

**6. TOXICITAT AGUDA DELS EFLUENTS D'ADOBERIA**



## **6. TOXICITAT AGUDA DELS EFLUENTS D'ADOBERIA**

### **6.1. INTRODUCCIÓ**

Com més avança la tecnologia industrial, més complexes són les característiques dels efluent industrials i la seva toxicitat pot ser encara més complexa i elevada. Aquestes característiques poden influenciar en l'operativitat del tractament de les aigües residuals de què es disposa de tal manera que es poden superar els límits d'abocament (Chen *et al.*, 1998). I l'abocament deliberat o per accident de compostos químics en el mediambient pot trencar l'estructura i la funcionalitat de l'ecosistema receptor.

Normalment es fan servir paràmetres globals físics i químics per controlar els abocaments. Però els abocaments tenen una composició complexa perquè hi intervenen gran nombre i varietat de substàncies químiques que la majoria de vegades són desconegudes (Cronin *et al.*, 1991; Trevizo i Nirmakhalandan, 1999). En molts casos es pot trobar que no se superin els límits d'abocament, però que l'efluent presenti toxicitat (Sponza, 2002 i 2003).

La química no pot donar prou informació dels efectes que potencialment poden ocasionar uns productes químics alliberats al medi ambient. La caracterització dels efluent residuals industrials o mixtos, domèstics i industrials, no es pot fer adequadament en alguns casos usant exclusivament paràmetres químics i físics. De la mateixa manera, la toxicitat tampoc no pot explicar-se totalment usant informació física i química (Persoone, 2003).

Molts efluent són de naturalesa complexa (Vyryan *et al.*, 1999) i aquesta complexitat limita la valoració química completa per falta de tecnologia analítica. No es pot fer una aproximació a partir d'uns resultats químics generals i menys encara determinar els efectes tòxics d'una substància desconeguda i normalment indeterminada en una mescla complexa, sinó que s'han de realitzar una sèrie d'assaigs toxicològics (Persoone, 2003).

En resum, que tal com diuen en el seu treball Castillo *et al.* (2001) cap caracterització de les aigües residuals es pot basar només en anàlisis químiques, ja que no donen suficient informació sobre els riscos ecològics. En canvi, els resultats de les anàlisis químiques han de recolzar-se en mesures de la toxicitat.

### **6.1.1. Toxicologia, toxicitat i tòxic**

La toxicologia és l'estudi dels efectes adversos d'agents químics o físics en organismes vius (Shane, 1994). La toxicitat aquàtica és l'estudi dels efectes de la producció de compostos químics i altres materials antropogènics i naturals, i l'estudi d'activitats, en organismes aquàtics a diversos nivells d'organització, des del nivell subcel·lular passant per individus fins a comunitats i ecosistemes (Rand, Wells i McCarty, 1995).

Un tòxic o pol·luent es defineix com una substància que es troba en el mediambient com a resultat d'una descàrrega antropogènica i que té un efecte perjudicial en els organismes vius. Un contaminant, per altra banda, és un component relacionat amb les activitats de l'home i que no necessàriament té un efecte biològic perjudicial (Shane, 1994).

La determinació dels possibles efectes tòxics de productes o efluents potencialment pol·luents es realitza mitjançant els "assaigs de toxicitat" amb diferents espècies d'éssers vius, també anomenats "bioassaigs de toxicitat". Aquests assaigs són proves de laboratori realitzades amb l'objectiu d'establir experimentalment la dosi d'una mostra que causa un efecte biològic determinat (Ribó, 1999).

### **6.1.2. Tipus de bioassaigs de toxicitat**

La selecció d'un assaig per determinar la toxicitat està en funció de la informació que volem saber. Si fem un sol assaig només tindrem reflectida la sensibilitat de l'espècie utilitzada en l'assaig per a aquella substància, i es corre el risc de subestimar la toxicitat potencial d'aquella substància per a un determinat ecosistema en general (Rojickova, Marsalek, i Holoubek, 1998). Aquests autors que acabem de citar recomanen fer una bateria de bioassaigs per obtenir una representació de les diferents sensibilitats dels diversos organismes utilitzats.

Per estudiar la toxicitat de diferents compostos químics i efluents industrials i conèixer-ne els efectes al llarg de la cadena tròfica, és convenient fer assaigs amb diferents espècies pertanyents als tres grups bàsics de la cadena alimentària: els bacteris com a descomponedors, les algues com a productors, i els invertebrats i peixos com a consumidors (Rand, Wells i McCarty, 1995).

La toxicitat de qualsevol compost en el medi aquàtic s'estudia bàsicament a través de dos tipus de bioassaigs ben diferenciats: els tests de toxicitat aguda i els tests de toxicitat crònica i subcrònica.

### **6.1.3. Assaigs de toxicitat aguda**

L'objectiu dels assaigs de toxicitat aguda és determinar la concentració d'un compost químic o d'un efluent, o el nivell d'un agent físic o químic (temperatura o pH), que produeix un efecte advers agut (inhibició del creixement, immobilització, mortalitat, etc.) en un grup d'organismes després d'exposar-los durant un període de temps curt a diferents concentracions de l'agent tòxic (entre 24 i 96 hores) en condicions controlades (Carl V. Huber i Satyendra, 1990; Parrish, 1995).

El fet de provar dosis successives de l'agent tòxic i correlacionar-les amb l'efecte advers produït permet determinar la concentració de tòxic que inactiva o provoca la mort del 50 % del grup d'organismes de l'assaig, i així es defineix la  $CE_{50}$  (concentració efectiva 50), la  $CI_{50}$  (concentració inhibidòria 50) i la  $CL_{50}$  (concentració letal 50).

Els assaigs de toxicitat aguda són molt útils per a una primera valoració toxicològica (McHenry, 1995; Macek, 1995), però també calent assaigs complementaris de tipus crònic, de bioacumulació, genotoxicitat, etc. per entendre millor els efectes adversos més subtils dels efluents residuals sobre l'ecosistema on es descarreguen (Calow, 1993).

### **6.1.4. Toxicitat crònica i subletal**

L'objectiu dels assaigs de toxicitat crònica i subletal és avaluar els efectes adversos subtils en la vida o en el cicle biològic (canvis fisiològics, histopatològics o de comportament) que produeix un compost químic o un efluent, o el nivell d'un agent físic o químic (temperatura o pH), en un grup d'organismes després d'exposar-los durant un període llarg de temps a una concentració subletal d'aquest compost (Rand, Wells i McCarty, 1995).

L'estudi de la toxicitat s'estén des del nivell molecular fins al nivell d'ecosistema. Aquests estudis, en què es mesuren la toxicitat aguda i els efectes letals i subletals, detecten un ampli ventall d'efectes integrats de substàncies alliberades al medi ambient i utilitzades per diferents

nivells de la cadena alimentària com també per sistemes cel·lulars i subcel·lulars.

Molts països ja han inclòs els assaigs de toxicitat com a paràmetres per al control de qualitat de les aigües. Els assaigs més utilitzats són el de la puça d'aigua (*Daphnia magna*), el Microtox<sup>®</sup>, el Biosensor<sup>®</sup>, el Eclox<sup>®</sup> i el Toxalert<sup>®</sup>. No obstant això, es recomanen els assaigs de mortalitat bacteriana i de la inhibició del creixement algal per regular i controlar l'abocament de les aigües residuals (Sponza, 2002), pel baix cost tècnic i laboral que comporten i per la seva rapidesa. Tot i això, aquests assaigs tenen molt poca rellevància ecològica (Barata i Baird, 2000).

#### **6.1.5. Factors que influeixen en la toxicitat**

Hi ha molts factors que poden afectar els resultats obtinguts d'un test de toxicitat amb organismes aquàtics. Aquests factors poden ser característics de l'aigua utilitzada, del disseny experimental o dels trets biològics associats a l'espècie emprada per fer el bioassaig. Encara que s'estandarditzi el procediment d'assaig, hi ha una sèrie de variables externes que cal considerar a l'hora de fer proves i de comparar resultats (Cooney, 1995). Aquestes variables es poden dividir en dos factors:

a) els factors biòtics, com ara l'espècie, la població (Barata *et al.*, 2000), l'estadi de desenvolupament, la mida, la salut i el parasitisme, la nutrició i l'aclimatació, poden afectar els resultats de l'assaig, i

b) els factors ambientals com ara la temperatura, l'oxigen dissolt, la duresa de l'aigua, el pH i la salinitat poden influir en la toxicitat resultant. La toxicitat d'un compost està molt influenciada per les condicions mediambientals, com ara el pH, la temperatura, la duresa de l'aigua i la concentració d'oxigen dissolt. Aquestes variables han d'estar controlades al llarg de l'assaig, i per aconseguir-ho es treballa amb volums grans, d'uns 2 o 3 litres per gram d'animal (Abel, 1998).

#### **6.1.6. Relació entre concentració i resposta**

Generalment l'efecte tòxic es dona a concentracions altes d'una sola substància o a

concentracions baixes d'una barreja de substàncies (Castillo *et al.*, 2001). L'objectiu d'una prova toxicològica és estimar de la forma més precisa la concentració de la mostra que produeix una resposta quantificable en uns grups d'organismes de la mateixa espècie que es tenen sota unes condicions determinades al laboratori. Els resultats obtinguts es representen en un gràfic que relaciona el percentatge d'organismes que presenten la resposta enfront de la concentració de la mostra. La corba que s'obté és de tipus sigmoïdal, és a dir, que la resposta tendeix asimptòticament a la concentració de la mostra (Rand, Wells i McCarty, 1995).

Però els resultats dels tests de toxicitat aguda, que com ja s'ha definit es donen amb valors de  $CE_{50}$ ,  $CI_{50}$  i  $CL_{50}$ , es calculen per interpolació de la regressió matemàtica entre el logaritme de la concentració i el percentatge d'efecte advers. En fer el logaritme s'aconsegueix que la representació dels resultats sigui lineal. Això permet obtenir més fàcilment altres dades com ara els límits de confidencialitat, que ens diuen la precisió amb què s'ha fet l'assaig, i el pendent de la recta, que indica la sensibilitat al tòxic de l'organisme.

