allí se ha representado gráficamente la evolución de los porcentajes de muestra (vertidos diluidos con matriz inerte a base de disolución de NaCl hasta un 100%) que provocaban diferentes porcentajes de disminución de la bioluminiscencia del cultivo original de *Vibrio fischeri* (desde el 20 al 80% de reducción).

Cuanto una menor cantidad (%) de un vertido dado provoque una más alta reducción de la bioluminiscencia original, más alta será su potencia biotóxica frente al cultivo testigo. En este sentido, puede observarse que el vertido más biotóxi-

co era el procedente de la almazara, puesto que diluciones muy por debajo del 3% (i.e., 3% en volumen de vertido y 97% en volumen de matriz inerte) ya provocaban tasas de inhibición de hasta un 80%. Otro vertido especialmente activo frente a la bioluminiscencia fue el de alimentación-1 en que diluciones por debajo del 10% ya provocaron inhibiciones del 50%.

El vertido menos biotóxico resultó ser el de refrescos-2 (diluciones del 23% sólo provocan un 20% de disminución de bioluminiscencia) y entre dos los anteriores se encontraron el resto de vertidos con una potencia biotóxica intermedia. La evolución de porcentaje de inhibición bioluminiscente frente al porcentaje de muestra en todos los casos, salvo en el vertido de almazara (probablemente debido a su alto efecto biotóxico) exhibió una secuencia ascen-

dente aproximadamente exponencial (*figura 1*).

Dado que el parámetro estándar empleado en estudios de biotoxicidad es la  $EC_{50}$ , es decir, la concentración de sustancia o especie a testar que provoca la disminución al 50% de la luminiscencia original, podemos comparar los valores de  $EC_{50}$  para los nueve vertidos investigados. Esta información se presenta en la *tabla 3*. De ella se deduce que el vertido más biotóxico sigue siendo el de almazara (79,4 equitox/m<sup>3</sup>), que el menos el de refrescos-2 (<1,3 equitox/m<sup>3</sup>) pero que la secuencia sufre algunas alteraciones con respecto a la biotoxicidad para diluciones más bajas (porcentaje de muestra en incremento). Esto podría indicar en cierto modo (y sin poder ser confirmado con los datos actuales) algún tipo de adaptación inmediata del cultivo bioluminiscente a algún vertido concreto, relacionado con su composición específica.

Comparando los valores de las unidades de contaminación de cada efluente (en equitox/m<sup>3</sup>), con los valores paramétricos establecidos en las normativas autonómicas o municipales de nuestro país que contemplan este parámetro como limitante para su vertido, cuyos valores límite están entre 15 y 50 equitox/m<sup>3</sup>, puede deducirse que sólo un vertido de los estudiados se situaría muy por encima de los límites biotóxicos habituales mientras un segundo podría superar ligeramente el límite más bajo de los antes referidos.

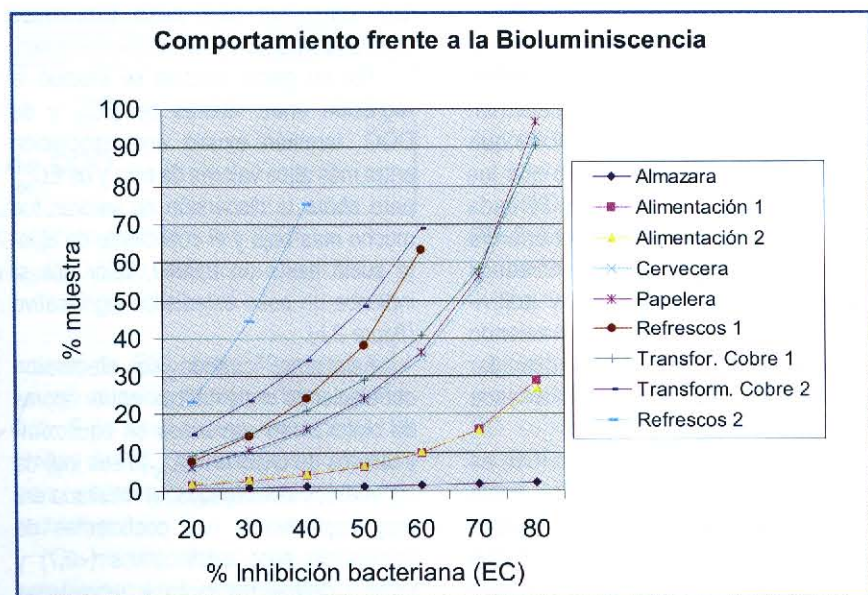


Figura-1. Comportamiento frente al test de la bioluminiscencia de los vertidos investigados ( $EC_{50}$  –en porcentaje de muestra– frente a porcentaje de inhibición).