Una altra unitat de toxicitat molt utilitzada és la unitat de toxicitat (UT) pròpiament dita, definida per J. B. Sprague l'any 1965 (Sprague i Ramsay, 1965). La unitat de toxicitat es va definir com la concentració del producte químic en solució dividida per la  $CE_{50}$ . És a dir, que la UT és igual a 100 dividit per  $CE_{50}$  (%) (Tarkpea *et al* 1998).

En el nostre país, per gravar la toxicitat potencial dels abocaments o dels efluents industrials s'utilitza una unitat anomenada *equitox*, que correspon a la UT definida anteriorment ( $equitox = 100/CE_{50}$ ). El valor de la  $CE_{50}$  es determina mitjançant l'assaig dels bacteris luminescents o el d'inhibició de la mobilitat de *Daphnia magna* segons la legislació vigent. En concret, la tasa a pagar es calcula multiplicant la toxicitat de l'efluent expressada en *equitox* pel volum total d'abocament (en  $m^3$ ) (Ribó, 1999).

### **6.1.7. Legislació**

Per tot el món, la valoració dels abocaments de les aigües residuals o efluents es concentra en el principi de la precaució, és a dir, que s'aplica per sistema la reducció dels nivells de contaminants o substàncies específiques que es permet alliberar al medi ambient sense tenir en compte la toxicitat.

Però per altra banda, països com Holanda, des de 1995, el Regne Unit, des de 1996 i els Estats Units, des de molt abans, utilitzen els tests de toxicitat aguda per valorar els efluent industrial i limitar els abocaments. A Turquia ja al 1992 es va incloure una prova amb peixos com a únic test de toxicitat (Sponza, 2002 i 2003).

## **6.2. CONSERVACIÓ I TRACTAMENT DE LES MOSTRES**

Les mostres de tots els efluent es van recollir en recipients de vidre d'1 litre i es van guardar a 4 °C a la mateixa empresa fins al moment de transportar-les al laboratori. En arribar al laboratori, es va congelar a -20 °C una alíquota de 200 ml de cada mostra en tubs tapats de centrífuga de 50 ml de polipropilè, que aguanten 3.000 x g, fins al moment de realitzar l'assaig, quan la mostra es descongela deixant-la a temperatura ambient.

La quantitat de mostra necessària per fer l'assaig es filtra amb un filtre de fibra de vidre d'1 µm de porus i tot seguit amb una membrana de 0,45 µm. Els filtrats de les mostres han d'estar a un pH entre 6,5 i 8,0, i si no ho estan, s'ajusten amb hidròxid sòdic o àcid clorhídric. Tot i que se sabia que modificant el pH es poden modificar les característiques d'alguns compostos químics, es va fer la modificació, ja que és més interessant tenir la toxicitat dels efluent sense tenir en compte el pH que no pas tenir un valor de toxicitat que segurament és causat pel pH.

La toxicitat aguda de cada bany residual i de l'efluent residual homogeneïtzat i integrat es va determinar amb diferents espècies d'organismes seguint els mètodes estandarditzats per a cadascuna. En tots els mètodes es descriuen dues fases d'experimentació:

L'assaig preliminar. Per tal de determinar en quin interval es troben les concentracions de la mostra que presenten efecte tòxic es fa un assaig anomenat preliminar en què s'assagen dilucions de la mostra de diferents ordres de magnitud.

L'assaig definitiu. En aquesta fase es fan servir una sèrie de concentracions creixents de la mostra que es diferencien per un factor que dona la norma i estan definides per l'interval trobat en l'assaig preliminar. Mitjançant els resultats obtinguts dels assajos amb aquestes concentracions es podrà calcular la concentració inhibidora o letal que afecta el 50 % de la població. Hi ha un altre sistema establert per obtenir les sèries de concentracions a assajar, és el que s'anomena sèrie



geomètrica del 2 i el 3, que permet definir els nivells de dilució “G”, utilitzats per definir els valors límit d’abocament (Stuhlfauth, 1995).

### **6.3. ASSAIG DE LA INHIBICIÓ DE LA BIOLUMINESCÈNCIA BACTERIANA**

Aquest és un bioassaig bacterià que es basa en els canvis controlats de les emissions naturals de llum per part del bacteri marí luminescent *Vibrio fischeri* (soca “NRRL B-11177” registrada pel Northern Regional Research Laboratory, de Peoria, Illinois, EUA) també conegut com a *Photobacterium phosphoreum* (Ribó, Canela i Griful, 2000).

La luminescència depèn de la densitat de cèl·lules i del creixement actiu del bacteri, que sofreixen la inducció del sistema *lux* durant l’estat avançat del creixement exponencial. Aquest fenomen d’autoinducció s’atribueix a l’acumulació en el medi de cultiu d’un producte específic de la cèl·lula, el ((N-3-oxo-hexanoil)-L-homoserina lactona)(Fuqua, Winans i Greenberg, 1994). Per tant, la intensitat de llum emesa és una mesura de l’activitat metabòlica dels bacteris. Quan aquests organismes estan exposats a una mostra tòxica, l’emissió de llum disminueix de forma proporcional a la toxicitat de la mostra (Ribó, 1996). No obstant això, la bioluminescència només es dona en un cert estat fisiològic del bacteri i s’ha observat que alguns nutrients poden inhibir la bioluminescència en induir el creixement del bacteri (Stuhlfauth, 1995).

El procediment analític que se segueix és la norma AFNOR T90-320, detallada a l’annex 8 de material i mètodes. A causa del disseny del mètode, no es pot fer un assaig preliminar amb concentracions que es diferencien en un ordre de magnitud sinó que es van provant diferents intervals.

La toxicitat es mesura com la concentració efectiva de la mostra que causa una reducció del 50 % de la llum, normalment després de 15 minuts de temps de contacte. Es tracta que a partir de la mesura de la llum emesa i corregida pel factor de correcció obtingut amb un control ( $R_f$ ) (9) es calculi una funció de tipus gamma ( $\Gamma$ ).

$$R_f = I_{ct} / I_{co} \quad (9)$$

On:  $I_{ct}$  : llum que queda del control passat el temps t

$I_{co}$  : llum a temps 0 del control

Per cada prova es calcula el factor de correcció ja que amb el temps va disminuint l'emissió de llum per part dels bacteris. La funció gamma és el quocient entre la intensitat de llum perduda una vegada ha passat el temps d'exposició (disminució de la llum) i la intensitat de llum restant un cop passat el temps t, segons l'equació (10).

$$\text{gamma} (\Gamma) = ((R_f \cdot I_o) - I_t) / I_t \quad (10)$$

On:  $I_o$  : llum a temps 0 de la mostra

$I_t$  : llum a temps t de la mostra

La relació entre el logaritme de la funció gamma i el logaritme de la concentració de mostra és lineal. L'equació lineal permet estimar la concentració efectiva de la mostra que causa el 50 % de reducció de l'emissió de llum, que es dona quan la  $\Gamma = 1$  (Microbics Coporation, 1995a; Adzed, 1996; Ribó, 1996).

En els càlculs realitzats per obtenir l'equació de la recta, la recta i la  $CE_{50}$  de cada una de les mostres es va fer servir el programa informàtic Microtox<sup>®</sup> Software. De cada tipus de bany es van recollir dues mostres i de cada mostra es va fer una sola determinació de la  $CE_{50}$ . Paral·lelament es va fer una prova de reproductibilitat de l'assaig amb un patró de fenol, tal com es detalla a la **taula XLI** de l'annex 15.2 de resultats.

Si comparem el temps d'exposició que s'utilitza normalment en el test del Microtox amb el temps d'exposició d'altres tests es pot dir que és curt i que fa que s'obtingui una relació simple entre la toxicitat que expressa el *V. fischeri* i la que expressen altres espècies. Deneer *et al.* (1989), a més a més, recomanen limitar l'ús del test del *V. fischeri* per fer preescandalls, sobretot si s'estudia la toxicitat de productes químics purs.

Com que l'objectiu d'aquest estudi és fer un escandall dels banys residuals de l'adobament de pells i aquest assaig s'utilitza des de fa anys per mesurar la toxicitat d'efluents residuals, es va considerar idoni per conèixer la toxicitat dels banys, tot i que es tindran en consideració les

característiques de cada assaig a l'hora de treure les conclusions generals.

#### **6.4. DETERMINACIÓ DE LA INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT ALGAL**

L'objectiu de l'assaig és determinar els efectes d'una substància en el creixement d'una espècie d'alga verda unicel·lular. Es tracta d'exposar un cultiu d'alga en creixement exponencial a diverses concentracions de la substància que volem estudiar, durant diverses generacions i en condicions constants de temperatura i fotoperíode. La inhibició del creixement es determina amb relació al cultiu de control i permet determinar la  $CI_{50}$ .

Per fer l'assaig d'inhibició del creixement algal s'ha utilitzat com a guia la norma de l'OECD 201 (1984) i l'AFNOR T-90-304 (1980). Les espècies algals que normalment s'utilitzen són la *Scenedesmus subspicatus* i la *Chlorella vulgaris*. Aquestes espècies unicel·lulars són algues d'aigua dolça recomanades especialment per a aquest tipus d'estudis, ja que es caracteritzen per tenir un creixement ràpid.

L'espècie utilitzada en aquest estudi és l'alga *Scenedesmus subspicatus* CCAP 276/20, que és una de les recomanades per les normes. L'alga procedeix d'un cultiu de manteniment del Laboratori de Toxicologia Ambiental (INTEXTER), obtingut originàriament del Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (Cumbria, Regne Unit). Aquesta alga verda unicel·lular d'aigua dolça pertany a la classe de les clorofícies, ordre de les clorococccals, família de les *Scenedesmaceae*, i es caracteritza per presentar una paret cel·lular simple amb un únic cloroplast.

El cultiu mare de l'alga es va realitzar en sistemes de cultiu tancat en flascons erlenmeyer de 250 ml, en condicions estèrils i amb un volum de solució de 100 ml. Els flascons es van mantenir en una cambra amb un agitador orbital i amb una il·luminació contínua de 2.500 luxs. Passats de sis a vuit dies de creixement exponencial, s'obté la concentració aproximada de  $10^3$  cèl·lules/ml necessària per fer l'assaig de toxicitat, tal com recomana la norma. Aquesta concentració de cèl·lules es determina a partir de la relació entre l'absorbància a 665 nm i la concentració de cèl·lules per mil·lilitre establerta per Riva i Vallés (1990). L'absorbància s'ha mesurat amb un espectrofotòmetre Dr. Lange model Cadas 30 (LPG 927) (Berlín, Alemanya).