Empresa	EC <sub>50</sub>	Equitox/m <sup>3</sup>
Almazara	1,26	79,4
Alimentación-1	6,95	1,6
Alimentación-2	6,77	14,8
Cervecería	83,30	4,3
Papelera	24,26	4,1
Refrescos-1	38,18	2,6
Transformados de Cobre-1	29,03	3,4
Transformados de Cobre-2	48,41	2,1
Refrescos-2	> 75	< 1,3

Tabla 3. Valores de EC<sub>50</sub> (en porcentaje de muestra) y toxicidad para todos los vertidos investigados.

Los datos aportados implican una diversa capacidad de respuesta del cultivo testigo frente a vertidos de diferente procedencia y de muy diversas características entre sí. Esta respuesta no indica necesariamente un distinto poder biotóxico genérico, sino sólo una más alta o más baja influencia de un efluente dado sobre el cultivo testigo, a las condiciones dadas del ensayo.

### Relación entre respuesta a la bioluminiscencia y carga contaminante

Cualquier ensayo de biotoxicidad debe tomarse con una serie de "precauciones" al respecto. En primer lugar, la respuesta de un organismo o cultivo vivo concreto no tiene que extrapolarse sin más a la potencia biotóxica de una sustancia o matriz dada: ésta debe salir de la consideración de una amplia serie de ensayos con diferentes organismos y cultivos.

En segundo lugar, una matriz compleja como puede ser un agua residual (y aún más un agua residual industrial) tiene tanta cantidad de sustancias químicas y biológicas en su seno que los efectos más o menos tóxicos de cada una de ellas pueden interaccionar entre sí mediante los conocidos fenómenos de antagonismo, sinergismo y aditividad (Marín Galvín, 2003) haciendo prácticamente imposible el dilucidar entre los efectos singulares de cada especie concreta.

En tercer lugar y por lo anterior, es muy importante que cuando se hable del comportamiento frente a la biotoxicidad de una sustancia en general, o de un vertido en particular, se indique claramente más que un resultado (que puede inducir a una interpretación erró-

nea) un valor dado frente al test de la bioluminiscencia (o frente al testigo que se emplee). Esto seguro que evitará problemas de definición y deducciones que tal vez no sean del todo correctas.

Dicho esto se puede intentar correlacionar la EC<sub>50</sub> de los vertidos investigados con parámetros convencionales de medida de la carga biodegradable de un agua residual, tales como son la DBO<sub>5</sub> y la DQO. Los resultados de algunas de estas relaciones se recogen en la figura 2. Las relaciones matemáticas entre EC<sub>50</sub> y DBO<sub>5</sub> y DQO, si bien mostraban tendencias, fueron poco significativas; no obstante, la relación matemática entre EC<sub>50</sub> y log DBO<sub>5</sub> sí ofreció una tendencia más clara en el sentido de que valores más altos de DBO<sub>5</sub> estaban asociados a valores más altos de EC<sub>50</sub>. Sin embargo, existió una apreciable dispersión de valores con un coeficiente de ajuste o regresión de 0,7083 que indicó un bajo peso estadístico (figura- 2. a).

Por su parte, cuando se efectuó la regresión entre valores de EC<sub>50</sub> y de DQO, también existió una asociación entre más altos valores de ésta y de EC<sub>50</sub>, pero ahora la dispersión de valores fue mucho más baja y el coeficiente de ajuste subió hasta un 0,9049, valor que sí indicaba un peso estadístico significativo (figura 2.b).

Asimismo, cuando se efectuaron correlaciones matemáticas entre valores de biotoxicidad expresada en equitox/m<sup>3</sup> y valores de DQO o DBO<sub>5</sub> (o sus log) de los vertidos investigados, el resultado era muy desfavorable con coeficientes de correlación poco significativos (<0,7) y ajustes deficientes tanto a regresiones lineales, como exponenciales, o incluso potenciales.

Dado que la DQO es una determinación que engloba, tanto carga fácilmente biodegradable (compuestos carbonados y nitrogenados, es decir, claramente orgánicos) como otra fracción más refractaria a la biodegradación e integrada por otras sustancias tanto orgánicas como especialmente inorgánicas, y con una previsible más alta capacidad de afección sobre organismos vivos, el resultado apuntado más arriba de que exista una correlación estadística entre respuesta a la bioluminiscencia y DQO parece bastante lógico: cuanto más alta es la carga contaminante de un vertido expresada como DQO, con más proporción de contaminación refractaria a su biodegradación, más alta será su influencia sobre el test de la bioluminiscencia, y por tanto, su biotoxicidad en este ensayo.

Por otra parte, todos los metales pesados, genéricamente, tienen potencia biotóxica. De los nueve vertidos industriales investigados existen tres con un contenido en metales pesados (tabla 2) apreciablemente más alto que la del resto. De estos tres casos estudiados el contenido en metales totales en la muestra de la papelera (unos 8,70 mg/l de metales totales mayoritarios, con 4,7 mg/l de boro) era sensiblemente superior al de las otras dos muestras (unos 4 mg/l).

De acuerdo a nuestros datos, el agua residual de la papelera resultó ser la más activa frente al test de bioluminiscencia (aunque con una EC<sub>50</sub> baja, de 4,1 equitox/m<sup>3</sup>) seguida de la muestra de transformados de cobre-1 (3,4 equitox/m<sup>3</sup> y 4,69 mg/l de metales) y transformados de cobre-2 (2,1 equitox/m<sup>3</sup> y 4,18 mg/l de metales). Esto indica, en principio y a falta de más estudios sobre el particular, que efectivamente un más alto contenido en metales podría llevar asociado un más alto poder biotóxico, si bien es cierto que aquí además habría que considerar la influencia de la DQO sobre la bioluminiscencia, sin poder distinguir entre los dos efectos.

Para clarificar más los resultados y conclusiones que se pueden extraer de este interesante tipo de estudios, se está desarrollando actualmente por parte de EMACSA una línea de investigación sobre respuesta al test de la bioluminiscencia de diferentes aguas residuales y efluentes industriales, así como sobre aguas naturales, como forma de evaluar, llegado el momento,