Per cada mostra de bany residual es va fer un assaig preliminar (vegeu-ne el procediment a

l'annex 9 de material i mètodes) per trobar l'interval (entre el 0,01 % i el 90 % d'una solució inicial) en què els percentatges d'inhibició del creixement van del 0 % al 100 %. A partir d'aquests resultats es va preparar l'assaig definitiu, que constava de diverses concentracions, de cada una de les quals es van fer fent dues rèpliques.

El creixement cel·lular és la diferència entre l'absorbància al final de l'assaig i l'absorbància a l'inici, tan per al control (11) com per a les mostres (12).

$$\text{Creix. cel. control} = D_c 72 \text{ h} - DO_c 0 \text{ h} \quad (11)$$

$$\text{Creix. cel. mostres} = DO_m 72 \text{ h} - DO_m 0 \text{ h} \quad (12)$$

El percentatge d'inhibició del creixement es calcula com la diferència relativa entre el creixement cel·lular del control i el de les mostres assajades (13).

$$\% = ((\text{Creix. cel. control} - \text{Creix. cel. mostres}) / \text{Creix. cel. control}) * 100 \quad (13)$$

I finalment, la  $CI_{50}$  es calcula a partir de l'equació de la regressió linealitzada entre el percentatge d'inhibició i el logaritme de la concentració de la mostra mitjançant el model lògic, que es descriu en l'apartat 6.7.

## **6.5. VALORACIÓ DE LA CITOTOXICITAT AMB CÈL·LULES DE PEIX**

Les proves de citotoxicitat *in vitro* consisteixen a estudiar l'efecte que produeix una substància sobre la viabilitat d'una línia cel·lular establerta derivada d'un teixit d'un animal superior. En aquest estudi s'ha utilitzat la línia cel·lular fibroblàstica RTG-2 derivada del teixit gonadal de la truita arc iris (*Oncorhynchus mykiss*)(detallada a l'annex 10)(Tarazona, Cebrian i Castaño, 1993). Aquest tipus de proves es poden utilitzar com a alternatives a l'ús d'animals en assaigs de toxicitat, amb una sèrie d'avantatges i desavantatges, segons Tarazona, Cebrian i Castaño (1993) i Riva i López (1993).

Els avantatges dels sistemes *in vitro* són els següents:

— Es controlen les condicions ambientals de l'assaig.

- S'eliminen els efectes sistemàtics interactius.
- Es redueix la variabilitat entre assajos.
- Es necessita poca quantitat de mostra.
- Normalment són més econòmics i ràpids.
- Es pot tractar un nombre més gran de mostres.
- Són més sensibles a causa del seu caràcter citològic.
- És possible detectar efectes a llarg termini.
- No es necessiten infraestructures de grans dimensions.
- Disminueix l'ús d'animals de laboratori.
- Disminueixen els residus contaminats amb el tòxic.

Els desavantatges dels sistemes *in vitro* són els següents:

- No és possible extrapolar els resultats als organismes.
- No es tenen en compte els efectes de biotransformació que es donen en un òrgan sencer o en un organisme, que poden donar com a resultat un subproducte amb una toxicitat diferent.
- Tampoc es tenen en compte els efectes de penetració, eliminació i excreció de la toxina en l'organisme.

Les cèl·lules es fan créixer en un medi de cultiu (que es descriu en l'annex 10 de material i mètodes) en flascons tapats hermèticament, a una temperatura de 20 °C i amb una atmosfera d'aire amb un 5 % de CO<sub>2</sub>.

Per iniciar l'assaig de toxicitat s'agafa un flascó de cultiu on les cèl·lules estan creixent exponencialment, es renten amb un tampó de fosfat salí (PBS) i es desenganxen amb una solució de tripsina-EDTA. Es compten les cèl·lules que hi ha i es calcula quant medi d'assaig es necessita per tenir una concentració aproximada de 15.000 a 20.000 cel/ml. En tubs es fa un banc de dilucions de la mostra amb el medi d'assaig. D'aquestes dissolucions s'inoculen 0,2 ml per pou, 8 pous per concentració, fins a un màxim dels 96 pous que tenen les microplaques que s'han utilitzat. Aquests pous són aquells en què dos dies abans s'havien posat les cèl·lules perquè s'hi fixessin i ara amb la mostra ja inoculada es posen a incubar durant 48 h (per a més detalls vegeu l'annex 10 de material i mètodes). En alguns pous no s'hi posa mostra i s'utilitzaran com a "blanc" en la valoració.

Després de l'exposició de les cèl·lules a la mostra es valoren dos paràmetres indicadors de la toxicitat. Per una banda es valora la viabilitat amb l'assaig del vermell neutre (Invitox 54, 1992) i per l'altra es valora l'adhesió cel·lular amb l'assaig de proteïnes amb blau de Kenacid (KBP) (Knox et al., 1986, Invitox 3b, 1992).

El vermell neutre (Fluka, Chemie, Switzerland) és un colorant que té la característica que només pot entrar dins del citoplasma de les cèl·lules a través dels lisosomes, on queda retingut, i així tenyeix les cèl·lules. Quan el tòxic ha malmès la cèl·lula, el sistema lisosòmic no funciona i les cèl·lules no es tenyeixen. El grau de coloració s'ha determinat per adsorció a 550 nm amb un espectrofotòmetre especial per a microplaques, model EL 312e de Bio-Tek Instruments (Winooski, EUA). A partir dels valors d'absorbància es calcula el percentatge de viabilitat.

El colorant blau de Coomassie (Fluka, Chemie, Switzerland) que s'utilitza per fer l'assaig KBP reacciona selectivament amb el grup amina dels aminoàcids de les proteïnes i permet valorar la quantitat de cèl·lules que han quedat enganxades als pous, i per tant, que estan vives. La viabilitat es mesura per espectrofotometria a 570 nm i es calcula el percentatge d'adhesió cel·lular.

Per calcular el resultat obtingut, primer es fa la mitjana dels blancs, i es resta de cada mostra el valor trobat. Es calcula la mitjana de les 8 rèpliques que s'han fet de cada concentració de mostra i la seva desviació estàndard, que no ha de ser superior a 10. La  $CE_{50}$  es calcula a partir de l'equació de la regressió lineal entre la viabilitat calculada i el logaritme de la concentració de la mostra.

## **6.6. ASSAIG DE TOXICITAT AGUDA AMB PEIXOS**

L'objectiu de l'assaig de toxicitat aguda amb peixos és determinar la concentració de mostra dissolta en aigua que mata el 50 % dels peixos exposats durant un període de 96 hores per poder calcular, així, la  $CL_{50}$ . En aquest estudi s'ha utilitzat el peix zebra (*Brachydanio rerio*), de la subclasse dels teleostis, família dels ciprínids, que és un dels recomanats per la norma experimental OECD 203 (1992) que s'ha seguit per fer l'assaig. Els peixos provinents de l'empresa que els subministra al laboratori es tenen en quarantena d'aclimatació fins al moment d'utilitzar-los.

Per a la determinació de toxicitat aguda amb peixos se segueix el mètode estàtic, que és un dels diversos procediments a què dóna opció la norma. Aquest mètode es basa en el fet que la peixera no té un flux d'entrada i sortida sinó que s'omple amb la dissolució de la mostra que s'està analitzant i es manté així fins al final de l'assaig. Per tant, es van preparar tantes peixeres com concentracions de les quals es volia determinar la toxicitat hi havia. Primer es van preparar les dilucions de la mostra. Es van omplir les peixeres i es va comprovar que l'aigua tenia les condicions òptimes per posar-hi finalment els peixos (vegeu l'annex 11).

Es va anotar la mortalitat a les 48 i 96 hores, la concentració màxima de mostra que no produeix mortalitat i la mínima que produeix la mortalitat de tots els peixos.

L'estimació de la  $CL_{50}$  es calcula pel mètode de màxima versemblança dels valors  $\alpha$  i  $\beta$  de l'equació de regressió entre el percentatge de morts i el logaritme de la concentració de la mostra, seguint el model lògit, igual que en altres assaigs de toxicitat. Quan els resultats obtinguts no permeten l'estimació de la  $CL_{50}$ , és a dir, quan en dues concentracions successives el resultat és de cap mort en la concentració alta i d'un 100 % de morts en la concentració baixa, es fa el següent càlcul aproximatiu. El valor de la  $CL_{50}$  es considera que és la mitjana geomètrica entre les dues concentracions. I s'expressen ambdós casos com a percentatges de dilució de la mostra (volum/volum) (OECD 203, 1992). La poca quantitat de concentracions assajades per mostra no ha permès calcular amb el programa informàtic d'estadística SPSS (Norussis, 1999) l'interval de confiança per a cap de les mostres.

## **6.7. ESTADÍSTICA APLICADA A L'ESTUDI TOXICOLÒGIC DE LES AIGÜES RESIDUALS DE L'ADOBATGE DE PELLIS**

Existeixen diversos models matemàtics per expressar la relació no lineal que hi ha entre la proporció d'organismes que responen a un o més estímuls i la seva dosi. Amb aquests models, com per exemple el model pròbit, el lògit o l' Spearman-Karber, entre d'altres, s'aconsegueix transformar la relació de la dosi amb el percentatge d'afectats en una relació lineal. Aquests models es poden fer servir per estimar els paràmetres i després calcular la  $LC_{50}$  pel mètode d'estimació per màxima versemblança o pel d'estimació per mínims quadrats

(Canela *et al.*, 1998).

En aquest estudi, per calcular l'estimació de la LC<sub>50</sub> (CE<sub>50</sub> o CI<sub>50</sub>) s'ha escollit el model lògit i l'estimació dels paràmetres del model s'ha fet pel mètode de màxima versemblança que és la que fan la majoria de programes informàtics (Ellersieck i La Point, 1995). Segons Canela *et al.* (1998), les diferències entre els models lògit i pròbit són irrellevants i ells recomanen el model lògit.

En aquest model es designa com a  $p$  la probabilitat que es doni una determinada resposta en una proporció d'individus; aquesta  $p$  és funció d'una variable d'expressió  $x$  (logaritme de la concentració). En el model lògit la relació entre  $p$  i  $x$  ve donada per: lògit ( $p$ ) =  $\alpha + \beta x$ , on la funció lògit és: lògit ( $p$ ) =  $\log (p/1-p)$ . S'anomena concentració efectiva mitjana, CE<sub>50</sub> (CI<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub>), quan  $p = 0,5$ ;  $x = \log (CE_{50})$ ; i per tant  $CE_{50} = \exp (-\alpha/\beta)$  (Agresti, 1996).

La comparació de les CE<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>/CL<sub>50</sub> o UT de cada una de les espècies pot ser suficient per a valorar les toxicitats de cada bany residual i cada tipus de pell (Cooney, 1995; Ellersieck i La Point, 1995; Rand, Wells i McCarty, 1995).

Després de plantejar l'estudi toxicològic, de dissenyar la recollida de les mostres i fer els diversos assaigs, es va fer una anàlisi exploratòria de les dades obtingudes de cada mostra mitjançant diagrames bivariants i el càlcul del coeficient de correlació lineal. Aquesta anàlisi va permetre detectar errors, tendències i la relació existent entre les variables, en aquest cas entre el logaritme de la concentració de la mostra i el corresponent percentatge d'inhibició o viabilitat.

Per analitzar i comparar la toxicitat dels diferents banys residuals i l'efecte sobre cada espècie en cadascun dels banys es van fer representacions gràfiques entre els valors del logaritme de la CE<sub>50</sub> de cada tipus de pell per als diferents banys residuals.

I finalment queda per estudiar el grau d'associació trobat entre els diferents assaigs de toxicitat per a aigües residuals d'adoberia mitjançant l'anàlisi no paramètrica de correlació per rangs de Spearman entre els diferents assaigs de toxicitat. Quan les dades no es distribueixen normalment, o hi ha valors extrems, o el nombre de valors és petit, generalment no és apropiat calcular el



coeficient de correlació estàndard o de Pearson, sinó que és millor fer l'anàlisi no paramètrica de Spearman. Aquesta anàlisi es basa en la conversió dels valors de toxicitat de cada parella d'assaigs de toxicitat en rangs, i en el càlcul del coeficient de correlació, com ara la suma dels quadrats de les diferències entre rangs (Morin i Findlay, 2002). Els coeficients s'han calculat a partir dels valors de toxicitat en UT o logaritme d'UT, segons la tendència o regressió que s'adaptava millor a cada cas a l'hora de representar-los gràficament.

## **6.8. RESULTATS I DISCUSSIÓ DE LA TOXICITAT AGUDA EN EL PROCÉS D'ADOBATGE DE PELLS**

Tal com dedueixen Aruldoss i Viraraghavan (1998), els paràmetres fisicoquímics convencionals que s'analitzen d'una aigua residual, com ara la DQO, la DBO, els sòlids en suspensió, no reflecteixen la naturalesa tòxica d'aquella aigua. Les anàlisis químiques per si soles no donen prou informació per valorar el risc ambiental d'unes aigües residuals contaminants. Per complementar les anàlisis químiques i tenir una visió de la toxicitat de les aigües de procés s'han fet una sèrie d'assaigs de toxicitat aguda per determinar la toxicitat de mostres puntuals dels banys residuals de l'adob de pells ovines.

L'avantatge dels assaigs de toxicitat aguda és que la toxicitat d'una aigua residual, per exemple, pot ser quantificada i comparada amb la d'altres aigües o substàncies. D'aquesta manera es troba el potencial tòxic dels efluent residual tenint en compte la biodisponibilitat i els efectes sinèrgics o antagònics. Encara que un assaig fet amb un sol organisme no pot ser representatiu d'un ecosistema, sí que podem valorar la toxicitat ambiental amb un sistema basat en quatre bioassaigs amb espècies diferents que representin els quatre nivells tròfics d'un ecosistema: productors, consumidors primaris i secundaris i descomponedors (Stuhlfauth, 1995; Castillo i Barceló, 1999).

En aquest estudi toxicològic dels efluent residual de l'adobament de pell ovina s'ha valorat la toxicitat amb 4 espècies diferents, que només representen 3 nivells tròfics: el de productors, el de consumidors secundaris i el de descomponedors. Falta el nivell de consumidor primari, representat per les dàfnies (*Daphnia spp.*), perquè amb els mitjans que es tenien no es podia fer l'assaig de toxicitat aguda amb aquest crustaci.

Per problemes d'interferències en les lectures espectromètriques produïdes per la presència de matèries en suspensió en alguns assaigs, es va optar per filtrar les mostres i determinar només la toxicitat dels contaminants dissolts. D'aquesta manera es tenen resultats de la toxicitat total i de la soluble dels diferents banys residuals del procés d'adobament per a diferents organismes.

Els efectes tòxics dels efluent residuals d'adoberia sobre organismes han estat objecte de diversos treballs: Thangapandian, Sophia i Swaminathan (1995) han estudiat l'efecte sobre el meristema radical; Jeyachandran i Chockalingam (1987), sobre la respiració d'un peix; Gupta (1987), també sobre dos peixos; Gargiulo (1995), sobre protozous; Fiehn *et al.* (1997), sobre bacteris luminescents; Tisler i Zagorc-Koncan (1999), Cotman i Zagorc-Koncan (2001) i Yatribi i Nejmeddine (2000), sobre dàfnies, i Reemtsma, Putschew i Jekel (1999), també sobre bacteris luminescents. En general, els resultats dels assaigs de toxicitat aguda que presenten tots aquests estudis indiquen que els efluent de l'adob de les pells tenen una toxicitat elevada.

Els resultats de l'anàlisi de les mostres dels efluent residuals de l'adoberia de referència reflecteixen el mateix, però l'estudi detallat de cada bany residual permet discernir l'origen d'aquesta toxicitat, així al final es pot tenir representada tota la variabilitat que es dona en un procés d'adob de les pells ovines tenint en compte el tipus de pell processada i es poden classificar els banys en funció de la seva toxicitat aguda.

Els resultats dels assaigs toxicològics es presenten a les **figures 6, 7, 8 i 9**, i els seus valors es detallen a les **taules XL, XLII, XLIII i XLIV** de l'annex 15. En aquestes taules s'indica el número de lot de la pell per cada bany residual, el temps d'exposició, el percentatge de dilució utilitzat per fer els assaigs definitius, el percentatge d'inhibició, els valors estimats dels paràmetres  $\alpha$  i  $\beta$  i les  $CE_{50}$  o  $CI_{50}$  amb els corresponents intervals de confiança. Aquests resultats van permetre calcular les unitats de toxicitat (UT) als 15 minuts amb *V. fischeri*, les UT a les 72 hores amb *S. subspicatus*, les UT a les 48 hores amb cèl·lules RTG-2 i les UT a les 96 hores amb *B. rerio*, amb els corresponents intervals de confiança per a les mostres dels efluent residuals del procés d'adob de pells ovines. Aquests valors es presenten a la **taula XII** i han permès comparar els valors de toxicitat dels diferents banys per a cada tipus de pell.

**Taula XII.** Assaigs de toxicitat aguda dels banys residuals filtrats a 0,45µm, excepte el de peixos (\*), amb especificació de les unitats de toxicitat (UT), els temps d'exposició, els intervals de confiança amb una probabilitat del 0,05 i les mostres que no es van poder analitzar per interferències amb el mètode d'anàlisi (interf.). Es distingeix en l'assaig de citotoxicitat entre la determinació amb el mètode del vermell neutre (VN) i la determinació amb el mètode de l'adhesió cel·lular (AC).

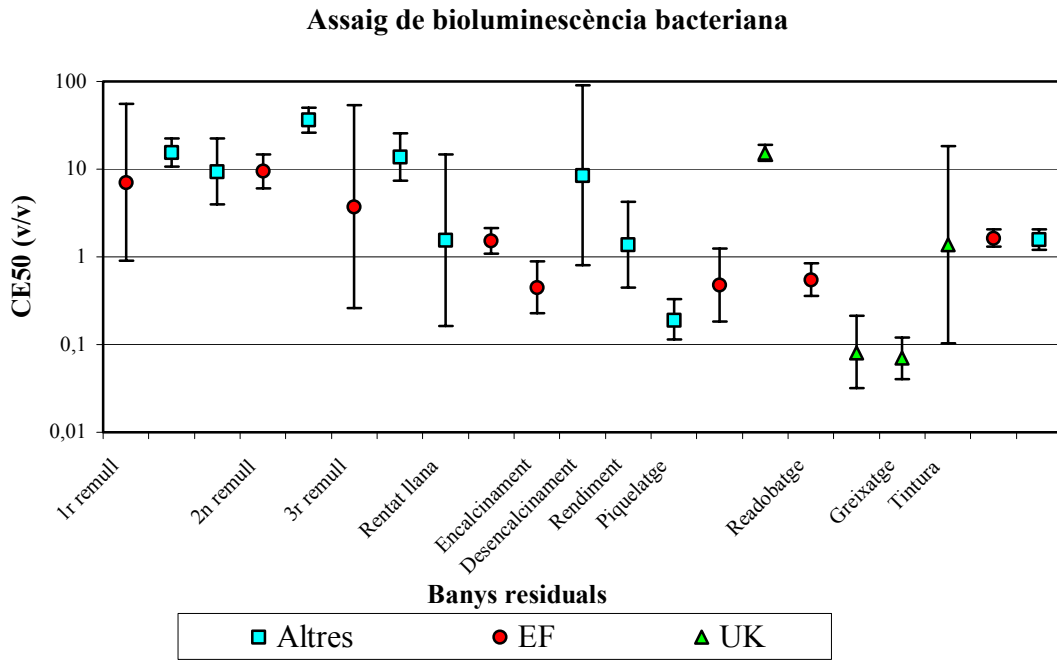
Bany residual i n. de lot	Assaig de toxicitat aguda						
	Inhibició de la bioluminèsència ( <i>V. fischeri</i> )		Inhibició del creixement algal ( <i>S. subspicatus</i> )		Citotoxicitat amb cèl·lules de peix (RTG-2)		Tox.* peixos <i>B. rerio</i>
	UT 15 minuts	Intervals de confiança 95%	UT 72 hores	Intervals de confiança 95%	UT Test VN 48 hores	UT Test AC 48 hores	UT 96 hores
<b>1r remull</b>							
Lot 37987	6,50	4,49 - 9,42			3,92		11,79
Lot 38032	10,61	4,46 - 25,23					
Lot 35000	14,21	1,81 - 111,4	< 1,25	-	4,98	5,59	
Lot 35040					5,06	1,64	
Lot 20017					5,91		
Lot 30066			2,242	-			
<b>2n remull</b>							
Lot 37987	2,76	2,00 - 3,81					5,77
Lot 35000	10,60	6,80 - 16,53	< 1,25	-	1,96		
Lot 30066			< 1,25	-			
<b>3r remull</b>							
Lot 37987	7,26	3,89 - 13,57			4,45		7,52
Lot 35000	26,81	1,88 - 381,7	< 1,25	-	9,47		
Lot 30066			< 1,25	-			
<b>1r rentat de la llana</b>							
Lot 15985	66,23	47,11 - 92,5			3,57		8,53
Lot 18047	64,94	6,85 - 613,5	136,01	219,86-83,37	1,69	1,48	

Continuació de la Taula XII

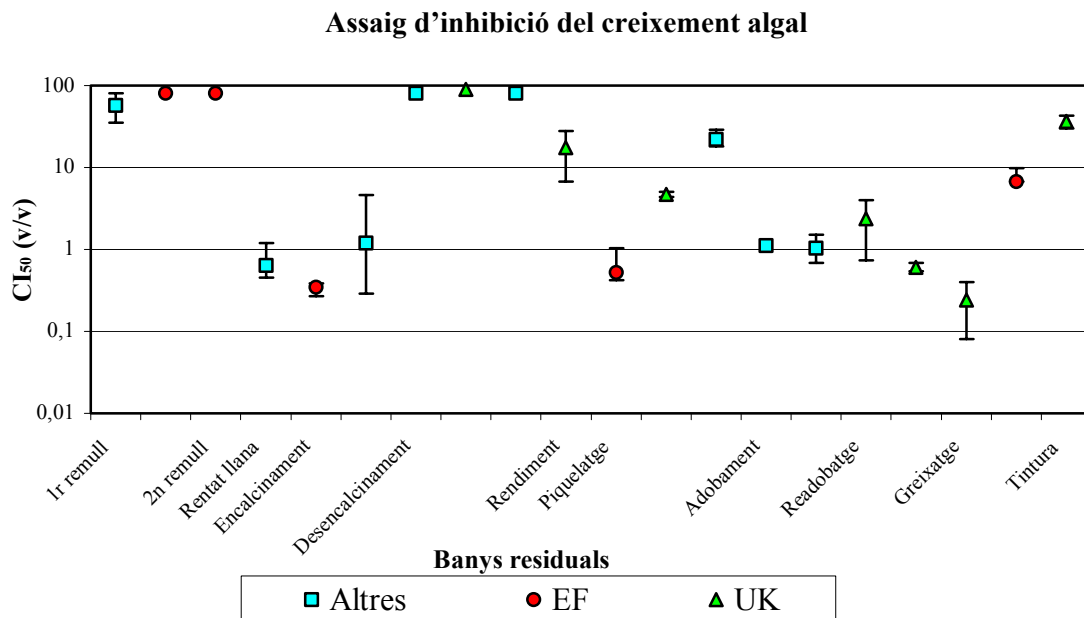
Bany residual i n. de lot	Assaig de toxicitat aguda						
	Inhibició de la bioluminescència ( <i>V. fischeri</i> )		Inhibició del creixement algal ( <i>S. subspicatus</i> )		Citotoxicitat amb cèl·lules de peix (RTG-2)		Tox.* peixos <i>B. rerio</i>
	UT 15 minuts	Intervals de confiança 95%	UT 72 hores	Intervals de confiança 95%	UT Test VN 48 hores	UT Test AC 48 hores	UT 96 hores
<b>Encalcin.</b>							
Lot 15004			131,76	343,0-21,783	7,86		52,36
Lot 35045	222,22	112,2-435,5	311,82	373,4 - 261,5	19,35	20,54	181,82
<b>Desencalc.</b>							
Lot 92984	11,74	1,1 - 124,69			< 1,16	< 1,25	
Lot 81982			< 1,25				
Lot 15977			< 1,25		< 1,25		24,25
Lot 92056			< 1,25				
<b>Rendiment</b>							
Lot 13066	72,99	23,75-223,2					
Lot 15977			6,49	14,86 - 4,057	1,76		149,25
<b>Piquelatge</b>							
Lot 81982			4,53	5,55 - 3,47			
Lot 35052			155,45	238,3 - 95,94			523,56
Lot 15977	6,54	5,29 - 8,10	21,19	22,68 - 19,85	5,181		10,54
Lot 35043	208,33	80,39 - 547,0			14,45		57,80
Lot 18048	526,32	301,4 - 878,7					225,23
Lot 20017					27,38		
<b>Desgreix.</b>							
Lot 15389	2.116,4	1.949 - 2.293			601,721	586,44	3.162,2
Lot 13064			399,74	-			
<b>Adobam.</b>							
Lot 77978			97,13	146,7 - 65,93	Interf.		
Lot 13064			90,74	100,7 - 81,73	Interf.		

Continuació de la Taula XII

Bany residual i n. de lot	Assaig de toxicitat aguda						
	Inhibició de la bioluminescència ( <i>V. fischeri</i> )		Inhibició del creixement algal ( <i>S. subspicatus</i> )		Citotoxicitat amb cèl·lules de peix (RTG-2)		Tox.* peixos <i>B. rerio</i>
	UT 15 minuts	Intervals de confiança 95%	UT 72 hores	Intervals de confiança 95%	UT Test VN 48 hores	UT Test AC 48 hores	UT 96 hores
<b>Readob.</b>							
Lot 35041	181,82	118,0 - 280,3			Interf.		57,80
Lot 15390	1.250,0	469,3 - 121,0	165,96	185,9 - 150,1	Interf.		185,19
Lot 15345			26,409	135,2 - 5,248			
<b>Greixatge</b>							
Lot 15313	1.432,6	828,3-2.476,5			Interf.		
Lot 15404			459,98	1.238 - 198,6	Interf.		
Lot 35288			12,57	14,97 - 10,14	Interf.		1,85
<b>Tintura</b>							
Lot 15001	72,20	5,44 - 961,54	2,70	3,326 - 2,150			9,30
Lot 35288	61,05	48,64 - 76,57					49,36
Lot 92206	63,29	82,44 - 48,45					23,09
Lot 92019					11,31		49,36
<b>Bassa h. a.</b>							
7/12/01	< 2,22		< 1,25		< 1,176		3,6
<b>T. fisicoq.</b>							
7/12/01	2,50		< 1,25		< 1,167		2,83
<b>T. biològic</b>							
7/12/01	< 2,22		< 1,25		< 1,176		3,6



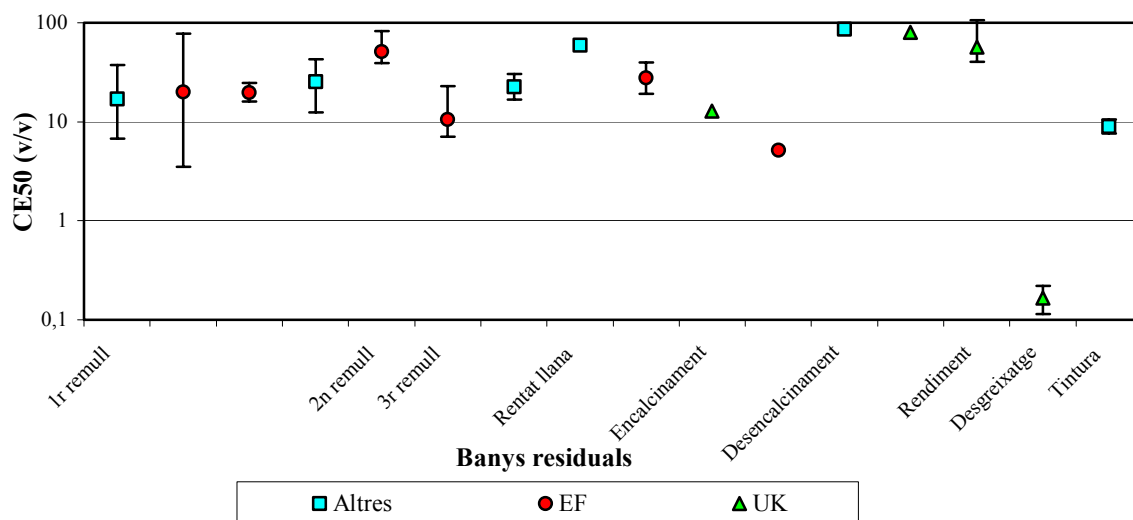
**Figura 6.** Representació gràfica semilogarítmica dels valors de la  $CE_{50}$  (v/v) obtinguda amb l'assaig Microtox<sup>®</sup> per als diferents banys residuals del procés d'adob de pells i els corresponents intervals de confiança del 95 %. Comparació entre els tres tipus de pell: corder anglès (UK), corder entrefi espanyol (EF) i pells de diversos orígens diferents als anteriors (Altres).



**Figura 7.** Representació gràfica semilogarítmica dels valors de  $CI_{50}$  (v/v) de l'assaig de toxicitat aguda amb una alga per als diferents banys residuals del procés d'adobament, amb els

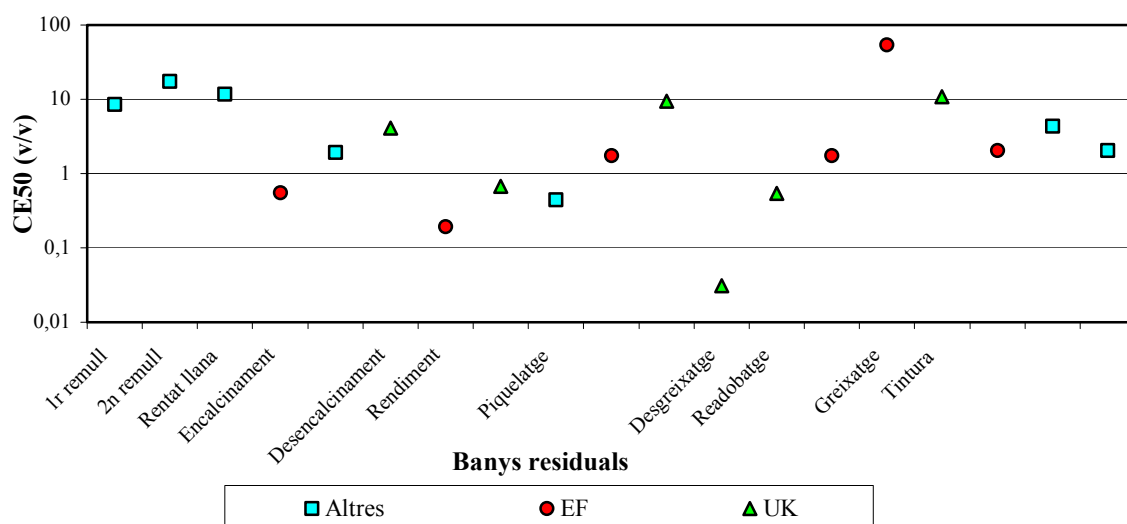
corresponents intervals de confiança del 95 %. Comparació entre els tres tipus de pell: corder anglès (UK), corder entrefí espanyol (EF) i pells de diversos orígens diferents als anteriors (Altres).

**Assaig de toxicitat aguda amb cèl·lules *in vitro***



**Figura 8.** Representació gràfica semilogarítmica dels valors de  $CI_{50}$  de l'assaig de toxicitat aguda amb cèl·lules de peix *in vitro* per als diferents banys residuals del procés d'adobament, amb els corresponents intervals de confiança del 95 %. Comparació entre els tres tipus de pell: corder anglès (UK), corder entrefí espanyol (EF) i pells de diversos orígens diferents als anteriors (Altres).

**Assaig de toxicitat aguda amb *B. rerio***



**Figura 9.** Representació gràfica semilogarítmica dels valors de  $CL_{50}$  de l'assaig de toxicitat aguda amb un peix per als diferents banys residuals del procés d'adobament. Comparació entre els tres tipus de pell: corder anglès (UK), corder entrefí espanyol (EF) i pells de diversos orígens diferents als anteriors (Altres).

Dins dels banys residuals de remull els resultats obtinguts indiquen que el tercer dels remulls és el més tòxic, possiblement a causa de la utilització d'un preparat químic a base de tensioactius aniónics i no iònics amb biocida, que en el primer i el segon dels remulls no es fan servir. També destaca el fet que el remull de les pells del tipus entrefí (lots 35 \_\_) dóna més toxicitat que els altres tipus. I es pot afirmar que l'assaig del Microtox<sup>®</sup> és el més sensible ja que dóna una toxicitat més gran, al contrari del que s'obté amb l'assaig de l'alga en què la toxicitat de les mostres per a l'alga és molt petita.

Encara que es van recollir i analitzar poques mostres del bany residual del primer rentat de dessulfuració de la llana, els resultats obtinguts indiquen que aquest bany residual neutralitzat és molt tòxic per a l'alga. Ho és menys per als bacteris bioluminescents i produeix molt poca toxicitat a les cèl·lules cultivades *in vitro*. Entre els dos tipus de pell estudiats hi ha unes diferències molt petites.

En un estudi sobre la toxicitat dels efluent del procés de rentat de la llana realitzat per Riva, Cegarra i Crespi (1993) es va trobar que el primer rentat, que només es fa amb aigua, és el més tòxic. Van obtenir valors al voltant del 0,1 (%) de  $CE_{50}$  a les 72 hores i a més a més l'alga va resultar ser la més sensible, com en el cas que s'està estudiant, fins i tot per sobre de la *Daphnia magna*.

En el bany residual del procés d'encalçament els resultats segueixen la mateixa tendència que en el bany del primer rentat de dessulfuració de la llana. La toxicitat més gran es troba en l'assaig de l'alga, i possiblement la podem atribuir en la seva major part al sulfur residual present en la mostra.

El desencalçament és un bany amb poca toxicitat si es miren els resultats de l'assaig de les cèl·lules i l'alga. En destaca la toxicitat en peixos, que aquí no es pot atribuir al sulfur, per la seva poca quantitat, sinó al producte auxiliar utilitzat, que és del tipus àcid sulfònic aromàtic.

Encara que els resultats del bany residual del procés de piquelatge ens indiquen que és un dels



banys amb uns resultats més variables, es pot afirmar que el test de toxicitat amb bacteris és el més sensible i el de les cèl·lules és el menys sensible. Possiblement aquesta toxicitat és deguda al conservant i a l'àcid fòrmic que s'utilitzen en el procés de piquelatge.

Els resultats de la toxicitat en els banys residuals de desgreixatge són dels més alts, possiblement a causa de la presència de tensioactius i principalment dels greixos extrets de la pell. El valor de toxicitat determinat amb el Microtox és molt superior al determinat amb l'assaig de citotoxicitat.

L'assaig del Microtox<sup>®</sup> és el que dona més toxicitat en els banys residuals dels processos d'adobament, readobatge i greixatge. Les interferències que ocasionen determinats components presents en els banys residuals d'adobament, readobatge i greixatge han impedit obtenir uns resultats de toxicitat fiables en l'assaig de cèl·lules RTG-2. Se suposava que el crom present en les mostres d'adobat i readobatge precipitava formant uns sòlids adherits a les parets i colorats com si fossin cèl·lules adherides, però en realitat al microscopi es veia que no ho eren. I de fet les cèl·lules s'havien mort i eliminat amb el rentat. En el bany del greixatge passa el mateix, quan es modifica el pH del bany apareixen uns precipitats que es tenyeixen i produeixen interferències en les lectures espectrofotomètriques de les mostres.

En funció del tipus de pell i, per tant, del procés seguit en l'adobament, el readobatge i el greixatge de cada tipus de pell, queda confirmat que la pell de tipus corder anglès (lot 35 \_\_) dona un efluent molt més tòxic que la de l'entrefí (lot 15 \_\_).

I finalment cal destacar que dels resultats obtinguts en els assaigs de toxicitat per al bany residual de la tintura, l'assaig amb bacteris està molt per sobre dels altres. I que entre els diferents tipus de pell no hi ha gairebé diferències, tots són igual de tòxics.

En termes generals, en les **figures 6, 7, 8 i 9** es diferencien els diversos tipus de pell analitzats per a cada bany residual per a cada tipus d'assaig de toxicitat i s'indiquen els corresponents intervals de confiança del 95 %. La conclusió és que per a l'assaig de bioluminescència, tal com es pot observar en la **figura 6**, per a la pell del tipus corder anglès resulta en la majoria de banys analitzats un valor petit de CE<sub>50</sub>, cosa que significa que dona banys residuals més tòxics que el corder entrefí, i que aquests donen banys més tòxics que la resta de tipus de pells, agrupats sota el nom d'"altres". La gràfica semilogarítmica presentada en la **figura 7** permet comparar els valors de CI<sub>50</sub> de l'assaig de toxicitat algal enfront dels diferents banys residuals del procés d'adob i

afirmar que per a cada bany residual el comportament dels diversos tipus de pell és similar.

Quan es comparen els valors de  $CE_{50}$  de l'assaig amb cèl·lules *in vitro* per als diferents tipus de pell adobada dins de cada bany residual (**figura 8**) la conclusió és que no hi ha diferències significatives. En canvi es pot considerar que hi ha diferències entre els diversos tipus de pells, encara que no s'han pogut determinar els corresponents intervals de confiança per a cada  $CI_{50}$ , entre els valors de  $CI_{50}$  obtinguts amb el test de toxicitat aguda amb peix per als diferents tipus de pell (**figura 9**).

Un tema a part és la toxicitat de les aigües residuals filtrades globals abans i després de ser tractades. La toxicitat és tan petita que està per sota del límit de quantificació dels assaigs realitzats. Tot i que alguna excepció permet intuir que es produeix un increment de la toxicitat després del tractament de coagulació química i decantació, possiblement a causa dels reactius utilitzats en aquest tractament. Hao *et al.* (1996) diuen que l'impacte del procés de coagulació en els resultats de la toxicitat mesurada amb el Microtox<sup>®</sup> és significatiu en molts casos. No ens ha d'estranyar, ja que polímers d'alt pes molecular utilitzats en la coagulació floculació de tipus catiónic són tòxics per als organismes aquàtics, com demostren Fort i Stover (1995) en el seu treball realitzat amb la *Ceriodaphnia dubia*. Carl V. Huber i Satyendra (1990), estudiant les aigües residuals d'adoberia, van arribar a la conclusió que la toxicitat que tenim es troba en la fracció soluble i no es pot separar per mètodes tradicionals de coagulació i floculació perquè és apolar. Per tant, valorant la toxicitat de la fracció soluble dels efluent residuals s'està valorant la major part de la toxicitat.

Encara que no es pot confirmar amb els resultats d'aquest escandall, s'intueix que la toxicitat després del tractament biològic disminueix, tal com era d'esperar. Tot i això, els resultats obtinguts donen una toxicitat molt inferior a la d'altres estudis i adoberies. Per exemple, Godé (2001) descriu una sèrie de característiques, entre les quals hi ha la toxicitat, que es poden considerar representatives dels efluent que generen les adoberies. Aquests efluent poden presentar valors de toxicitat elevats, segons els assaigs de matèries inhibidores, amb valors variables però que poden anar de 200 mg/l a 10 mg/l (que és igual a 5 UT i 100 UT). En canvi, en l'adoberia de referència s'han trobat valors de fins a 450 mg/l (< 2,2 UT) en l'assaig amb bacteris bioluminescents.



Per Reemtsma i Jekel (1997), l'aigua residual d'adoberia sense tractar té una toxicitat de més de 5 ml/l de CE<sub>50</sub> expressada en volum (que és igual a una CE<sub>50</sub> = 0,5 % i igual a 200 UT) i una vegada tractada amb uns processos biològics la CE<sub>50</sub> en volum és de 397 ml/l (que és igual a una CE<sub>50</sub> = 39,7 % i igual a 2,51 UT). En canvi, per Liu *et al.* (2002) l'aigua d'adoberia tractada té valors d'1,1 UT i 1,5 UT . I Hao *et al.* (1996) van obtenir valors < 1. Però els resultats menys tòxics d'una aigua residual d'adoberia sense tractar els han trobat Manusadžianas *et al.* (2003), donant valors de 0,6 UT i 0,8 UT de dues empreses d'adobatge diferents.

Com a resum, es pot dir que cada adoberia segueix uns processos i consumeix uns volums d'aigua i uns productes auxiliars diferents de les altres adoberies. El resultat és una gran varietat d'aigües residuals amb unes característiques toxicològiques diferents. Destaca el fet que l'adoberia de referència té uns valors més alts que els descrits per altres autors.

## **6.9. ESTUDI DE LA SENSIBILITAT DELS ASSAIGS DE TOXICITAT AGUDA**

Dins del món de la predicció dels riscos ambientals s'utilitzen una sèrie d'assaigs de toxicitat aguda, la majoria estandarditzats, amb poca rellevància ecològica però que són ràpids de fer a un cost baix. No tots aquests assaigs presenten la mateixa sensibilitat toxicològica. Per a substàncies i efluent residuals, es considera que l'assaig de toxicitat aguda amb *Daphnia magna* és l'assaig que presenta més sensibilitat.

Per comparar la sensibilitat dels diferents assaigs de toxicitat aguda per als efluent residuals de l'adob de pell s'ha calculat un índex de sensibilitat a partir dels resultats dels tres bioassaigs realitzats en les mateixes condicions. Aquest índex es basa en la prova de Kruskal-Wallis (Miller i Miller, 1993) per comparar mitjanes de tres més mostres o més, tal com queda recollit a la **taula XIII**.

**Taula XIII.** Valoració de la sensibilitat de tres assaigs de toxicitat aguda amb espècies diferents per als diversos banys residuals de l'adob de les pells mitjançant la prova de Kruskal-Wallis.

Bany residual	Assaig de toxicitat		
	Inhibició de la bioluminescència ( <i>V. fischeri</i> )	Inhibició del creixement algal ( <i>S. subspicatus</i> )	Citotoxicitat amb cèl·lules de peix (RTG-2)
1r remull	3	1	2
2n remull	3	1	2
3r remull	3	1	2
Rentat de la llana	2	3	1
Encalcinament	2	3	1
Rendiment	3	2	1
Piquelatge	2	3	1
Tintura	3	2	1
<b>Suma</b>	<b>21</b>	<b>16</b>	<b>11</b>

El resultat d'aquesta prova per als banys residuals d'adob de pells ens indica que l'assaig del Microtox® és el test de toxicitat que dona més sensibilitat dels tres, seguit de l'assaig amb l'alga *i*, finalment, l'assaig de citotoxicitat. Per tant, es pot afirmar que l'assaig amb bacteris bioluminescents és el més idoni per monitoritzar efectes biològics d'aquests tipus d'efluents industrials.

Cal destacar el fet que l'assaig amb *V. fischeri*, tot i que és tolerant a continguts alts de sals i poc sensible als metalls pesants (Reemtsma i Jekel, 1997), com els que hi ha a les mostres d'adob, ha demostrat tenir més sensibilitat que els altres assaigs a l'hora de valorar la toxicitat dels banys residuals de l'adobament.

Aquests resultats són iguals als que va trobar per Sponza (2002), que, utilitzant l'assaig de toxicitat aguda amb diversos organismes va trobar que els bacteris bioluminescents, els peixos i les algues són, en ordre decreixent, els més sensibles als efluents depurats d'una indústria del metall, amb una EC<sub>50</sub> de 0,02 %, 0,12 % i 0,2 % respectivament. També demostra que per a

aquests tipus d'indústries un assaig de toxicitat amb protozous (en concret amb vorticel·les) és el menys sensible. Riva i López (2001) també han trobat que l'assaig amb alga és menys sensible que el dels bacteris bioluminescents i els peixos. En canvi, Guerra (2001) diu que els assaigs amb *D. magna*, Microtox<sup>®</sup> i *Brachionus plicatilis* tenen una resposta semblant i poden ser útils per a l'anàlisi rutinària d'aigües residuals que continguin compostos fenòlics.

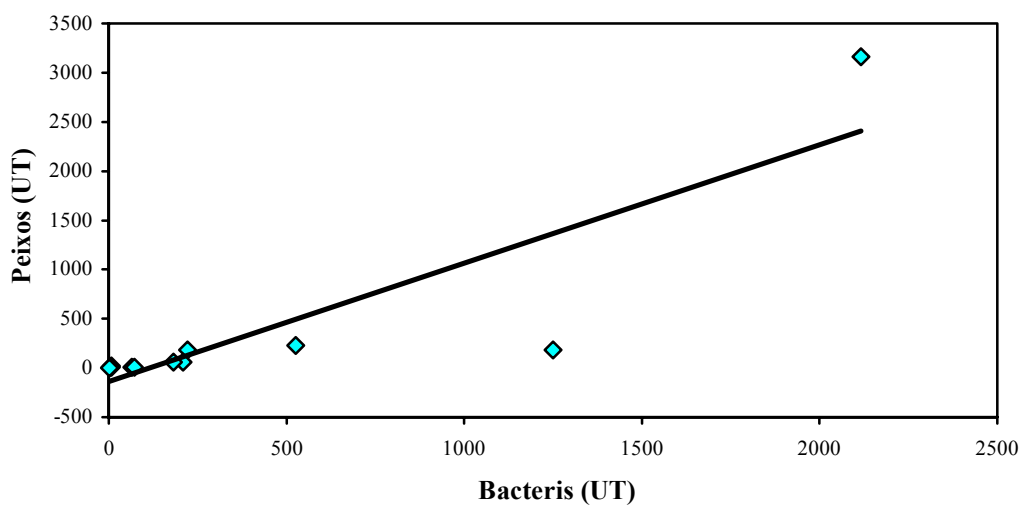
Però per a altres tipus d'aigües residuals els resultats de la sensibilitat són diferents. Per exemple, Tarkpea *et al.* (1998), quan estudien els efluent de diversos tipus d'empreses amb característiques molt diferents i amb una presència de metalls important, troben que l'assaig amb algues els dona més sensibilitat que el Microtox<sup>®</sup>. Igualment, Tonkes, de Graaf i Graansma (1999), en estudiar 17 efluent que contenen aigües residuals d'una refineria i d'una indústria química van trobar que l'assaig d'inhibició del creixement algal era el que donava més sensibilitat.

#### **6.10. VALORACIÓ DE L'ASSOCIACIÓ ENTRE ELS DIFERENTS ASSAIGS DE TOXICITAT AGUDA APLICATS ALS EFLUENTS D'ADOBERIA A TRAVÉS DEL CÀLCUL DEL COEFICIENT DE CORRELACIÓ**

La quantificació de la relació per parelles entre els diversos assaigs de toxicitat emprats s'ha estudiat a través del càlcul dels coeficients de correlació dels rangs de Spearman ( $r_s$ ) recollits a la **taula XLV** de l'annex 15.6. S'ha considerat un nivell de significació del 0,05 per determinar si la correlació es pot acceptar com a bona o no.

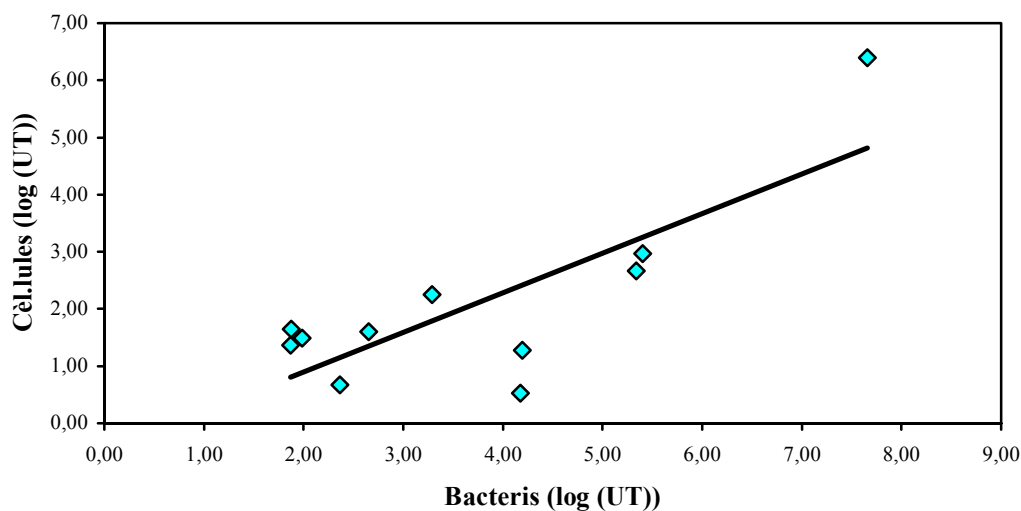
A la **figura 10** es presenten les relacions entre els assaigs de toxicitat aguda amb un bacteri bioluminescent (Microtox<sup>®</sup>), amb una alga unicel·lular, amb un peix i amb cèl·lules *in vitro* (citotoxicitat, determinada pel mètode del vermell neutre).

a) Correlació entre l'assaig amb bacteris bioluminescents i l'assaig amb peixos



$$r_s = 0,928 \text{ ( } p < 0,01 \text{ )}$$

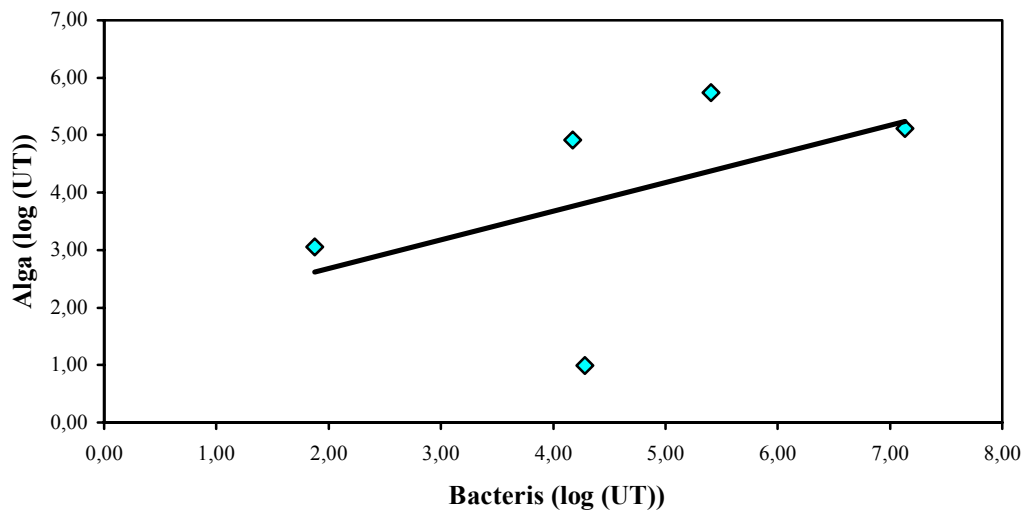
b) Correlació entre l'assaig amb bacteris bioluminescents i l'assaig amb cèl·lules *in vitro*



$$r_s = 0,509 \text{ ( } p < 0,110 \text{ )}$$

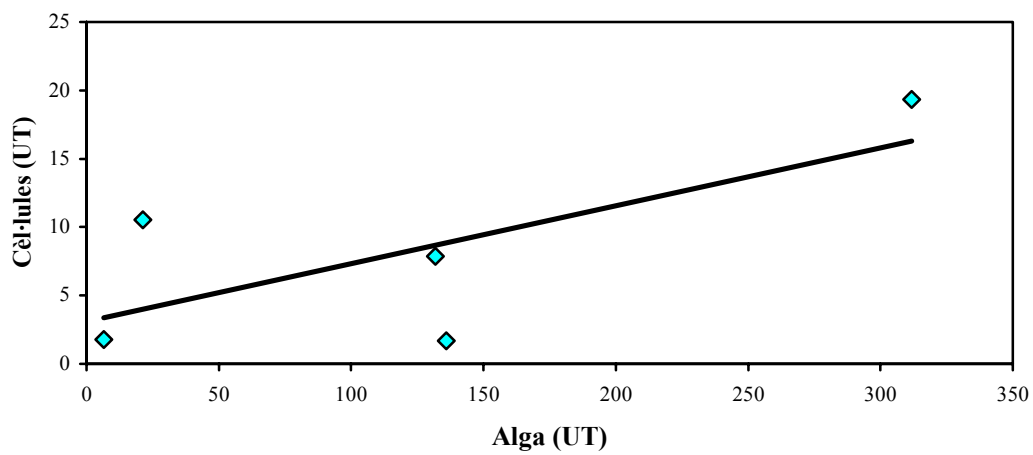
**Figura 10.** Representació gràfica de la valoració de l'associació entre els diferents l'assaig de toxicitat aguda aplicats als efluents d'adoberia a través del càlcul del coeficient de correlació.

c) Correlació entre l'assaig amb bacteris bioluminescents i l'assaig amb algues



$$r_s = 0,600 \text{ ( } p < 0,285 \text{ )}$$

d) Correlació entre l'assaig amb algues i l'assaig amb cèl·lules *in vitro*

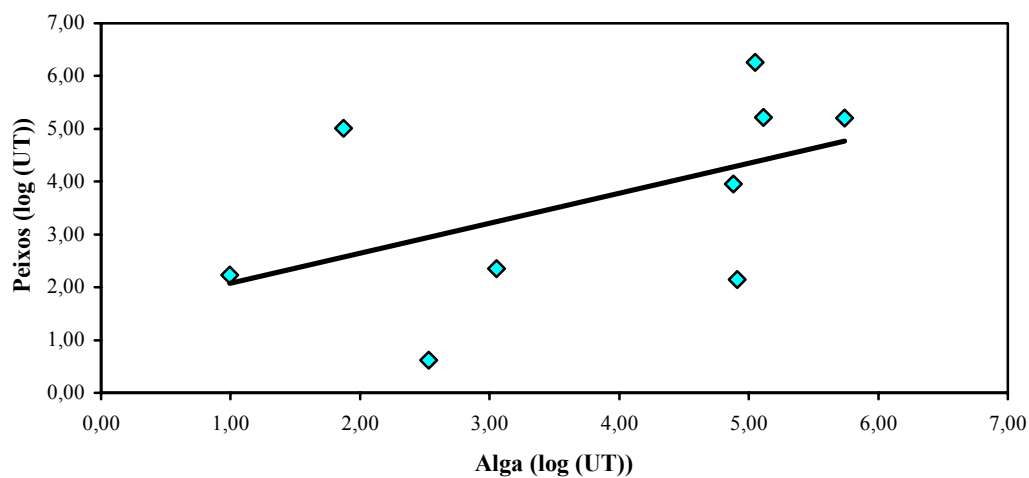


$$r_s = 0,300 \text{ ( } p < 0,624 \text{ )}$$

Continuació de la **figura 10**.

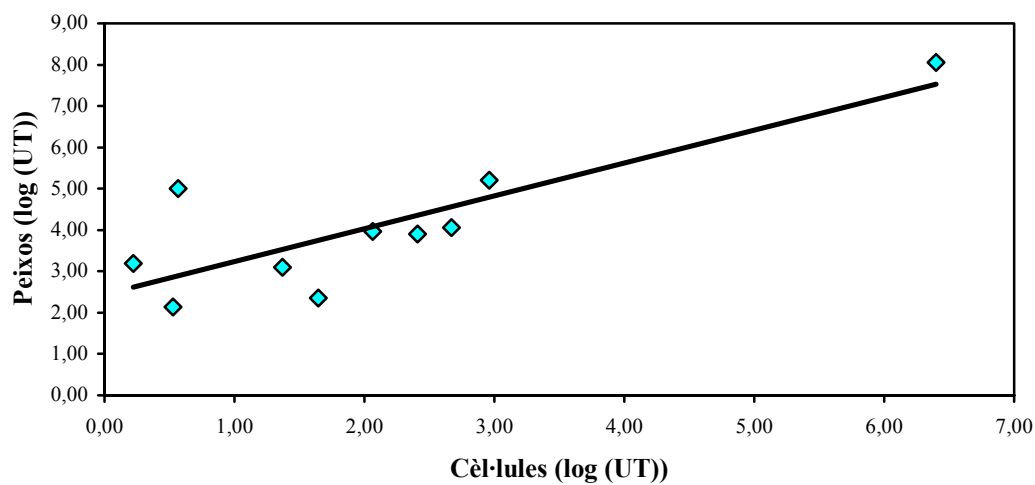


e) Correlació entre l'assaig amb algues i l'assaig amb peixos, logaritme d'UT



$$r_s = 0,600 \text{ ( } p < 0,088 \text{ )}$$

f) Correlació entre l'assaig de cèl·lules *in vitro* i l'assaig de peixos, logaritme d'UT



$$r_s = 0,697 \text{ ( } p < 0,025 \text{ )}$$

Continuació de la **figura 10**.

Els resultats indiquen que només hi ha dues correlacions significatives al nivell de 0,05, l'establerta entre els assaigs de toxicitat aguda amb el Microtox<sup>®</sup> i amb peixos, i l'establerta entre els assaigs amb peixos i els que es fan amb cèl·lules *in vitro*. En canvi, no hi ha una correlació significativa entre els assaigs de toxicitat aguda amb algues i peixos, amb algues i citotoxicitat, amb Microtox<sup>®</sup> i citotoxicitat, i amb Microtox<sup>®</sup> i algues. Igual que Wängberg *et al.* (1995), que han trobat una correlació no significativa ( $p > 0,05$ ) entre el Microtox<sup>®</sup> i la *Ceriodaphnia dubia* en efluents d'indústria galvànica, i entre el Microtox<sup>®</sup> i la truita arc iris, possiblement a causa de la diferent sensibilitat d'aquests organismes als metalls.

El fet que no hi hagi correlació entre els assaigs de toxicitat aguda permet afirmar que els assaigs escollits són prou representatius dels diversos nivells d'una cadena tròfica d'un ecosistema i, per tant, són útils com a assaigs de toxicitat aguda per al control i l'anàlisi dels efectes ambientals que poden ocasionar els efluents residuals d'adoberia.

La correlació significativa entre l'assaig del Microtox<sup>®</sup> i el dels peixos per a altres tipus d'efluents ja coneixia. Per exemple, Kyungho Choi i Peter G. Meier (2001), estudiant el cas concret d'unes aigües residuals d'una indústria galvànica, van trobar que l'assaig del Microtox<sup>®</sup> donava uns valors de CE<sub>50</sub> comparables als obtinguts en l'assaig amb el peix *fathead minnow* (*Pimephales promelas*) (de  $< 0,5$  ordre de diferència). L'anàlisi de la correlació de Spearman per rangs els donava com a resultat que el Microtox<sup>®</sup> es correlacionava amb un nivell de significació  $p < 0,05$  amb els assaigs de toxicitat aguda i crònica amb peixos i amb el de toxicitat aguda amb la *Daphnia magna*.

L'altra correlació significativa, la de peixos i citotoxicitat, també es tracta en altres treballs. Lange *et al.* (1995) exposen els seus resultats i un resum dels resultats d'altres autors que també han trobat una correlació significativa entre l'assaig amb peixos *in vivo* i l'assaig *in vitro*. La correlació entre els valors de CE<sub>50</sub> *in vitro* de la línia RTG-2 i els CE<sub>50</sub> *in vivo* de l'espècie de la qual prové és bona, tal com ha quedat sobrerament demostrat en diversos estudis (Bols *et al.*, 1985, Babich, Puerner i Borenfreund, 1986, Fry *et al.*, 1990), i segons Tarazona, Cebrian i Castaño (1993) els resultats es podrien extrapolar d'un assaig a l'altre.

La correlació significativa entre aquests assaigs permet dir que els resultats poden ajudar a limitar l'ús d'organismes superiors per fer proves de toxicitat i a reduir el nombre de proves a assajar, no

tan sols a l'hora d'estudiar compostos químics sinó també en l'estudi d'efluents residuals industrials.