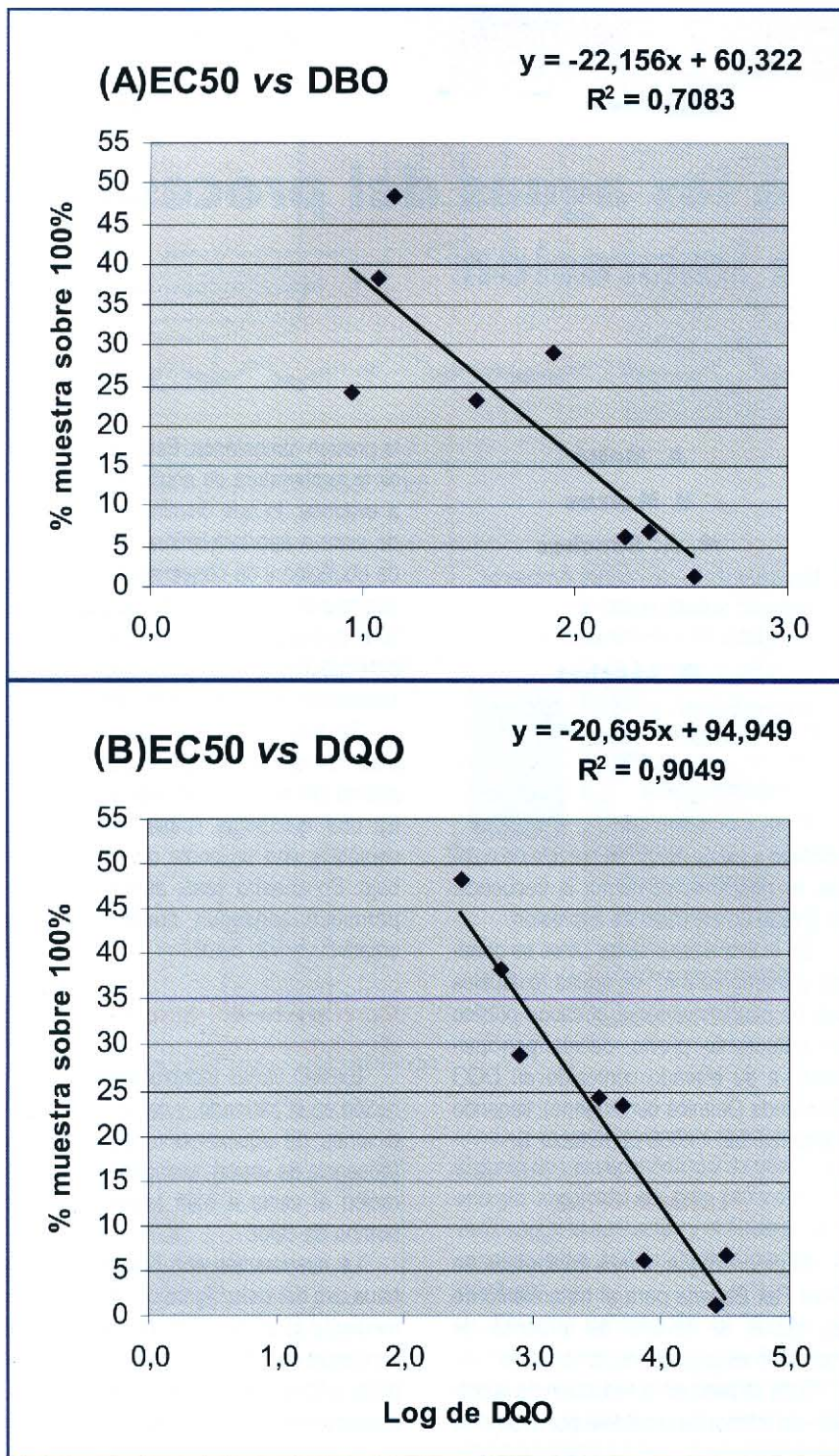


Figura 2. Correlaciones entre EC<sub>50</sub> (como porcentaje de muestra sobre 100%) y: (A) DBO<sub>5</sub> de los vertidos investigados (como log DBO<sub>5</sub>); (B) DQO (como log DQO).

qué se entiende por grado de toxicidad de un efluente.

### Conclusiones

La aplicación del test de la bioluminiscencia a varios efluentes industriales de la ciudad de Córdoba muestra un comportamiento diferente en función de su carga contaminante: se han medido

valores de EC<sub>50</sub> entre 79 y <1,3 eqitox/m<sup>3</sup> para los nueve vertidos estudiados. Sólo uno superó claramente los límites de EC<sub>50</sub> establecidos en nuestro país, y otro superó ligeramente el más restrictivo.

Se ha encontrado una correlación estadísticamente representativa entre valores de EC<sub>50</sub> (en porcentaje de muestra) y carga biodegradable expresada

sada como log del valor de DQO. Otros tipos de correlaciones ensayadas no han sido estadísticamente representativos ( $EC_{50}=f(\log DBO_5)$ , unidades toxicidad= $f(DQO, DBO_5, \dots)$ ).

Los valores obtenidos de toxicidad frente a la bioluminiscencia no califican por sí mismos de tóxico a un efluente: la toxicidad debe venir sustentada más bien por la conjugación de resultados obtenidos en varios tests de biotoxicidad y no sólo por el de la bioluminiscencia.

### Referencias bibliográficas

- AAWA. 1997. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 17ª ed. Washington.
- Capafons Ros, C.; Orús Lacort, M<sup>a</sup> A. y Tusell Ossourd, E. 2004. *Incidencia de la toxicidad en los vertidos industriales*. XXIV Jornadas Técnicas de AEAS, Actas-Tomo I (pp.185-199) Barcelona.
- Marín Galvín, R. 1995. *Análisis de Aguas y Ensayos de Tratamiento. Principios y Aplicaciones*. Ed. GEP-SA, Barcelona.
- Marín Galvín, R. 2003. *Fisicoquímica y Microbiología de los Medios Acuáticos. Tratamiento y Control de Calidad de Aguas*. Ed. Díaz de Santos, Madrid.
- Orús Lacort, M<sup>a</sup> A.; Capafons Ros, C.; Tusell Ossourd, E. y Mantecón, R. 2004. *Estudio comparativo de los límites de vertido en ordenanzas y reglamentos de aguas residuales*. Jornadas AEAS sobre Inspección, muestreo y límites de vertido en aguas residuales. Lugo.
- Rodier, J. 1989. *Análisis de Aguas*. Ed. Omega S.A. Barcelona.
- RD 849/1986, de 11-4-1986, BOE 103, de 30-4-1986, aprobando el Reglamento del Dominio Público Hidráulico.
- RD 995/2000, de 2-6-2000, BOE 147, de 20-6-2000, fijando objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes y modificando el Reglamento del Dominio Público Hidráulico.
- RD Legislativo 1/2001, de 20-7-2001, BOE 176, de 24-7-2001, aprobando el texto refundido de la Ley de Aguas.
- RD 606/2003, de 23-5-2003, BOE 135, de 6-6-2003, modificando el RD 849/1986 que aprobaba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico.