



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE UN EFLUENTE
TRATADO DE AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA ACOPLANDO
UN TRATAMIENTO CON ZEOLITA NATURAL MODIFICADA
CON HEXADECILTRIMETILAMONIO (HDTMA)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. SAMANTHA DEL ROCÍO SANTIBAÑEZ VILLEGAS

DIRIGIDA POR:

**DRA. ARACELI AMAYA CHÁVEZ
DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA
DR. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA**



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

ENERO 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir esta etapa de mi vida llena de aprendizaje y experiencias.

A mis padres, por su apoyo constante e incondicional durante este proceso.

A mi hermana, por echarme porras en los momentos complicados.

A mis amigos por hacer este proceso una gran aventura y apoyarme durante todo este tiempo (Elba, Edna, Esme, Sonia, José, Jorge, Regina).

A Doña Chave y Silvia por estar al pendiente en el laboratorio y siempre ser tan atentas conmigo.

A Claudia por enseñarme todo lo necesario para iniciar este proyecto.

A mi comité tutorial por acompañarme y enseñarme tantas cosas.

Al hospital de estudio por su colaboración para llevar a cabo este proyecto.

Al proyecto CONACyT con número 215997 (para atender problemas nacionales) apoyo en el transcurso de la maestría.

A todos los que aportaron un granito de arena para que este proyecto se pudiera realizar.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
1. ANTECEDENTES.....	9
1.1. Contaminación del agua	9
1.2. Aguas residuales de origen hospitalario	9
1.3. Plantas de tratamiento de agua residual hospitalaria	10
1.4. Remoción de contaminantes.....	11
1.5. Remoción de contaminantes con zeolita	12
1.6. Calidad del agua	13
1.7. Bioensayos de Toxicidad.....	17
1.8. Biomarcadores	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	24
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Elección del sitio de muestreo	24
6.2. Muestreo	24
6.3. Tratamiento con zeolita natural modificada con HDTMA.....	25
6.4. Evaluación de la eficiencia de remoción de los contaminantes.....	25
6.5. Evaluación de la toxicidad.....	25
6.5.1. Toxicidad Aguda.....	25
6.5.2. Toxicidad crónica.....	26
6.7. Análisis de resultados	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7.1 Artículo de investigación.....	28
7.1.1 Correo electrónico de confirmación de recepción del artículo.....	28
7.1.2 Manuscrito enviado	29
7.2. Caracterización de la planta tratadora de aguas residuales.....	49
7.3 Muestreo	50
7.4 Propiedades Fisicoquímicas y microbiológicas.....	51

7.5 Estudio de Toxicidad aguda con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	54
7.5.1 Primer muestreo	55
7.5.2 Segundo muestreo	58
7.5.3 Tercer muestreo	62
7.6 Estudio de Toxicidad aguda con <i>Daphnia pulex</i>	69
7.6.1 Primer muestreo	69
7.6.2 Segundo muestreo	72
7.6.3 Tercer muestreo	75
7.7 Estudio de Toxicidad crónica con <i>Selenastrum capricornutum</i>	81
7.7.1 Primer muestreo	81
7.7.2 Segundo muestreo	82
7.7.3 Tercer muestreo	83
8. CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de remoción de compuestos orgánicos.....	11
Tabla 2. Parámetros de la NOM- 003- SEMARNAT- 1997.....	14
Tabla 3. Estudios de toxicidad con bioindicadores.....	18
Tabla 4. Biomarcadores de toxicidad.....	21
Tabla 5. Estudios preliminares con zeolita natural modificada con HDTMA.....	23
Tabla 6. Pruebas fisicoquímicas del agua residual muestreada en la planta de tratamiento hospitalaria.....	51
Tabla 7. Parámetros microbiológico del agua residual hospitalaria	54
Tabla 8. Resultados de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a la concentración del 100% del agua residual.	68
Tabla 9. Resultados de toxicidad crónica en <i>Daphnia pulex</i> , a la concentración de 100%, después de 21 días de exposición.....	79
Tabla 10. Resultados de CI ₅₀ de <i>Selenastrum capricornutum</i>	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.. Estructura de la zeolita	12
Figura 2. Adsorción con zeolita modificada con HDTMA	13
Figura 3. Planta tratadora de aguas residuales del hospital de estudio.....	50
Figura 4. Índice de germinación de <i>Lactuca sativa</i> para el primer muestreo.....	56
Figura 5. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria antes de la cloración- primer muestreo.....	57
Figura 6. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria después del tratamiento con zeolita modificada- primer muestreo.....	57
Figura 7. Cambios morfológicos en las semillas germinadas- primer muestreo.....	58
Figura 8. Índice de germinación de <i>Lactuca sativa</i> para el segundo muestreo.....	59
Figura 9. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria antes de la cloración- segundo muestreo.....	60
Figura 10. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria después del tratamiento con zeolita modificada-segundo muestreo.....	60
Figura 11. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria después de la cloración- segundo muestreo.....	61
Figura 12. Cambios morfológicos en las semillas germinadas- segundo muestreo.....	62
Figura 13. Índice de germinación de <i>Lactuca sativa</i> para el tercer muestreo.....	63
Figura 14. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria antes de la cloración- tercer muestreo.....	64
Figura 15. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria tratada con zeolita- tercer muestreo.....	65
Figura 16. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en <i>Lactuca sativa</i> por el agua residual hospitalaria después de la cloración- tercer muestreo.....	66

Figura 17.1 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la primera semana de estudio.....	69
Figura 17.2 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la segunda semana de estudio.....	70
Figura 17.2 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la tercera semana de estudio.....	70
Figura 18.1. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada antes de la cloración- Primer muestreo.....	71
Figura 18.2. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita modificada- Primer muestreo.....	71
Figura 19.1 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la primera semana de estudio.....	72
Figura 19.2 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la segunda semana de estudio.....	73
Figura 19.3 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la tercera semana de estudio.....	73
Figura 18.1. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada antes de la cloración- Segundo muestreo.....	74
18.2. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita modificada- Segundo muestreo.....	74
Figura 20.3. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada después de la cloración- Segundo muestreo.....	75
Figura 21.1 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la primera semana de estudio- Tercer muestreo.....	75
Figura 21.2 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la segunda semana de estudio- Tercer muestreo.....	76
Figura 21.3 Reproducción de <i>Daphnia pulex</i> en la tercera semana de estudio- Tercer muestreo.....	77
Figura 22.1. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada antes de la cloración- Tercer muestreo.....	77
Figura 22.2. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita modificada- Tercer muestreo.....	78
Figura 22.3. Porcentajes de morbilidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada después de la cloración- Tercer muestreo.....	78
Figura 22.4 Porcentaje de mortalidad diario en <i>Daphnia pulex</i>	79
Figura 23. Efecto del agua residual hospitalaria sobre el desarrollo de los neonatos: a) neonato control encerrado. B) neonato expuesto a una concentración de 50% de ARHT...	80

Figura 24. Inhibición del crecimiento en <i>Selenastrum capricornutum</i> - primer muestreo.....	81
Figura 25. Inhibición del crecimiento en <i>Selenastrum capricornutum</i> - segundo muestreo...	82
Figura 26. Inhibición del crecimiento en <i>Selenastrum capricornutum</i> - segundo muestreo ARHTCl.....	82
Figura 27. Inhibición del crecimiento en <i>Selenastrum capricornutum</i> - tercer muestreo.....	83

RESUMEN

En la última década, se ha incrementado la necesidad de desarrollar estudios enfocados a la remediación de sitios contaminados, debido a que se ha observado una elevada presencia de Contaminantes Emergentes (CEMGs), entre los cuales encontramos a los productos farmacéuticos y a los Productos de Cuidado Personal (PCP). Los CEMGs no son removidos por procesos de tratamiento convencionales, motivo por el cual se ha propuesto el empleo de tratamientos acoplados. El agua residual de los hospitales tiene una gran variedad de contaminantes químicos como detergentes y residuos farmacéuticos, los cuales no son eliminados por los tratamientos tradicionales, convirtiéndose en CEMGs. Las zeolitas naturales han atraído la atención como bioadsorbente de contaminantes por sus ventajas ecológicas, accesibilidad y abundancia. Por lo que son frecuentemente utilizadas como adsorbentes para la remediación del agua. Es por esto que se propone un tratamiento acoplado: planta tratadora de aguas residuales hospitalarias- biofiltro con zeolita natural modificada con HDTMA (HexaDecilTriMetilAmonio) desarrollada por el grupo de investigación. Se evaluó la eficiencia de remoción de los contaminantes del efluente del agua residual de un hospital general de Toluca, Edo. Méx., valorando la calidad del agua del efluente antes y después del biofiltro determinando los parámetros fisicoquímicos para calidad del agua marcados en la norma mexicana NOM- 001-SEMARNAT- 1996 entre los cuales encontramos: grasas y aceites, Demanda Química de Oxígeno (DQO), nitrógeno total, metales, sólidos suspendidos totales y sólidos disueltos.

Se determinó el potencial de toxicidad utilizando organismos bioindicadores como *Daphnia pulex*, *Selenastrum capricornutum* y *Vibrio fischeri* (microtox). Para el análisis de los resultados se realizará un ANOVA para determinar la variabilidad de los resultados de las diferentes pruebas fisicoquímicas entre el agua residual tratada antes del biofiltro y después de él, así mismo se determinarán las Unidades de toxicidad aguda y se compararán con lo que marca la normatividad vigente para ver el nivel de toxicidad.

1. ANTECEDENTES

1.1. Contaminación del agua

El agua es de vital importancia para la existencia, el hombre la utiliza para las actividades domésticas, industriales y agrícolas. Durante la última década se ha visto un notable impacto del hombre sobre el ambiente, debido al aumento sin precedentes de la población y el rápido ritmo de la urbanización. La contaminación de los cuerpos de agua se debe en gran medida a la contribución industrial, hospitalaria, agrícola y municipal; ya que generan una gran cantidad de residuos, los cuales no siempre son tratados. (Akoteyon, *et al.*, 2011).

Existen tres razones principales por las que la contaminación del agua ha llegado a ser un problema mucho más serio que en el pasado. Primera, se ha introducido químicos muy tóxicos, los que nunca antes estuvieron presentes en la biósfera. Segunda, el crecimiento de la civilización industrial ha alcanzado el punto en que por primera vez sus productos pueden contaminar significativamente la biosfera de una región geográfica en particular, o aun en todo el planeta. Tercera, los sistemas de distribución masiva aseguran ahora que cualquier incidente de toxicidad probablemente afecte grandes cantidades de individuos en un área muy extensa (Goldstein y Aronov, 1979; Rivera, 2016).

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos civiles, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas, se denominan aguas residuales (Ley De Aguas Nacionales, 1994).

1.2. Aguas residuales de origen hospitalario

Los hospitales usan una gran variedad de sustancias químicas como son fármacos, radionúclidos, desinfectantes y detergentes, para el cuidado de la salud, diagnósticos desinfección e investigación (Yves *et al.*, 2013).

Después de su aplicación, algunas de estas sustancias y los fármacos no metabolizados son excretados por los pacientes y encontrados en aguas residuales hospitalarias, las cuales llegan al alcantarillado municipal sin un tratamiento preliminar (Langford y Thomas, 2009).

Los hospitales por tanto, constituyen una fuente de contaminación de sustancias tóxicas (fármacos y productos de cuidado personal). Esto puede tener un efecto negativo en el equilibrio ecológico. Adicionalmente, Escher y colaboradores en 2011 reportan que las actividades hospitalarias contribuyen en un 20 a 30% de las descargas para actividades de cuidado personal, representan un importante problema y es necesario mejorar su disposición.

1.3. Plantas de tratamiento de agua residual hospitalaria

Existen distintos tipos de tratamiento de las aguas residuales para lograr remover los contaminantes. Las aguas residuales se pueden someter a diferentes niveles de tratamiento, dependiendo del grado de purificación que se quiera.

A) Tratamiento preliminar: está destinado a preparar las aguas residuales para que puedan recibir un tratamiento posterior evitando que se presenten obstrucción de tuberías, presencia de sólidos flotantes y fluctuación de caudal.

B) Tratamiento Primario: es el proceso de tratamiento del agua residual consistente en la eliminación de los sólidos suspendidos contenidos en ellas. Los mecanismos empleados son: rejilla, desmenuzadores y trampas de basura.

C) Tratamiento Secundario: consiste en tratar el agua con el fin de transformar los compuestos que están en forma de sólidos disueltos y coloidales en compuestos estables, por medio de tratamientos físico-químicos, adsorción e intercambio de iones, tratamientos químicos y tratamientos biológicos. Para los hospitales este tratamiento consiste en tratamientos de aireación.

D) Tratamiento terciario: Es el último paso del tratamiento del agua residual con el fin de pulir el efluente del tratamiento secundario, eliminando elementos como el N, P, K, Ca y otros (Centro de Investigaciones en Medio Ambiente y Desarrollo, Grupo ángeles, 2000).

Varios estudios han demostrado que los contaminantes emergentes no son removidos eficientemente por medio de procesos de tratamiento convencionales. Debido a que originalmente las plantas tratadoras de aguas residuales no fueron diseñadas para la eliminación de algunos compuestos orgánicos (Gabet *et al.*, 2010; Orias e Yves, 2014). Por lo tanto, pueden ser encontrados en fuentes de agua potable, lo que constituye un potencial riesgo para la salud (Penagos, *et al.*, 2012).

1.4. Remoción de contaminantes

Dado al gran impacto del tratamiento ineficiente por el cual pasa el agua después de ser utilizada, se han evaluado diferentes técnicas de remediación, como las técnicas convencionales: procesos fisicoquímicos (filtración, coagulación, floculación, sedimentación, cloración y adsorción), los procesos de oxidación avanzada (ozonólisis, fotólisis, intercambio de iones y filtración de membrana), los procesos biológicos (biodegradación y nitrificación) (Bolong *et al.*, 2009; Homen, *et al.*, 2011) son los más utilizados en el tratamiento de las aguas residuales, aunque éstos no proporcionan una técnica eficaz para la eliminación de contaminantes orgánicos recalcitrantes (Rossner *et al.*, 2009). En algunos casos, los procesos de degradación o eliminación no pueden o no deben ser aplicados solos. Este es el caso de la biodegradación, porque la mayoría de los microorganismos son sensibles a los contaminantes tóxicos. Es por esto, que se aplica una etapa de pretratamiento, a los subproductos que son fácilmente biodegradables y menos tóxicos, evitando la muerte de los microorganismos que están presentes en los tratamientos biológicos posteriores (Herrera, 2013).

En la tabla 1 se muestran algunos estudios de remoción de contaminantes donde se observa la evaluación del agua residual cruda y tratada con distintas técnicas.

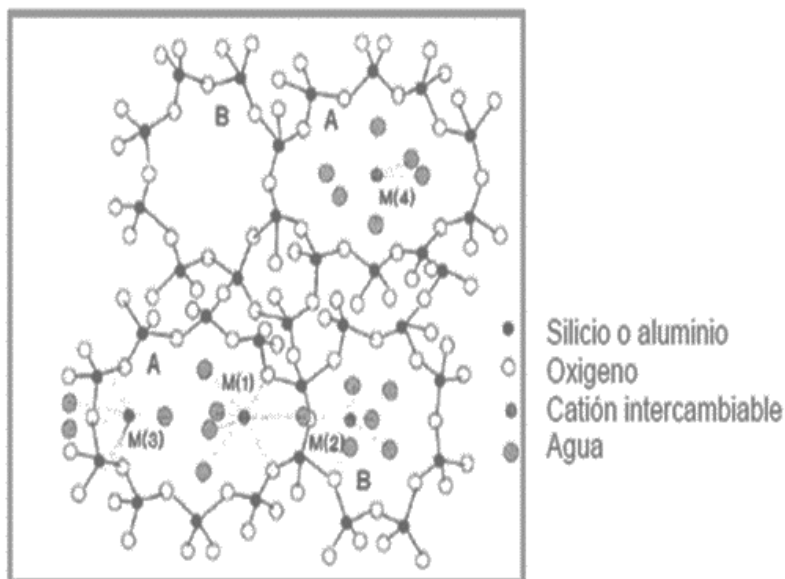
Tabla 1. Tratamientos para la remoción de compuestos orgánicos

Fármaco	Tratamiento y matriz	Referencia
Colorantes textiles	Tratamiento biológico seguido de oxidación foto – Fenton para degradación de contaminantes en medio acuoso.	Punzi <i>et al.</i> , 2015
Lixiviados de vertedero	coagulación–floculación/foto Fenton	Vedrenne <i>et al.</i> , 2012
Agua residual industrial	Electrocoagulación/ fitorremediación	Cano <i>et al.</i> , 2014
Agua residual de producción de aceites (alpachin)	Algodón acidificado y zeolita (2:1 relación peso:peso), seguido por un tratamiento con carbón activado	Aly <i>et al.</i> , 2014

1.5. Remoción de contaminantes con zeolita

El término “zeolita” deriva de dos palabras griegas, zeo: que ebulle, y lithos: piedra y fue inicialmente utilizado para designar a una familia de minerales naturales que presentaban propiedades particulares como el intercambio de iones y la desorción reversible de agua (Gamboa et al., 2016).

La unidad estructural de toda zeolita son tetraedros integrados por un átomo de silicio en el centro y cuatro de oxígeno que originan el ion ortosilicato. Los átomos de oxígeno constituyen los cuatro vértices de cada tetraedro, estos átomos se hayan estrechamente ligados a un átomo central de silicio o aluminio y cada átomo central se enlaza a sus cuatro átomos vecinos, por medio de un oxígeno intermedio. La carga negativa que resulta de la sustitución isomórfica de silicio por aluminio en la zeolita, se balancea por la presencia de cationes intercambiables de sodio, potasio o calcio. (Torres, 2005, Gamboa et al., 2016). En la figura 1 se muestra la estructura de la zeolita.



Estructura de la zeolita

La aplicación de zeolitas naturales para la remediación ambiental se basa principalmente en sus propiedades de intercambio iónico lo cual ha hecho que sea investigada como una alternativa de tratamiento. Solache y colaboradores en 2010 utilizaron una zeolita modificada con hierro para remover amarillo remazol. Egashira y colaboradores en 2012 emplearon una zeolita para remover

cobre, zinc y manganeso. En otro estudio, se encontró una remoción de 14.22mg/ g de plomo utilizando una zeolita sódica.

Es también bien conocido que el intercambio iónico en el caso de las zeolitas se da entre cationes y sólo su modificación, con compuestos surfactantes (como hexadeciltrimetilamonio) puede proporcionarles propiedades para la sorción de aniones (Misaelides, 2011). Es por esta razón que la investigación de este material adsorbente se ha incrementado. Vidal y colaboradores en 2012 determinaron una buena adsorción de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en solución acuosa (12.13 mg/ g, 13.75 mg/ g, 13.98 mg/ g, 13,98 mg/ g, respectivamente).

En la figura dos se ilustra cómo se lleva a cabo la adsorción de los contaminantes aniónicos, donde se observa que gracias a la modificación del surfactante la zeolita adquiere la capacidad de adsorber compuestos con carga negativa.

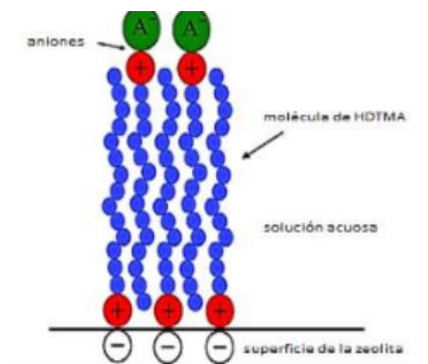


Figura 2. Adsorción con zeolita modificada con HDTMA

1.6. Calidad del agua

A principios de los años setenta, ante la necesidad de encontrar un método uniforme y consistente para dar a conocer la calidad del agua de manera accesible a la población, se desarrolló un sistema estimativo de calidad del agua que requirió la medición física de los parámetros de contaminación del agua y el uso de una escala estandarizada de medición para expresar la relación entre la existencia de varios contaminantes en el agua y el grado de impacto en los diferentes usos de la misma. Este sistema se denominó Índice de Calidad del Agua (ICA) y es un sistema cualitativo que permite hacer comparaciones de niveles de contaminación en diferentes áreas. El ICA se define como el grado de contaminación existente en el agua a la fecha de un muestreo, expresado como un porcentaje de agua pura. Así, agua altamente contaminada tendrá

un ICA cercano o igual a 0% y de 100% para el agua en excelentes condiciones. Éste índice consideró 18 parámetros para su cálculo con distintos pesos relativos (W_i), según la importancia que se le concedía a cada uno de ellos en la evaluación total, entre ellos encontramos a la demanda bioquímica de Oxígeno, Nitrógeno en nitratos, Oxígeno disuelto, alcalinidad, coliformes fecales, coliformes totales, color, dureza total, sustancias activas al azul de metileno (detergentes), potencial de Hidrógeno (pH), conductividad eléctrica, sólidos suspendidos, fosfatos totales, cloruros, grasas y aceites, sólidos disueltos y Nitrógeno amoniacal (SEMARNAT, 2008).

También se cuenta en México con una legislación para evaluar la calidad del agua dependiendo del uso que se le pretenda dar. En el caso del agua residual, se busca que cumpla las características para emplear como agua de riego, las cuales están marcadas por la Norma Mexicana NOM- 001- SEMARNAT- 1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, la cual se presenta a continuación.

Tabla 2. Parámetros de la NOM- 001- SEMARNAT- 1996.

Parámetro (mg L^{-1})	Valores de referencia	Técnica de análisis	Norma
pH	N.A.	Potenciometría	NMX-AA-008-SCFI-2011
Conductividad	N.A.	Conductimetría	NMX-AA-093-SCFI-2000
Grasas y aceites	15	Extracción Soxhlet	NMX-AA-005-SCFI-2000
Materia flotante	ausente	Separación por malla	NMX-AA-006-SCFI-2000
Sólidos sedimentables (mL L^{-1})	1	Volumétrico	NMX-AA-004-SCFI-2000
Sólidos suspendidos totales	150	Evaporación y calcinación	NMX-AA-034-SCFI-2001
Demanda bioquímica de oxígeno	150		NMX-AA-028-SCFI-2001

Demanda química de oxígeno			NMX-AA-030-SCFI-2001
Nitrógeno total	40	Espectrofotometría	NMX-AA-099-SCFI-2006
Fósforo total	20	Método cloruro estañoso	NMX-AA-029-SCFI-2001
*Coliformes totales	20000 NMP/100 mL		NMX-AA-113-SCFI-1999
*Coliformes fecales	$\leq 1 \text{ h L}^{-1}$		NMX-AA-42-SCFI-1987

*Parámetros correspondientes a la norma NMX-003- ECOL- 1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

A continuación se enlistan las definiciones de los parámetros previamente mencionados:

pH- es el más importante en la determinación de la naturaleza corrosiva del agua. Los valores pequeños y elevados refieren a una corrosión mayor. El pH se correlaciona positivamente con la conductancia eléctrica y alcalinidad total (Patil et al., 2012).

Conductividad-es una medida de la capacidad del agua para pasar una corriente eléctrica. Debido a que las sales disueltas y otros productos químicos inorgánicos conducen la corriente eléctrica, la conductividad aumenta a medida que aumenta la salinidad. La conductividad también se ve afectada por la temperatura: cuanto más caliente el agua, mayor es la conductividad (US EPA, 2016). Muestra una correlación significativa con diez parámetros tales como la temperatura, pH valor, alcalinidad, dureza total, de calcio, sólidos totales, sólidos disueltos totales, químicas la demanda de oxígeno, cloruro de hierro y la concentración de agua. Navneet Kumar y colaboradores (2010).

DQO- es la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas o en suspensión en una muestra líquida.

DBO₅- es la cantidad de oxígeno disuelto requerida para la descomposición bioquímica de compuestos orgánicos y la oxidación de ciertos materiales inorgánicos (por ejemplo, hierro,

sulfitos). Típicamente, la prueba de DBO se lleva a cabo durante un período de cinco días (Patil et al., 2012).

Grasas y aceites- Son los compuestos orgánicos constituidos principalmente por ácidos grasos de origen animal y vegetal, así como de hidrocarburos del petróleo que son extraídos de la muestra utilizando hexano como solvente (NMX-AA-005-SCFI-2013).

Materia flotante- Todo aquel material que quede retenido en una malla entre 2.8 mm y 3.3 mm de abertura (NMX-AA-006-SCFI-2000).

Sólidos sedimentables- La materia sedimentable se define como la cantidad de sólidos que en un tiempo determinado se depositan en el fondo de un recipiente en condiciones estáticas (NMX-AA-004-SCFI-2013).

Sólidos suspendidos totales- Sólidos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos y materia orgánica en suspensión y/o coloidal, que son retenidas en el elemento filtrante (NMX-AA-034-SCFI-2001).

Fósforo total- El fósforo generalmente se encuentra en aguas naturales, residuales y residuales tratadas como fosfatos. Éstos se clasifican como ortofosfatos, fosfatos condensados y compuestos organofosfatados. Estas formas de fosfatos provienen de una gran cantidad de fuentes, tales como productos de limpieza, fertilizantes, procesos biológicos, etc.

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de organismos, por lo que la descarga de fosfatos en cuerpos de aguas puede estimular el crecimiento de macro y microorganismos fotosintéticos en cantidades nocivas (NMX-AA-029-SCFI-2001).

Nitrógeno total- Los compuestos nitrogenados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las fuentes de nitrógeno incluyen además de la degradación natural de la materia orgánica, fertilizantes, productos de limpieza, etc. Debido a que el nitrógeno es un nutriente esencial para organismos fotosintéticos, es importante el monitoreo y control de descargas del mismo al ambiente.

Coliformes fecales y totales- son un grupo de microorganismos en que *Escherichia coli* organismo de origen fecal, representa una elevada proporción. Su identificación se basa en la

fermentación de la lactosa con formación de gas en medios selectivos incubados a una temperatura estrictamente controlada

Tanto la estimación de calidad de agua por ICA como por la norma anterior, son importantes ya que la norma por su lado delimita las características para cada tipo de agua, mientras que ICA hace la estimación de contaminación con referencia a otros cuerpos de agua. Así también, se puede observar que los parámetros considerados por ICA son más de los considerados por la norma mexicana, por lo cual podría complementarse una con la otra.

También se observa, que los parámetros de calidad del agua, en ambos casos, no involucran la remoción de productos farmacéuticos, por lo cual estos no son monitoreados. Así como la evaluación de la toxicidad de las aguas residuales, la cual puede ser determinada mediante los bioensayos de toxicidad.

1.7. Bioensayos de Toxicidad

Los bioensayos han adoptado una importancia creciente en la evaluación de la toxicidad potencial de muestras medioambientales, puesto que son rápidos y no necesitan la completa caracterización química de las mismas. Sin embargo, algunos autores indican la necesidad de combinar los ensayos ecotoxicológicos y químicos para evaluar dicha toxicidad potencial y establecer su naturaleza (Smital *et al*, 2011).

Estos ensayos aspiran a la predicción realista del comportamiento de sustancias tóxicas en el ambiente. Es razonable investigar si los bioensayos de ecotoxicidad proporcionan una importante información por la cual puede reconocerse el posible riesgo potencial de una muestra ambiental.

Los ensayos de ecotoxicidad se utilizan principalmente para evaluar dos tipos de efectos tóxicos, los cuales son:

Efecto agudo: Es un efecto adverso que se induce en los organismos por exposición a un material de prueba, durante un periodo menor o igual a 48 h. (NMX-AA-087-SCFI-2010).

Efecto crónico: Es la respuesta a un estímulo que se produce durante una gran parte del ciclo de vida del organismo expuesto, generalmente se manifiesta en su crecimiento y reproducción (NMX-AA-087-SCFI-2010).

Para evaluar ambos efectos causados por un contaminante, se emplean organismos representativos, los cuales son denominados bioindicadores. A continuación la tabla 3 se enlista algunos estudios de toxicidad que emplean bioindicadores.

Tabla 3. Estudios de toxicidad con bioindicadores.

Grupo	Organismo	Aplicación	Parámetro evaluado
Invertebrados	<i>Daphnia magna</i>	Tratamiento de aguas residuales de coque con un reactor biológico (Zhou <i>et al.</i> , 2015) Toxicidad de 17 α -etinilestradiol (Dietrich <i>et al.</i> , 2010)	Inmovilización y mortalidad en toxicidad aguda (exposición al contaminante por 24 a 48 horas). Alteraciones en la reproducción en exposición crónica (21 días)
	Camarón de salmuera (<i>Artemia salina</i>)	Tratamiento de aguas residuales industriales (Palácio <i>et al.</i> , 2009) Tratamiento de aguas de lastre (Tsolaki <i>et al.</i> , 2010)	Muerte de los organismos expresado en concentración letal media.
Algas	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Tratamiento de aguas residuales industriales (Yu <i>et al.</i> , 2014)	Inhibición del crecimiento del alga expresado en CI ₅₀ .
Rotífero	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Tratamiento de aguas residuales hospitalarias (Yves <i>et al.</i> , 2013)	Inhibición de la reproducción en estudios de toxicidad crónica, expresado como CI ₂₀ .
Peces	Pez zebra (<i>Danio rerio</i>)	Tratamiento de aguas residuales (Hamid y Eskicioglu, 2012) Tratamiento de aguas residuales de coque con un reactor biológico (Zhou <i>et al.</i> , 2015)	Inhibición de la reproducción. Muerte de los organismos expresado en concentración letal media.

Plantas	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	Agua proveniente de extractos de una mina (Bagur <i>et al.</i> , 2010)	Reducción de la elongación de la radícula y del porcentaje de germinación.
---------	--------------------------------------	---	--

En la tabla 3 se muestra que existen una gran variedad de organismos que pueden ser empleados en la determinación de la toxicidad de aguas residuales. Por lo cual, deberían incluirse más estudios con bioensayos para determinar la calidad del agua.

Para tener una correcta evaluación del riesgo que representa una sustancia o muestra a los organismos vivos, es necesario el empleo de más de un organismo de estudio. Se debe estudiar el efecto tóxico en varias especies de diferente nivel organizacional ya que la sensibilidad de estos organismos ante un agente es diferente por lo cual se obtiene un estudio más completo (Hernando *et al.*, 2005).

En México se tienen algunas normas referentes a la evaluación toxicológica como son:

- **NMX-AA-087-SCFI-2010** “Análisis de agua - evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea -Cladocera) - Método de prueba”. Este método se basa en la medición de la toxicidad aguda, mediante la definición de la concentración efectiva media (CE₅₀), donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada del crustáceo del Orden Cladocera *D. magna*, durante 48 h.
- **NMX-AA-112-1995-SCFI** “Análisis de agua y sedimentos – evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum* – Método de prueba”. Este método se basa en la evolución del efecto que sustancias puras, combinadas, cuerpos receptores, efluentes, lixiviados y sedimentos pueden tener sobre la intensidad de la luz emitida por la bacteria *Photobacterium phosphoreum* en condiciones controladas de exposición.
- **NMX-AA-110-1995-SCFI** “Análisis de agua – evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana kellogg* (crustacea – anostraca) – método de prueba. Este método se basa en la exposición controlada del crustáceo *Artemia franciscana*, a cuerpos de agua salobre o marino, sustancias puras o combinadas, cuya salinidad sea mayor a diez, para evaluar su efecto tóxico.

Sin embargo, al ser normas mexicanas no son obligatorias por lo cual en la mayoría de las plantas tratadoras de agua residual no son empleadas, es por esto que el agua residual puede llegar a los cuerpos de agua siendo tóxica.

En este estudio se evaluaron ambos tipos de efectos, efecto agudo con bacterias luminiscentes (*Vibrio fischeri*), *Daphnia magna* y semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), mientras que los estudios de efecto crónico se evaluarán con *Selenastrum capricornatum* y *Daphnia magna*.

1.8. Biomarcadores

Por otro lado, también se pueden emplear biomarcadores, los cuales pueden definirse ampliamente como indicadores o eventos de señalización en los sistemas biológicos o muestras de cambios medibles en los niveles moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos, patológicos o de comportamiento en respuesta a xenobióticos.

Los biomarcadores se clasifican de la siguiente manera:

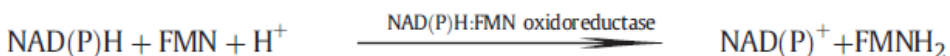
- a) Biomarcador de exposición: evalúa en un organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del ambiente que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana.
- b) Biomarcador de efecto: evalúa la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo que puede ser asociada con una enfermedad.
- c) Biomarcadores de susceptibilidad: es un indicador de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica (Arango, 2012).

En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos del empleo de biomarcadores.

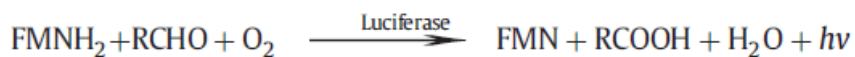
Tabla 4. Biomarcadores de toxicidad

Organismos	Biomarcador	Aplicación
<i>Vibrio qinghaiensis sp</i>	Bioluminiscencia bacteriana	Agua residual (Weinrich <i>et al.</i> , 2010; Ye <i>et al.</i> , 2011; Yu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Daphnia magna</i>	Lipoperoxidasa (LPX), superóxido dismutasa (SOD), catalasa(CAT), y glutatión peroxidasa (GPx)	Agua sintética con diclofenaco (Gómez <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cyprinus carpio</i>	Superóxido dismutasa (SOD), catalasa(CAT), y glutatión peroxidasa (GPx)	Agua sintética con diclofenaco (Islas <i>et al.</i> , 2013)

Las bacterias que presentan bioluminiscencia se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. La luz emitida por las bacterias luminiscentes se basa principalmente en el sistema de una enzima bioluminiscente que consta de un NAD(P)H: FMN oxidoreductasa y una luciferasa . En primer lugar, se reduce de FMN a FMNH₂ sobre la reacción catalizada por la enzima NAD (P) H: FMN oxidoreductasa en la presencia de un reductor NAD(P)H y un H⁺.



Entonces la luciferasa bacteriana cataliza la oxidación de FMNH₂ reducida para producir FMN oxidado en presencia de un aldehído de cadena larga (RCHO) y O₂ dan como respuesta la emisión de luz.



La evaluación de la luminiscencia que presentan ante la exposición a sustancias tóxicas da una idea del daño causado en la respiración bacteriana, por lo cual la luminiscencia bacteriana es un biomarcador útil que permite evaluar la toxicidad de una sustancia (Yu *et al.*, 2014).

Por otro lado, el estrés oxidativo es producido por la disrupción del balance entre las especies reactivas de oxígeno y el sistema antioxidante. Las especies reactivas de oxígeno pueden inducir daño celular mediante la promoción de la peroxidación lipídica (LPO) de las membranas celulares, y en la regulación de muchos procesos celulares, tales como la activación del factor de transcripción, la expresión génica y la diferenciación, y la proliferación celular. Los sistemas

antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), por tanto, están obligados a compensar los efectos de estas especies reactivas, es por esto que son utilizadas como biomarcadores como se observa en tres especies de las mencionadas en la tabla anterior (Oviedo *et al.*, 2010).

Para este estudio, se utilizará como biomarcador la inhibición de la luminiscencia en *Vibrio fischeri*.

2. JUSTIFICACIÓN

Las aguas residuales generadas por una gran variedad de procesos industriales y actividades relacionadas a los mismos, son una importante fuente de contaminación debido a la cantidad de sustancias presentes en ellas, entre las cuales encontramos a los productos de cuidado personal y los fármacos. Esto se debe a que las plantas tratadoras de aguas residuales, no dan el tratamiento adecuado para la remoción de este tipo de sustancias (Akoteyon, *et al.*, 2011).

Estudios en México revelan la presencia para antiinflamatorios en aguas superficiales y subterráneas de la zona metropolitana (15 a 25 ng L⁻¹ para ibuprofeno y 2052-4824 ng L⁻¹ para diclofenaco (Gibson *et al.* 2010; Félix *et al.*, 2013). Así como la presencia de fármacos en aguas residuales del Valle del Mezquital (Cortéz *et al.*, 2014). También se ha evidenciado la presencia de compuestos con actividad estrogénica a concentraciones de hasta 90 ng L⁻¹ (Estrada *et al.*, 2013).

Esta problemática trae consigo la necesidad de estudios sobre la remoción de contaminantes. Sin embargo, algunos tratamientos probados no son eficientes o generan productos de degradación más tóxicos que el compuesto original (Herrera, 2013). Se ha descubierto que la zeolita modificada es un método alternativo para la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos por sus propiedades adsorbentes, teniendo como ventaja su bajo costo y su fácil adquisición (Rakic *et al.*, 2013).

El equipo de investigación ha realizado diversos estudios relacionados con la eficiencia de adsorción de la zeolita natural modificada con HDTMA, mostrando porcentajes significativos de remoción de diversos fármacos, los cuales se muestran en la tabla 5.

Es por esto, que en este estudio se busca evaluar la eficiencia de un tratamiento acoplado: planta tratadora de aguas residuales hospitalarias- biofiltro con zeolita natural modificada con HDTMA sobre aguas residual en la cámara de sedimentación para eliminar los compuestos orgánicos antes de la etapa de cloración evitando la formación de compuestos tóxicos por la reacción del cloro con éstos.

Tabla 5. Estudios preliminares con zeolita natural modificada con HDTMA

Estudio	Resultado	Autor
Evaluación de la remoción del 17 α -etinilestradiol en medio acuoso con una clinoptilolita modificada con HDTMA	Adsorción mayor al 90% del fármaco.	Dávila <i>et al.</i> , 2014
Evaluación de la remoción de dicloxacilina en medio acuoso con una zeolita modificada con Hexadeciltrimetilamonio (HDTMA)	Remoción de dicloxacilina de un 96%	Álvarez <i>et al.</i> , 2015
Proceso de sorción de ranitidina en medio acuoso con un material zeolítico modificado con hexadeciltrimetilamonio (HDTMA)	Remoción de ranitidina de un 75%	González <i>et al.</i> , 2015
Evaluación de la capacidad de sorción del 17 etinil estradiol, sulfametoxazol, carbamazepina, ranitidina y diclofenaco en lechos empacados con zeolita natural modificada		M. en C.Q. Sandra Luz Nolasco Gómez (Tesis en proceso)
Identificación y cuantificación de fármacos por LC-MS presentes en aguas residuales provenientes de un hospital y evaluación de su remoción con una clinoptilolita modificada con HDTMA		M. en C.Q. Angie Michelle Dávila Estrada (Tesis en proceso)

3. HIPÓTESIS

El tratamiento con una zeolita modificada con HexaDecilTriMetilAmonio (HDTMA) como técnica acoplada al sistema de tratamientos de aguas residuales hospitalarias mejorará significativamente las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas, y disminuirá la toxicidad del agua residual.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y toxicológicas del agua proveniente del efluente de una planta tratadora hospitalaria (ATH) y después de un tratamiento acoplado utilizando una zeolita natural modificada con HDTMA (ATHZ).

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de ATH y del ATHZ.
- Determinar la toxicidad aguda y crónica del ATH y del ATHZ.
- Comparar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y la toxicidad de ATH y ATHZ.

6. METODOLOGÍA

6.1. Elección del sitio de muestreo

El muestreo del agua se llevó a cabo en la planta tratadora de aguas residuales de un hospital general al término de la etapa de clarificación y sedimentación, y antes de que el agua pase por la etapa de desinfección, ya que con este trabajo se busca disminuir el impacto de la cloración sobre los contaminantes en el agua, dado que se ha reportado que al actuar ésta con el cloro tiende a formar compuestos muy tóxicos como son los trihalometanos (Herrera, 2013).

6.2. Muestreo

Se realizó el muestreo del agua residual en el efluente de la planta tratadora de acuerdo a la NMX-AA-003-1980 tomando un volumen de muestra de 15 litros por muestreo. Se realizaron cuatro periodos, comprendidos de la siguiente manera: Primavera (Abril- Junio), Verano (Julio- Septiembre), Otoño (Octubre- Diciembre) e Invierno (Enero- Marzo), para tener una visión

completa sobre la variación estacional de la toxicidad del agua residual, ya que las necesidades de los pacientes del hospital cambian con respecto a la época del año.

Dichas muestras se procesaron inmediatamente determinando parámetros fisicoquímicos y microbiológicos por una institución certificada.

6.3. Tratamiento con zeolita natural modificada con HDTMA

La mitad del agua residual muestreada se puso en contacto con una zeolita natural modificada con hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), la cual está siendo optimizada por el equipo de investigación para remover contaminantes recalcitrantes al tratamiento de la planta tratadora. Posterior a esto, se examinó la calidad del agua mediante las mismas pruebas que se realizarán al agua no tratada con esta técnica.

6.4. Evaluación de la eficiencia de remoción de los contaminantes

Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del agua residual hospitalaria, así como el agua tratada con la zeolita natural modificada con HDTMA, según lo marcado en la norma NOM- 001- SEMARNAT- 1996 (Ver tabla 2). Los resultados se compararon evaluando si existían diferencias significativas entre los valores obtenidos en ambas muestras tanto en parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y toxicológicos.

6.5. Evaluación de la toxicidad

6.5.1. Toxicidad Aguda

a) Luminiscencia bacteriana

La emisión de luz esta relacionada con el metabolismo celular, y la intensidad de luz refleja el estado del metabolismo de la bacteria. Cuando la bacteria luminiscente es expuesta a sustancias tóxicas, la luciferasa bacteriana puede inhibirse y la intensidad de la luz disminuirá rápidamente. Mediante la medición de la intensidad de la luz de la bacteria expuesta a la muestra problema y la comparación con un control, la inhibición puede calcular la toxicidad de sustancias sobre la bacteria luminiscente (Ma *et al.*, 2014).

La determinación de la inhibición de la luciferasa se realizará según lo reportado en la norma NMX-AA-112-1995-SCFI.

b) *Lactuca sativa*

En esta prueba se colocaron 20 semillas de lechuga en cada caja Petri y 4 mililitros de las diferentes diluciones (100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%) durante 120 horas de exposición a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Al final de la prueba se midieron las semillas y se determinó la inhibición de la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula causado por la exposición a las distintas concentraciones expresándose en concentración inhibitoria media (CI_{50}). Todas las pruebas se realizaron por triplicado (US EPA, 1996; Castillo, 2004; Bagur, 2010).

c) *Daphnia pulex*

En esta prueba de toxicidad se utilizaron neonatos menores de 24 horas de edad los cuales fueron expuestos individualmente a diferentes diluciones de la muestra a probar (100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%), por un periodo de 48 horas, al término del cual se cuantifica el número de organismos inmóviles. Con estos resultados se estableció la proporción de mortalidad producida, calculándose la CL_{50} mediante el método Probit (OECD, 2004; Tecuapetla, 2014).

6.5.2. Toxicidad crónica

a) *Daphnia pulex*

En la prueba de reproducción, se determinaron los efectos sobre la mortalidad y la capacidad reproductiva en *Daphnia*. Para este propósito, los organismos de prueba se expusieron a distintas diluciones del agua residual durante un período de veintidós días, tiempo suficiente para el desarrollo de al menos tres crías. Esta prueba se realizó con base a la Guía 211 OECD (2012).

b) *Selenastrum capricornatum*

Es un alga verde unicelular con forma de media luna, su reproducción se afecta al estar en contacto con sustancias tóxicas, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas.

El efecto de la inhibición de la población es causada por los agentes tóxicos en la muestra luego de 72 horas de exposición, bajo condiciones de temperatura controladas, se determina

comparándola con el crecimiento normal observado en un sistema libre de agentes contaminantes (controles). Dependiendo del número de concentraciones y replicas se determina la concentración letal media (CL_{50}) (Castillo, 2003; Tecuapetla, 2014). Los bioensayos se realizaron por triplicado para tener una mayor confiabilidad en los resultados.

6.7. Análisis de resultados

Para el análisis de los resultados se realizaron pruebas de ANOVA para determinar la variabilidad entre el agua residual tratada antes del biofiltro y después de él, y en el caso de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos fueron comparados con lo que marca la normatividad oficial mexicana.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Artículo de investigación

7.1.1 Correo electrónico de confirmación de recepción del artículo

2017

AECT-D-17-00025 - Submission Notification to co-author

Responder | v

Eliminar

Correo no deseado | v

...

X

AECT-D-17-00025 - Submission Notification to co-author



Archives of Environmental Contamination and Toxicology (AECT) <em@editorialmana;



Responder | v

mar 10/01, 05:49 p.m.

Usted v

Bandeja de entrada

Re: "TOXICITY BIOASSAYS FOR ASSESS EFFICIENCY OF HOSPITAL WASTEWATER TREATMENTS"

Submission ID: AECT-D-17-00025

Full author list: Araceli Chávez Amaya Chávez, Ph.D.; Samantha del Rocío Santibañez Villegas; Jorge Javier Ramirez García; Juan Carlos Sánchez Meza

Dear M. D. Santibañez Villegas,

We have received the submission entitled: "TOXICITY BIOASSAYS FOR ASSESS EFFICIENCY OF HOSPITAL WASTEWATER TREATMENTS" for possible publication in Archives of Environmental Contamination and Toxicology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Ph.D. Araceli Chávez Amaya Chávez who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Archives of Environmental Contamination and Toxicology

7.1.2 Manuscrito enviado

TOXICITY BIOASSAYS EFFICIENCY FOR THE ASSESSMENT OF HOSPITAL WASTEWATER TREATMENTS

Santibañez Villegas Samantha del Rocío, Amaya Chávez Araceli*, Ramírez García Jorge J., Sánchez Meza Juan C.

Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Química, Laboratorio de Análisis. Instrumental. Paseo Colón esquina Paseo Tollocan S/N; Colonia. Residencial Colón. Toluca, Estado de México. C.P. 50180. Tel/Fax: +52 (722) 2 17 38 90 Ext. 113. *E-mail: aamayac@uaemex.mx, ymasrocio@hotmail.com, jjramirezg@uaemex.com, jcsanchezm@uaemex.com

Abstract

The hospital wastewater is a major source of pollution containing various chemicals such as municipal wastes, disinfectants and pharmaceutical residues that are hard to remove in traditional treatments, reaching water bodies where they can cause adverse effects to living beings. Bioassays have been increasingly important in the potential toxicity assessment by their cost and relatively fast analysis without the complete chemical characterization of samples. However, there is few studies where do the determination of toxicity of wastewater from hospitals with the conventional bioassays with results satisfactory. The objective of this study was to evaluate the efficiency of four test organisms: *Lactuca sativa*, *Vibrio fischeri* (Microtox kit), *Daphnia pulex* and *Selenastrum capricornutum*, to determinate the toxicity of hospital wastewater after its treatment. A general hospital waste water treatment plant from State of Mexico, México was selected to wastewater sampling. Sample points were before (ARH) and after chlorination (ARHCl) in two periods, September-November of 2015 and March- May 2016; the bioassays of acute and chronic toxicity were performed according to EPA and OECD guidelines. For *Lactuca sativa* induction of growth was observed but was inhibited germination in all the sample tested. *Vibrio fischeri* was very sensitive to wastewater before and after chlorination, is for this reason unable to perform the toxicological evaluation. *Daphnia pulex* was not sensitive to acute exposure but there was an induction of reproduction. The growth of algae *Selenastrum capricornutum* was inhibited and IC₅₀ was calculate with values between 3.02-26%. In conclusion, *Daphnia pulex*, *Selenastrum capricornutum* and *Lactuca sativa* are efficient in evaluating hospital wastewater toxicity, while *Vibrio fischeri* not recommended for these kind of samples.

Keywords: bioassays, *Lactuca sativa*, *Daphnia pulex*, Microtox, *Selenastrum capricornutum*.

1. Introduction

Bioassays have adopted an important increase in the toxicity potential evaluation of environmental samples, because they are fast and do not need full chemical characterization of samples (Fisher et al., 2010). These tests are aimed realistic prediction of the behavior of toxic substances in the environment, which have been used to establish the levels of toxicity of pollutants from aqueous matrixes to organisms (eg surface water, groundwater, and wastewater (Li et al., 2015, Rizzo *et al*, 2011).

Bioassays contribute to the environmental risk assessment at specific points and at different stages of evaluation: (1) toxicity tests show whether contaminants are bioavailable. (2) Determine the aggregate effect of all pollutants in the environment. (3) To assess the toxicity of substances, of which do not have well-characterized its biological effect. (4) To characterize the effect nature of a toxic by sublethal studies. (5) Characterize the distribution of toxicity in a site. (6) Can be used to develop remediation measures. (7) Environmental monitoring. (8) In determining the postremediation potential to support a viable ecological community (US EPA, 1994).

Bioassays are mainly used to evaluate two types of toxicity, acute: are tests measuring short time exposure effect of chemicals at high concentrations. Endpoints generally reflects the lethality and chronic long-term study measuring the effect of exposure to relatively low concentrations. For chronic studies, measuring endpoints concern a sublethal effect (reproduction, growth) (NMX-AA-087-SCFI-2010).

Microtox, meanwhile, has the advantage of being very sensitive, reproducible and fast. The bioassay is based in bacterial bioluminiscence inhibition (*Vibrio fischeri*) for the exposition to a toxicant. It is an internationally recognized technique for different normativities as ISO 11348-3:2007 and NMX-AA-112- SCFI-2014. (Librato et al., 2010; Ye et al., 2011; Ma et al., 2014).

The Microtox kit is the test that has shown greater sensitivity and correlation with the results obtained in fish and *Daphnia*, and since 1984 it is a test recommended by EPA with daphnia test, in assessing the acute toxicity of samples of water (Solano, 2005).

The toxicity evaluation of wastewater with lettuce seeds of the species *Lactuca* is performed during the germination because first days of seedling development occurs numerous physiological processes in which the presence of a toxic substance can interfere with normal survival and development of the plant. By this reason, germination is a stage of great sensitivity to adverse external factors (Sobrero and Ronco 2008). Thus, inhibition on the elongation of the radicle and epicotyl are very sensitive as indicators for sublethal to evaluate biological effects on *L. sativa* seed germination and therefore the level of phytotoxicity (Rodríguez et al., 2014).

Unicellular algae assay is used as a water pollution control because algae are one of the most important sources of primary food in aquatic ecosystems; any alteration in the dynamics of algae can affect the highest levels of ecosystems (Ma et al., 2006; Mater et al., 2014; Yu et al., 2014).

The use of bioassay has been widely used to evaluate the toxicity of water. The Microtox kit was also used by Lin et al in 2014 to evaluate the toxicity of ketamine and norketamine and their degradation products in wastewater, increased toxicity observed in the degradation products. Meanwhile, Mater et al in 2014 evaluated the toxicity of ciprofloxacin, cyclophosphamide and tamoxifen in *Vibrio fischeri* (Microtox) and *S. capricornutum* where report that toxicity increased in the mixture of compounds of study. Magdaleno et al in 2014 evaluated the toxicity of wastewater from a hospital in Argentina finding as both an inhibitory and inducing effect on the *Selenastrum capricornutum* growth.

Furthermore the bioassay *Lactuca sativa* has been used in various evaluations wastewater, Bagur et al., 2010 used the seed to evaluate water from extracts of a mine where they found a reduction in the elongation of the radicle and germination percentage. Lutterbeck et al., 2015 used *L.sativa* to evaluate four anti-cancer compounds: Cyclophosphamide, 5-Fluorouracil, Methotrexate and Imatinib and report inhibition of germination rate for Methotrexate and Imatinib to a concentration of 3.13 mg/L. Rodriguez et al., 2014 studied six sampling points from River Chalma, two belonging to the State of Mexico (Malinalco and La Loma) and four to the state of Morelos (El Platanar , La casa de la Escuela, Tetecala and Cuautlita) where they found an induction in the growth of *L. sativa* in Mexico state sites and two sites in the state of Morelos , where they detected the most nutrients in water samples.

Zooplankton is often used in toxicity studies because it is one of the most sensitive organisms to Organic Compounds (OC) and has a central position within the food chain (Czech et al, 2014; Liu et al., 2011). Daphnids are usually used to evaluate the toxicity of chemical compounds in aquatic ecosystems because they have high sensitivity, short generation time and ease of manipulation (Ton et al., 2012) more in acute toxicity studies that chronic. Zhou *et al.*, 2015 made a work about the decreased toxicity of coking wastewater after treatment with a biological reactor and obtained an initial toxicity index of 31.9 and final of 3.1. Flhor et al., 2015 reported an increase in neonates per litter of *Daphnia magna* by exposure to the soluble fraction of industrial waste from a textile factory.

In recent years, there has been an increase in consumption and production of OC as pharmaceuticals and personal care products, disinfectants, pest control compounds (called emerging contaminants). Because of this, OC have been detected in the waste water and the environment (Czech et al., 2014; Marugan et al., 2010; Sim et al., 2013). Among the main sources of toxic substances found hospitals (Escher et al., 2011; Orias et al., 2014).

The hospital effluents contain antibiotics, analgesic and antiinflammatory, psychiatric drugs, β -blockers, anesthetics, chemical laboratory activities, contrast media for X-rays, detergents, surfactants, antiseptics, which are usually discarded in the sewer systems without any pretreatment (Verlicchi et al., 2012; Cruz et al., 2014) or with inefficient treatments for the removal of some of pollutants. In addition, hospital waste also contain hazardous residues as pathogens, contagious excreta and biological liquids (Tsakona et al., 2007; Carraro et al., 2016). This mixture is usually highly toxic, thus cause a significant impact on the environment and damage to human health (Kern et al., 2013).

The composition of hospital wastewater depends on the type of hospital, the size, the number of inpatient and outpatient, country and season.

Carraro et al., 2016 conducted a review of studies about municipal and hospital wastewater effluents to compare their composition, reported drugs, ammonium ions and coliforms in greater presence. Presence of pharmaceutical compounds can be found in larger amounts to Predicted No Effect Concentration (PNEC). There are several studies regarding the identification and quantification of pharmaceuticals in hospital wastewater in the US and China in which their presence is evidenced (Brown et al. 2006, Watkinson et al., 2009, Lin et al., 2014).

Physico-Chemical analysis may not be enough to classify the risk that can cause this kind of water when enter in the environment. Toxicity tests on acute and chronic levels are essential for assessing the environmental risks of wastewater from hospitals (Hernando et al., 2005). Bioassays also reflect the effects caused by the interaction between the compounds immersed in water (synergism , antagonism or additive effect) as well as assessing the toxicity of unknown substances , which cannot be observed with the chemical characterization of water (Yu et al., 2014).

Despite the great variety of bioassays, no specific tests have been reported to evaluate hospital wastewater samples toxicity, which should try some bioassays looking for the most suitable battery for this type of analysis.

The aim of this work was determinate the efficiency of a battery of bioassays to evaluate the toxicity of treatment wastewater from a specialized, public and medium hospital according to the WHO classification , located in the State of Mexico .

2. Materials and Methods

2.1. Description of hospital treatment plant wastewater

The study hospital is a specialized health center, which has 42 offices and a hospitalization area with 180 beds divided in seven areas: emergency-30 beds, intensive care-12, dialysis-7, shock-5, trauma and surgery-42, internal medicine-42 and nephrology-42.

The hospital uses various chemicals such as pharmaceuticals, detergents, insecticides, cleaning products, personal care products and substances for clinical diagnosis. Among the most commonly, used drugs are antibiotics (ceftriaxone, amikacin and ciprofloxaciono) analgesics (metamizol, ketorolac and tramadol), antacids (omeprazole, pantoprazole, and ranitidine), antihypertensive (captopril), diabetes control (metformin), dialysate, among others. The residues of these substances reach the residual water of the hospital.

The hospital has a treatment plant that involves three steps: Step 1- wastewater enters a tank through a grid solids retention, subsequently to a bacterial digestion chamber under anaerobic conditions. Step 2 Extended Aeration: Residual water is stirred vigorously with airflow that avoids the presence of quiet zones. Step 3: The supernatant leaves the clarification chamber and passing through a chlorination chamber with sodium hypochlorite tablets. The treatment plant discharges around 80000 L of water daily.

The hospital wastewater sampling was performed according to the US EPA, 2013 operating procedure. Two simple sample were collected, one before chlorination treatment (ARHT) and the other after this treatment (ARHTCI) Since it has been reported the formation of toxic compounds after treatment with chlorine , as the case of chloramines (Herrera et al., 2013)

The volume taken in the sampling site was 4L. Samples were taken at surface level in the morning and stored at 4°C to be process in the laboratory. Collection sample was done in three periods: September, November 2015 and April 2016. Conductivity, pH and temperature were measurement in the moment of sampling according to Mexican standards. In addition, BOD was measured (NMX - AA - 028 - SCFI - 2001) and COD (HACH) for the water before chlorination.

2.2 Toxicity assays

2.2.1 Acute toxicity

For acute toxicity studies *Lactuca sativa* bioassays, *Daphnia pulex*, and Microtox kit (reference bioassay) were tested.

Concentrations tested in all bioassays were 6.25 %, 12.5 %, 25%, 50 % and 100 % for each sample. In the case of Microtox kit, concentrations were established by the software (90 %, 45 %, 22.5 % and 11.25 %). A negative and a positive control were used, positive one for all cases, making triplicate determination,

2.2.1.1 Microtox kit

A freeze-dried strain of *Vibrio fischeri* provided by Modern Water with batch number: 14M4173 was used in the test and an equipment of the same brand model 500 in the "Basic Test" mode. The assay was performed as described in guide 209 OECD, 2010. Inhibition bioluminiscencia was assessed at 5 and 15 min and readings of the IC₅₀ and the confidence interval 95% were taken.

2.2.1.2 *Lactuca sativa*

Lactuca sativa assay was performed following the EPA guidance OCSPP 850.4230, 2012. Prior to the study we made sure they had a higher germination percentage of 90%. Five dilutions of the sample, a negative control (distilled water) and ZnSO₄ (0.05M) as a positive control were prepared. Petri boxes marked correctly , with a disc of filter paper which was wetted with 4 mL of appropriate dilution , then 20 seeds were placed in an orderly manner to allow space of about one centimeter for elongation were placed, the boxes were covered and incubated 24 ° C for 5 days. To assess the phytotoxic effects of germination inhibition, elongation of the radicle and hypocotyl was determined and the germination index (GI) was calculated by the equations reported by Hoekstra et al in 2002.

$$\text{RSG} = \frac{\text{number of seed germinated in extract}}{\text{number of seed germinated in control}} \times 100 \quad \text{RSG: relative seed growth}$$

$$\text{RRG} = \frac{\text{mean root length in extract}}{\text{mean root length in control}} \times 100 \quad \text{RRG: root relative growth}$$

$$\text{GI} = \frac{\text{RSG} \times \text{RRG}}{100} \quad \text{IG: Germination index}$$

2.2.1.3 *Daphnia pulex*

Acute toxicity assay with *D. pulex* was performed according to the OECD 202 Guide. The organisms used were infants less than 24 hours old from previously standardized crops, which were exposed individually to a different dilutions of the sample tested for a period of 48 h, after which the number of dead organisms (n= 15) is quantified. With these results the LC₅₀ was calculated by PROBIT method.

2.2.2. Chronic toxicity

Two chronic toxicity bioassays were made with *Daphnia pulex* and *Selenastrum capricornutum*. Based on the results of the acute toxicity, sublethal concentrations were tested.

2.2.1. *Daphnia pulex*

Before the study the quality of the test organisms was secured by determining the survival that must be greater than 90 %. The test was conducted as set out in the OECD 211 Guide, 2012. They were exposed for 21 days at concentrations of 6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 % and 100 %, 10 bodies each, at room temperature (18- 23 ° C), the number of infants were counted daily. At the end of the exposure time the lethal concentration, the effective concentration for reproduction and morphological changes were determined. By dose response curves the median effective concentration (EC₅₀) were calculated by the PROBIT method. ANOVA test was performed to obtain the Non-Observable Adverse Effect Concentration (NOAEC) after application of Anderson -Darling normality test. T test student was also performed to determine the existence of differences between samples (p < 0.05).

2.2.2 *Selenastrum capricornutum*

The test of green algae *S. capricornutum* was performed according to the OECD guide 201 (2011) which describes the protocol for testing algae growth inhibition. Six concentrations (100%, 50%, 35%, 25%, 12.5% and 6.25%), a negative control was a tube with the algae in the culture medium and a positive control with ZnSO₄ were tested, each in triplicate. 2.5 mL of the solution, made with the sample and buffer, were placed in 10 mL tubes, each tube was inoculated with 100 uL of algae culture, predetermined concentration, and incubated for 72 h with stirring and constant illumination to a temperature of 24 ° C ± 2. At the end a New Bauer

cell counting chamber was used to determine the percentage of culture growth. Dose response curves were used to calculate median effective concentration (EC₅₀) by the PROBIT method. ANOVA test was performed to obtain the Non-Observable Adverse Effects Concentration (NOAEC) after application of the Anderson-Darling normality test. T test student was also performed to determine the existence of differences between samples (p <0.05).

3. Results and discussion

Hospital wastewater samples showed differences in appearance and odor according to the season being the second sample, dry season where the smell and color were more intense. The first water sampling showed a slight odor and a yellowish color. The second sampling had a pervasive smell with brown color and the third showed no perceptible odor and a very light yellowish color. The results of physicochemical parameters are shown in Table 2.

Table 2. Physicochemical properties of hospital wastewater samples

Date	Sample	pH	Conductivity (µs/cm)	Temperature (°C)	BOD ₅ (mg/L BOD ₅)	COD (mg/L O ₂)	Color	Odor
Sep-15	ARHT	7.73	1770	16	44.7	179	yellowish	Light
Nov-15	ARHT-2	7.47	1133	18.4	39.77	68.75	Intense brown	Penetrating
	ARHTCI-2	7.14	1138	18.5	-	-		
Apr-16	ARHT-3	7.31	2060	19.1	134.45	340	Slightly yellow	imperceptible
	ARHTCI-3	7.22	1869	19.4	-	-		

It is observed the chlorine treatment cause a change of pH, temperature and conductivity of the wastewater. ARHT pH was slightly alkaline (7.14 to 7.73) and it was higher in the first sampling period, that because this time it did not rain while in the other samples showed light rain. Topal *et al.*, 2016 reported decreasing pH (8.2 to 7.77) of a hospital influent after going through the treatment plant which has a treatment of polishing with UV radiation, this same behavior is seen on the residual water after be chlorinated where sample decreased 0.33 units in the second sampling and 0.9 units on the third. There is a slight variation between the pH of the sample before and after chlorination, which may be related to the formation of hypochlorous acid during chlorination treatment as reported Bayo *et al.*, 2009.

The conductivity of water is an expression of its ability to conduct an electrical current, this property is related to the ionic content of the sample which in turn is a function of the concentration of dissolved solids. The conductivity shows a significant correlation with parameters such as temperature, pH, alkalinity, total solids, total dissolved solids, chemical oxygen demand and chloride (Patil *et al.*, 2012). Navneet Kumar *et al.* (2010) suggests that the quality of water can be tested effectively by controlling the water conductivity.

The conductivity was higher in the third sample having a difference of 927 ms/ cm with respect to ARHT-2 with the lowest value, indicating the highest amount of ions in the residual water.

In relation to BOD₅ in the third sampling was 3.0 and 3.4 times higher in the treated wastewater from the first and second sampling respectively, indicating the increased of bacteria presence, as the BOD₅ of water is the amount of dissolved oxygen absorbed by bacteria in the degradation of the oxidizable matter in the sample measured after 5 days (US- EPA, 1993).

COD was also higher in the third sampling 1.9 and 4.9 times respect to the first and second sampling. This property reflects the amount of dissolved oxygen required for biochemical decomposition of organic compounds and inorganic oxidation of certain materials for which the third sample contained greater amount of oxidizable compounds (Patil *et al.*, 2012). On the other hand, the values obtained for pH, conductivity and temperature are within the allowed values for municipal wastewater as described in NOM- 01-ECOL-1996 establishes the maximum permissible that pollutant discharge limits to national water bodies. While values of COD and BOD₅ are (110-160mg O₂ / L and 25- 35 mg O₂ / L respectively) above the values established by US-EPA, 1997.

3.2 Toxicity tests

3.2.1 Acute toxicity

3.2.1.2 Microtox

With the test Microtox, it could not be determined inhibitory concentration in the samples taken before and after chlorination, since the bacteria *Vibrio fischeri* was highly sensitive causing complete inhibition of bioluminescence in organisms at the lowest concentration tested (0.1%), which shows that the hospital waste water is highly toxic even after treatment with and without chlorination.

Yu *et al.* (2014) report a high toxicity to *Vibrio fischeri* caused by hospital influent and effluent. Where they evaluated sixteen water treatment plants and reported toxicity units for influent of no calculated to 1.43×10^2 and for effluent of no toxic to 1.70, highlighting that ten of the plants exceeded the toxicity limits specified by Chinese National Standards GB 21903-2008 (0.07 mg / L in terms of HgCl₂ equivalents). In this study they found a positive correlation with COD and NH₃- N (Sperman test).

Moreover, the toxicity may be due to synergistic effect by interaction between the contaminants. Seen in studies increased toxicity of pharmaceutical compounds to be mixed with other drugs, both in synthetic water and wastewater, which by the type of study sample may be related to the toxicity found for *Vibrio fischeri* (Liu *et al.*, 2014. Li *et al.*, 2015).

Likewise in an earlier study realized in a hospital effluent (Carraro *et al.*, 2016) found that the residual water of the treated hospital had an ammonium ion concentration of 9-42mg/ L, higher than that presented in the municipal residual water in the area from 0 to 28.2 mg / L. The concentration of ammonium ion may be related to degradation of the amine compounds including some drugs (Lin *et al.*, 2014).

3.2.1.2 *Lactuca sativa*

The germination index is reported to know the level of phytotoxic substances present in the treated wastewater from the hospital. Germination index was calculated from the values obtained for the control, which includes the relative percentage of germination (RPG) and the relative growth of *L. sativa* roots (RGR). In all samples the GI was found above 50%, figure 3, indicating moderate to low presence of phytotoxic substances according to the proposed scale (Hoekstra et al., 2002). There was an alteration in the induction of hypocotyl and radicle growth with thinning or kinking (figure 4).

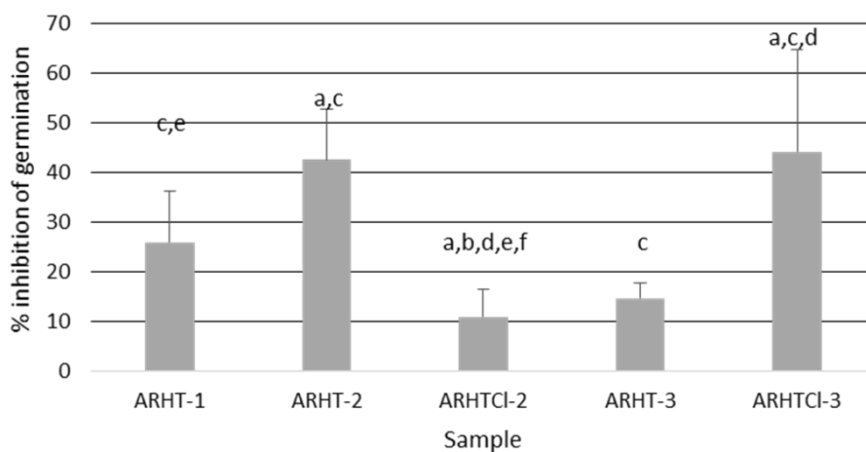


Figure 2. Effect on the germination of *Lactuca sativa* seed exposed to treated hospital wastewater at a concentration of 100%, a= ARHT-1, b= ARHT-2, c= ARHTCI-2, d= ARHT-3, e= ARHTCI-3.

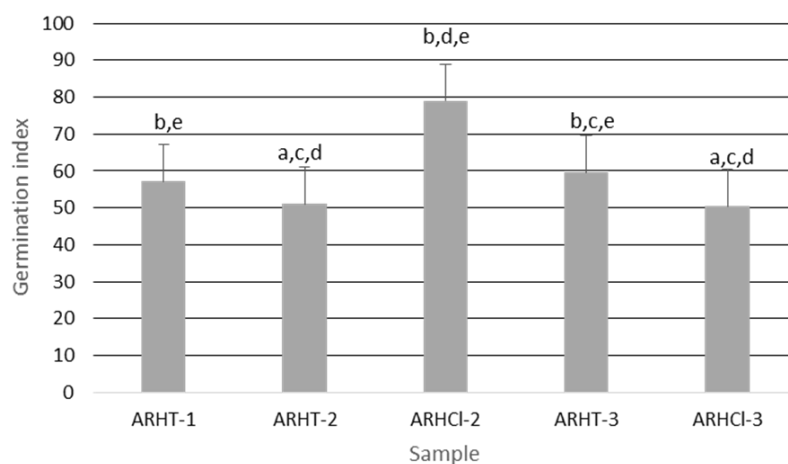


Figure 3. Index of germination of *Lactuca sativa* seed exposed to treated hospital wastewater at a concentration of 100%, a= ARHT-1, b= ARHT-2, c= ARHTCI-2, d= ARHT-3, e= ARHTCI-3.

Increased growth structures and seed germination inhibition may be related to the presence of ammonia and compounds such as phosphorus and nitrogen (Rodriguez *et al.*, 2014).

The data obtained from the wastewater samples did not show significant differences, for the inhibition of germination and growth of *L. sativa* structures, with respect to the control but it was morphological damage which was observed under the microscope (figure 4), the control structure has villi, an L-shaped morphology and the coloration of hypocotyl and radicle is white contrary to what was observed for seeds exposed to hospital wastewater where there was a decrease in villi In the radicle, the coiling of the hypocotyl and the radicle and the darkening of the radicles.

On a previous study, realized by Date *et al.*, 2005 they reported a darkening of roots by chloramines presence in wastewater bodies. On this study, it was exposed *Lactuca sativa* to 0.67 mM NH₄⁺ with different concentrations of sodium chloride (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 and 1.0 mg Cl / L), by the interaction of both compounds chloramines which caused growth inhibition and a darkening of the roots were formed. Whereby the darkening observed in this study may be related to the presence of chloramines in the wastewater.

On the other hand, as regards the physicochemical parameters, it is seen that the greater the smell and color the greater the inhibition presented by the seeds of *L. sativa*. In a study carried out by García *et al.*, In 2005 a correlation of the COD and BOD parameters with the residual water toxicity in *L. sativa* was not observed, which may be the case of the results obtained in this study where the sample with the highest inhibition of germination and lower rate of germination, has the lowest BOD and COD value.

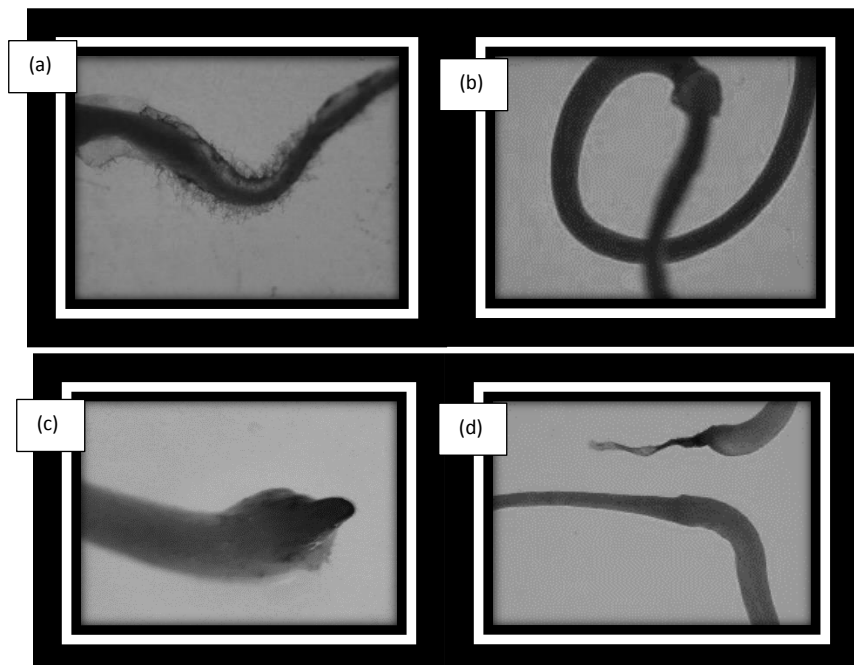


Figure 4. Morphological damage of *Lactuca sativa* germinated seeds caused by hospital wastewater exposition (a) Radicle control (b) screwing radicle and inhibition of the villi, (c) Necrosis radicle, (d) Decreased thickness radicle.

It can be seen that the effect presented in ARHT is different from the effect on ARHTCI in all sampling, allowing say *Lactuca sativa* is a good indicator for modifications toxicity seen after treatment because although germination index are very close to each ARHTCI and ARHT, germination inhibition is different, in the second sampling the germination inhibition is higher in ARHT-2 while in the third sampling the higher inhibition was present in ARHTCI-3. In addition, the variation between wastewater toxicity over time is observed.

3.2.1.3 *Daphnia pulex*

Daphnia pulex not shown to be sensitive to acute exposure to wastewater (48 hours) a concentraciones entre 6.25% y 100%.

Although mortality was not observed in the test organisms, there may be different effects to that sought in this test. Kim et al, 2012 conducted an experiment where exposed *Daphnia magna* to several wastewater samples (before, during and after treatment wastewater) in concentrations between 6.25% and 100%, where they found that although not presented mortality, there was a change in the intake of organisms and there was evidence of oxidative stress (increase enzymes catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase).

Although no acute toxicity was observed, it is possible that the damage is greater in organisms exposed to chlorinated water.

The bioassay *Lactuca sativa*, gave more information than the other bioassays proved in this study: Microtox acute toxicity kit proved to be very sensitive while *Daphnia pulex* was tolerant exposing the mixture of contaminants in the ARHT. As no inhibition of germination was found to allow LC₅₀ to be calculated, sublethal effects such as the modification of radicle and hypocotyl growth were observed (Castillo et al., 2004). Also infrastructure to perform this test is less than that required for Microtox kit and *Daphnia pulex*, on the other hands, *D. pulex* bioassay require more care than *L. sativa*, by this reason, lettuce seeds were the best bioassay to that kind of samples.

Parvez et al, 2008 conducted a comparative study of four bioassays (Microtox, *Daphnia magna*, algae and fish) where the toxicity of the following compounds was tested: o-xylene, ethylbenzene, 1,2,4-trimethyl benzene, toluene, naphthalene, n- butanol, 1-methylnaphthalene, 1,3-dimethylnaphthalene. The results showed a correlation between toxicity results obtained in the four bioassays. Also they report that the sensitivity of organisms is different for each compound, being mostly sensitive bioassay with Microtox.

3.2.2 Chronic toxicity

3.2.2.1 *Daphnia pulex*

For the case of chronic toxicity studies in *Daphnia pulex* mortality percentages after 21 days of exposure, at concentration of 100% were: ARHT-1: 50%, ARHT-2: 80% and ARHTCI-2: 86.66%, ARHT-3: 93.3% and ARHTCI-3: 70%, showing that chlorinated water is more toxic than the water before disinfection process in the second sampling, while in the third sampling adverse

effects were higher in the water prior to chlorination. The toxicity in chronic test were the following, ARHT-3 > ARHTCI-2 > ARHT-2 > ARHTCI-3 < ARHT-1.

There was a premature reproductive maturity where the organisms exposed to wastewater started to reproduce in a shorter time compared to control organisms (10-12 days for control organism and 6-7 days for exposed). Infants, meanwhile, were more and larger than control (Figure 5). In Figure 6 the infants/adults living relationship was shown, in each bar is indicated the number of live adults. Shows that there is the presence of infants in the first week in all concentrations of both ARHT and ARHTCI, despite the existence of an induction of reproduction, there was a decrease in adults living organisms. Just as in *L. sativa*, differences between the same kinds of samples were observed. The induction of reproduction was presented in the following order: ARHT-1 > ARHT-2 > ARHT-3.

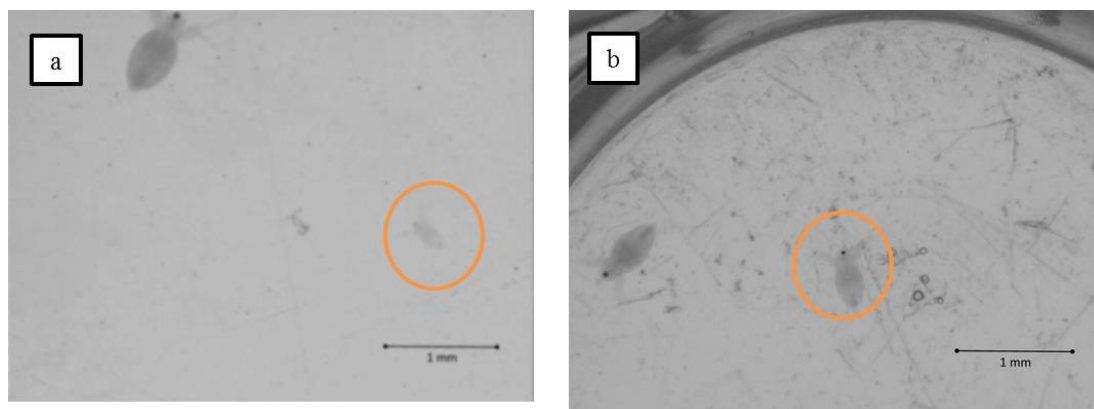


Figure 5. Image of infants exposed to hospital wastewater. a) neonate (circle) and adult control. b) neonate (circle) and adult exposed to ARHT.

Terra *et al.*, 2008 mentioned that induction in reproduction is presented as an act of conservation of the species, which could explain that the reproductive process of *Daphnia* was potentiated as answer to wastewater toxicity which caused organisms seek to reproduce in greater numbers and die at an early age (initiating the mortality of organisms at 6 days of exposure). On the other hand, Flohr *et al.*, 2012 mentioned that this behavior in organisms is due to the presence of nutrients in the wastewater, which is made possible by the high amount of organic matter in the wastewater from the hospital, coupled with this, Birkett and Lester in 2003 and Dang *et al.*, 2012 say induction of reproduction is caused by the presence of endocrine disruptors. Being the samples of residual water coming from a hospital, the presence of this type of compounds is feasible, since the consumption of hormonal compounds is common in the women.

However, Clubbs *et al.*, 2007 mentioned that *Daphnia* exposure to 17 α - ethinyl estradiol (at a concentration <0.01%), causes a delay in the first litter without showing an effect on the number of offspring, also it found that the litter size is decreased in the third generation while previous suffer no difference respect to the controls, inverse behavior to that observed in the present study where litters were presented in shorter times, with greater numbers of offspring, which had

a larger size to the control, which may be related to the interactions between the organic compounds.

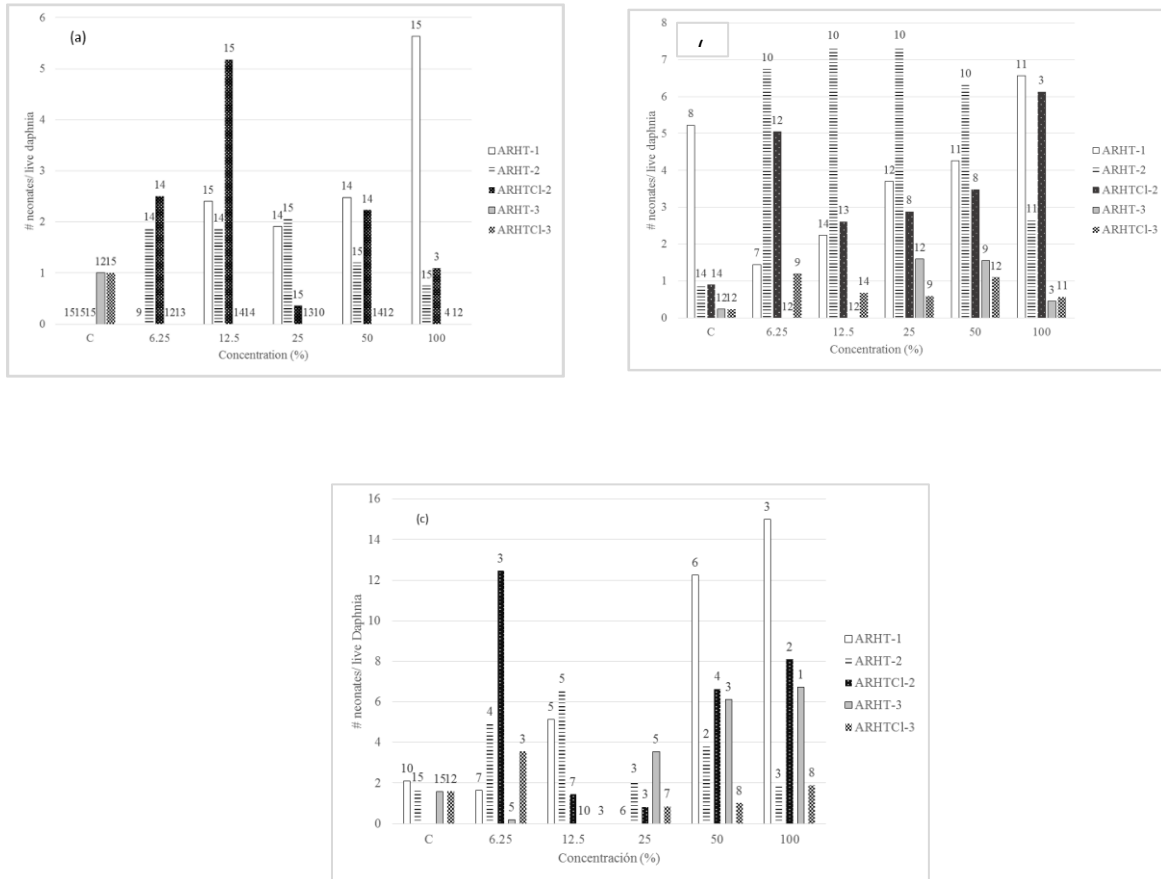


Figure 6. Induction of reproduction in *Daphnia pulex* by exposure to hospital before wastewater and after chlorination: a) First week of study, b) second week of study, c) third week of the study, d) Dimensioning data.

On the other hand, it has been reported that exposure of organisms to ibuprofen decreases the number of litters (Hayashi et al., 2008), so the effect in *Daphnia* cannot be attributed to nonsteroidal antiinflammatory drugs.

Pignata *et al.*, 2012 mentions an increase in mortality of infants by chlorination treatment, this was seen in the second sampling, where infants exposed to the wastewater after chlorination died within 48 hours whereas the neonates other treatments mostly survived until the end of the experiment.

3.3.2 *Selenastrum capricornutum*

Selenastrum capricornutum was observed that is sensitive to contaminants immersed in wastewater study. Induction was observed in the growth of *S. capricornutum* to 6.25%

concentration (in a 10%) in ARHT-1, ARHT-2 y ARHTCI-2 and an inhibition in successive concentrations. This behavior was also reported by other researchers where mention that induction of growth is due the presence of nitrogen, phosphorus and organic matter, elements that can act as growth factors, while inhibition is related to the presence of drugs and disinfectants (Magdaleno *et al.*, 2014).

For this test inhibiting concentration (IC₅₀) was calculated by the Probit method and the results were showed in table 3.

Table 3. Mean inhibitory concentrations (IC50) for *S. capricornutum*.

Sample	IC ₅₀	Confidence interval (95%)
ARHT-1	12.55%	8.36-19.31%
ARHT-2	17.74%	16.43-19.17%
ARHTCI-2	26.59%	12.55-29.22%
ARHT-3	3.06%	0.67-13.87%
ARHTCI-3	10.97%	4.04-29.47%

In this case, a remarkable difference was also observed in IC₅₀ values, ARHT-3 was more toxic than the first and second sampling. Reduced of toxicity by chlorination treatment was presented, this can be attributed to the removal of microorganisms. In both cases an increase was observed in the cell size. The inhibition of growth presented in this study was, from highest to lowest, the following: ARHT-3> ARHTCI-3> ARHT-1> ARHT-2> ARHTCI-2.

Toxicity in this organism may be due to the presence of ammonium ions in high concentrations (Emmanuel *et al.*, 2004, Perrodin *et al.*, 2013). In a study from France (Perrodin *et al.*, 2016) there were variations between different sampling periods where inhibitory concentrations (CI₂₀) were between 4.1% and 25.5%, similar to the effect observed in this study, where the sampling periods they showed differences in toxicity in *S. capricornutum*. As a result, the seasonal fluctuations that occur in wastewater and how they affect organisms are evident.

Liu *et al.*, 2011 evaluated the toxicity of three antibiotics, which inhibit electron transport, photophosphorylation and carbon uptake by algae. Contrasting these results with those observed in the present study, mortality may be given by the high use of antibiotics in the hospital as ciprofloxacin.

Contrasting this bioassay with Microtox, reference bioassay, we can see that the median inhibitory concentrations found for the samples studied, in most cases, are very small, although it was possible to calculate a value, also observed water is toxic as in *Vibrio fischeri*. Yu *et al* (2012) conducted a study where they compared a strain of *V. fischeri* with unicellular alga, obtaining a positive correlation between the results of both organism.

Test t- Student (p <0.05) was performed for each sample where observed no significant differences between the toxicity of residual water before and after chlorination, in any of the organisms, showing that there is not an improvement by treatment with sodium hypochlorite.

Comparing the four bioassays it can be seen that in the case of *Vibrio fischeri*, toxicity caused by the samples was very high so it could not be calculated toxicity. While for *Lactuca sativa* and *Selenastrum capricornutum* chlorinated water was the least toxic, but in the case of *Daphnia pulex*, ARHT-2 was less toxic, reflecting that there is a difference in sensitivity of organisms and is indispensable for determining the toxicity of effluent hospital employing more than one organism of study.

5. Conclusions

Toxic wastewater resulted in all bioassays. Microtox was very sensitive to the hospital wastewater with the test "Basic Test". The wastewater induces growth of lettuce seeds but present toxic morphological effects. No adverse effect on *Daphnia pulex* by acute exposure to hospital wastewater was observed. However, effects were presented at chronic exposure to reproductive and developmental level. The hospital wastewater causes an acceleration in reproductive maturity of *Daphnia pulex* and an increase in litter size. The hospital wastewater inhibits growth of *Selenastrum capricornutum* at 50% of the population at low concentrations (3.03-26%). *Lactuca sativa* proved to be the best test organism for evaluation of acute toxicity while for chronic toxicity it was *Daphnia pulex*. The development of chronic studies is important to determine the toxicity of the wastewater effluent from hospital.

Reference

1. Bagur GMG, Estepa MC, Martín PF, Morales RS (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *J Soils Sediment* 11(2), 281-289. doi 10.1007/s11368-010-0285-4
2. Bayo J, Angosto JM, Gómez LMA (2009) Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by *Vibrio fischeri* bioassay after a chlorination–dechlorination process. *J Hazard Mater* 172, 166-171. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.06.157
3. Birkett J.W., Lester J.N. (2002) *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Lewis Publishe, London.
4. Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci Total Environ* 366, 772-783. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.10.007
5. Carraro E, Bonetta SB, Lorenzi E, Bonetta S, Gilli G (2016) Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *J Environ Manage* 168, 185-199. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.11.021
6. Castillo MG (2004) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo, Mexico.

7. Clubbs RL, Brooks BW (2007) *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotox Environ Safe* 67(3), 385-398. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.01.009
8. Cruz MC, Lucas D, Llorca M, Rodríguez MS, Gorga M, Petrovic M, Barceló D, Vicent T, Sarrà M, Marco UE (2014) Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *Sci Total Environ.* 493, 365-376. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.117
9. Czech B, Josko I, Oleszczuk P (2014) Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals in *Vibiofischeri* and *Daphnia* before and after photooxidation process. *Ecotox Environ Safe* 104, 247-253. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.024.
10. Dang ZC, Cheng Y, Chen H, Cui Y, Yin H, Traas T (2012) Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors. *Chemosphere* 88, 514- 523. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.012.
11. Date S, Terabayashi S, Kobayashi Y, Fujime Y (2005) Effects of chloramines concentration in nutrient solution and exposure time on plant growth in hydroponically cultured lettuce. *Sci Hortic-Amsterdam* 103 (3), 257-265. doi: 10.1016/j.scienta.2004.06.019
12. Escher B, Baumgartner R, Koller M, Treyer K, Judit L, McArdell C (2011) Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res* 45, 75-92. doi:10.1016/j.watres.2010.08.019
13. Fisher, JC, Belden, JB, Bidwell, JR (2010) Cansite-specific heuristic models predict the toxicity of produced water? *Chemosphere* 80, 542- 547. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.040
14. Flohr L, Borges CJA, Gerson MW (2012) Acute and Chronic Toxicity of Soluble Fractions of Industrial Solid Wastes on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *The Scientific World Journal*, Article ID 643904, 10 pages. doi:10.1100/2012/643904
15. García GV, Sánchez MJC, Pacheco SVF, Ávila GCJ, Pavón STB, Guerrero GP (2005) Respuestas de toxicidad de bioensayos empleados en la evaluación de aguas residuales de la industria. *Memories. Universidad Autónoma del Estado de México, México.*
16. Hayashi Y., Heckmann L.H., Callaghan A, Sibly R.M. 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 17, 246- 251.
17. Hernando MD, Fernández AAR, Tauler R, Barceló D (2005) Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358-366. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.012
18. Herrera C (2013) Métodos de remoción y degradación de antibióticos en medio acuoso. *Dissertation. Universidad Autónoma del Estado de México.*

19. Hoekstra NJ, Bosker T, Lantinga EA (2002) Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agric Ecosyst Environ* 93, 189-196. doi:10.1016/s0167-8809(01)00348-6
20. ISO (2007) ISO 11348-3:2007 Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria. International Organization for Standardization. Switzerland
21. Kern DI, Schwaickhardt RO, Mohr G, Lobo EA, Kist LT, Machado EL (2013) Toxicity and genotoxicity of hospital laundry wastewaters treated with photocatalytic ozonation. *Sci Total Environ* 443, 566-572. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.023
22. Kim SB, Kim WK, Chounlamany V, Seo J, Yoo J, Jo HJ, Jung J (2012) Identification of multi-level toxicity of liquid crystal display wastewater toward *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *J Hazard Mater* 227- 228, 327- 333. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.05.059
23. Kumar N, Sinha DK (2010) Drinking water quality management through correlation studies among various physicochemical parameters: A case study. *International Journal of Environment Sciences*, 1(2), 253-259.
24. Li SW y Lin AY (2015). Increased acute toxicity to fish caused by pharmaceuticals in hospital effluents in a pharmaceutical mixture and after solar irradiation. *Chemosphere* 139, 190-196. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.06.010.
25. Libralato G, Annamaria VG, Francesco A (2010) How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. *Ecotox Environ Safe* 73, 1602-1611.
26. Lin YCA, Lee WN, Wang XH (2014) Ketamine and the metabolite norketamine: Persistence and phototransformation toxicity in hospital wastewater and surface water. *Water Res* 53, 351- 360. doi: 10.1016/j.watres.2014.01.022
27. Liu B, Nie X, Liu W, Snoeijs P, Guan C, Tsui MTK (2011) Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotox Environ Safe* 74, 1027-1035. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.01.02
28. Lutterbeck CA, Kern DI, Machado EL, Kummerer K (2015) Evaluation of the toxic effects of four anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse for irrigation. *Chemosphere* 135, 403- 410. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.019
29. Ma Y, Wang X, Ngo H, Guo W, Wu M, Wang N (2014) Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Sci Total Environ* 468-469, 1-11. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.028
30. Magdaleno A, Juárez AB, Dragani V, Saenz ME, Paz M, Moretton J (2014) Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. *Journal of Toxicology*. doi: 10.1155/2014/248461

31. Marugan J, Achilleos A, Hapeshi E, Xekoukoulotakis NP, Mantzavinos D, Fatta KD (2010) Factor affecting diclofenac decomposition in water by UV-A/TiO₂ photocatalysis. *Chem Eng J* 161, 53-59. doi:10.1016/j.cej.2010.04.020
32. Mater N, Geret F, Castilho L, Faucet MV, Albasi C, Pfohl LA (2014) In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. *Environ Int* 63,191-200. doi: 10.1016/j.envint.2013.11.011
33. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (2000) NMX-AA-093-SCFI-2000. Análisis de agua - Determinación de la conductividad electrolítica - Método de prueba. México.
34. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (2010) NMX-AA-087-SCFI-2010. Análisis de agua – Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea -Cladocera) - Método de prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México
35. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial NMX-AA-008-SCFI-2011. Análisis de agua - Determinación del pH -método de prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México
36. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial NMX-AA-007-SCFI-2013. Análisis de agua – Medición de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México
37. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial NMX-AA-112- SCFI-2014 Análisis de agua y sedimentos- Evaluación de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*- Método de prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México
38. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (1996). NOM- 001- SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
39. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2002). OECD Guidelines for the testing of chemicals, No. 201: “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test” Organisation for Economic Co-operation and Development, France.
40. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2004) OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 202: “*Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test”. Organisation for Economic Co-operation and Development, France.
41. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2012) OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 211: "*Daphnia magna* Reproduction Test". Organisation for Economic Co-operation and Development, France.
42. Orias F y Perrodin Y (2014) Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere* 115, 31-39. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.016

43. Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S (2008) Toxicity assessment of organic pollutants: Reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. *Toxicol Vitro* 22, 1806–1813. doi:10.1016/j.tiv.2008.07.011.
44. Patil. P.N, Sawant. D.V, Deshmukh. R.N., 2012. Physico-chemical parameters for testing of water – A review. *International Journal of Environmental Sciences* 3 (3), 1194- 1207.
45. Perrodin Y., Bazin C., Orias F., Wigh A., Bastide T., Berlioz B.A., Vulliet E., Wiest L., 2016. posteriori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital *Chemosphere* 144, 440-445. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.075
46. Perrodin Y., Bazin C., Sylvie B., Alain D., Jean J.B.K., Cécile C.O., Audrey R., Elodie B., 2013. A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital. *Chemosphere* 90, 1037–1046. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.08.049
47. Pignata C., Fea E., Rovere R., Degan R., Lorenzi E., Ceglia M., Schilirò T., Gilli G., 2012. Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body. *Environ Monit Assess*, 184, 2091-2103. doi 10.1007/s10661-011-2102-y
48. Rizzo L (2011) Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res* 45, 4311- 4340. doi:10.1016/j.watres.2011.05.035
49. Rodríguez RAJ, Robles SCA, Ruíz PRA, López LE, Sedeño DJE, Rodríguez DA (2014) Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del río Chalma. *Rev Int Contam Ambient* 30 (3) 307-316.
50. Sim WJ, Kima HY, Choic SD, Kwond JH, Oha JE (2013) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water. *J Hazard Mater* 248-249, 219-227.
51. Sobrero MC y Ronco A (2008) Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
52. Solano M (2005). Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc. Dissertation, Universidad de Murcia.
53. Terra NR, Feiden IR, Fachel JMG, Lemo CT, Nunes EA (2008) Ecotoxicological evaluation of sediment and water samples from Sinos River, Rio Grande do Sul, Brazil, using *Daphnia magna* and V79 cells. *Acta Limnol. Bras*, 20 (1): 633- 72.
54. Ton SS, Chang SH, Hsu LY, Wang MH, Wang KS (2012) Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay. *Environ Pollut* 168, 54-61. doi: 10.1016/j.envpol.2012.04.008

55. Topal M, Uslu SG, Obek E, Arslan TEI (2016) Investigation of relationships between removals of tetracycline and degradation products and physicochemical parameters in municipal wastewater treatment plant. *J Environ Manage* 173, 1-9. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.02.046
56. Tsakona M, Anagnostopoulou E, Gidarakos E (2007) Hospital waste management and toxicity evaluation: A case study. *Waste Manage* 27, 912-920. doi: 10.1016/j.wasman.2006.04.
57. US- EPA, 1993. Parameters of water quality: interpretations and standards. United States Environmental Protection Agency, Ireland.
58. US- EPA, 1994. Using Toxicity Tests in Ecological Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency, Washington DC.
59. US- EPA, 1997. Wastewater treatment manual. Primary, secondary and tertiary treatment. United States Environmental Protection Agency, Ireland.
60. US- EPA, 2013 Operating procedure wastewater sample. United States Environmental Protection Agency, Athens Georgia.
61. Verlicchi, P, Al AM, Galletti A, Petrovic M, Barcelo D (2012) Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ* 430, 109-118. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.055
62. Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD (2009) The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci Total Environ* 407, 2711-2723. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.059
63. WHO Geneva, 2014. World Health Organisation. Safe Management of Wastes from Health-care Activities, 2nd edition.
64. Ye Z, Zhao Q, Zhang M, Gao Y (2011) Acute toxicity evaluation of explosive wastewater by bacterial bioluminescence assays using a freshwater luminescent bacterium, *Vibrio qinghaiensis* sp. *J Hazard Mater* 186 (2-3), 1351-1354. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.013
65. Yu X, Zuo J, Li R, Gan L, Li Z, Zhang F. (2014) A combined evaluation of the characteristics and acute toxicity of antibiotic wastewater. *Ecotox Environ Safe* 106, 40-45. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.035
66. Zhou S, Watanabe H, Wei C, Wang D, Zhou J, Tatarazako N, Masunaga S, Zhang Y (2015) Reduction in toxicity of coking wastewater to aquatic organisms by vertical tubular biological reactor. *Ecotox Environ Safe* 115, 217–222. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.02.017

7.2. Caracterización de la planta tratadora de aguas residuales

La planta tratadora de aguas residuales del hospital de estudio está conformada por siete etapas:

1) Predigestión anaeróbica: Los efluentes son conducidos a través de colectores hacia una cámara que da comienzo a una digestión bacteriana en condiciones anaeróbicas con la consiguiente reducción en la demanda biológica de oxígeno. A la entrada de la cisterna pasarán a través de una rejilla de retención de sólidos no biodegradables o criba de apertura.

2) Entrada a la planta: Las aguas de la cisterna anaeróbica pasan por bombeo o por gravedad a la planta de tratamiento.

3) Aireación extendida: Al entrar a la planta de tratamiento propiamente dicha, las aguas van avanzando por gravedad a través de sucesivas cámaras de aireación. En todas ellas encuentran agitación y una enérgica corriente de aire que evita la presencia de zonas quietas. La interacción entre las microburbujas de aire y la materia disuelta y suspendida en las aguas va dando lugar a la generación y desarrollo de colonias bacterianas que se alimentan del material biológico y orgánico que va entrando al proceso. Estos lodos activados son los responsables de la reducción más enérgica en el contenido biológico del influente.

4) Clarificación y sedimentación: A continuación, el licor mixto de las cámaras de aireación pasa a cámaras de clarificación, en las cuales no se verifica ningún tipo de agitación. Allí hay un desdoblamiento entre los lodos activados por una parte, que precipitan al fondo de dichas cámaras por acción gravitatoria.

5) Desinfección: El sobrenadante sale de las cámaras de clarificación y pasa por un clorador de tabletas de hipoclorito de sodio en el que tiene lugar la desinfección final y el abatimiento prácticamente total de la demanda biológica de oxígeno.

6) Recirculación de los lodos: Los lodos activados, precipitados al fondo de las cámaras de clarificación, son succionados por elevadores de lodos que vuelven a introducir la suspensión concentrada nuevamente en cámaras de aireación, lugar donde la fuerte aireación vuelve a reproducir y a reciclar el mismo proceso que se describió previamente.

7) Filtración y esterilización: El agua tratada por la planta parcialmente se filtra a través de un filtro de lecho profundo, uno de polvo de carbón activado y un germicida de luz ultravioleta. Una vez terminado este tratamiento el agua se almacenará en una cisterna separada, de la cual se bombea a su uso final.

En la figura 3 se esquematizan las etapas de la planta tratadora del hospital de estudio.

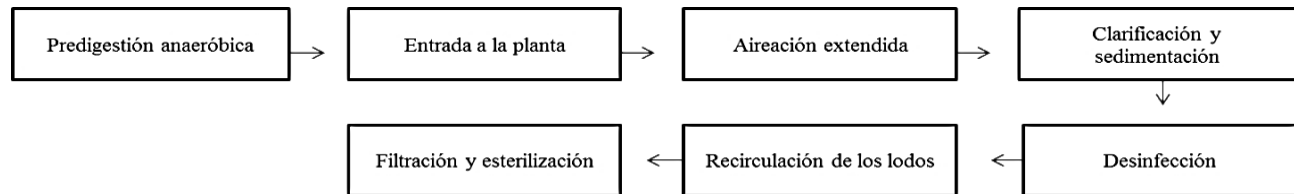


Figura 3. Planta tratadora de aguas residuales del hospital de estudio.

Se puede observar que no existe un paso dentro del tratamiento de la planta que este diseñado para la remoción de contaminantes orgánicos recalcitrantes como son los fármacos, detergentes, entre otros.

El hospital de estudio, descarga alrededor de 80000 litros de agua diarios de los cuales una fracción se libera al sistema de acantarillado municipal mientras que otra fracción se utiliza como agua de riego, de aquí la necesidad de hacer estudios de toxicidad tanto en organismos acuáticos como en terrestres.

7.3 Muestreo

Se realizaron tres muestreos en los cuales, las muestras se colectaron de la cámara de clarificación y sedimentación, teniendo un volumen de 15 L de agua y colectándose de una profundidad de 50 cm. Las muestras se resguardaron en una hielera para su transporte al laboratorio y se refrigeraron hasta su análisis por un tiempo menor a 48 horas.

El primer muestreo se realizó el lunes 29 de septiembre de 2015, en condiciones de poca lluvia y temperaturas moderadamente frías. La planta tratadora de aguas residuales estaba en mantenimiento por lo que solo contaban con una bomba de aireación en lugar de tres.

La fecha del segundo muestreo fue Noviembre del 2015, con temperaturas cálidas y la planta de tratamiento en correcto funcionamiento.

El último muestreo se tomó el 07 de Marzo del 2016, después de un periodo de lluvias.

Posteriormente, se realizaron las pruebas fisicoquímicas.

7.4 Propiedades Fisicoquímicas y microbiológicas

Los parámetros fisicoquímicos para el agua residual hospitalaria muestreada y el agua residual tratada con zeolita fueron realizados por un laboratorio certificado (Centro de Investigación de Recursos del Agua), según lo marcado en la NOM- 001-SEMARNAT-1996 y NOM-003-SEMARNAT-1997. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. Los resultados se contrastaron con diversas normas para calidad del agua, al pie de la tabla se indica a que norma pertenece el valor de referencia empleado para cada parámetro. Con color verde se indican los valores dentro de los valores de referencia y en rojo los valores que sobrepasan lo indicado por la normatividad.

Tabla 6. Pruebas fisicoquímicas del agua residual hospitalaria tratada y el agua residual tratada con zeolita.

Parámetro	Primer periodo			Segundo periodo			Valor referencia	Unidades
	ARHT	ARHZ	% de cambio	ARHT	ARHZ	% de cambio		
Temperatura	16.7	26	55.68	19.1	21.6	13.09	40**	°C
pH	7.76	7.97	2.70	7.31	7.84	7.25	6-9**	
Conductividad	1.77	1.75	1.13	2.06	2.06	-	8.0**	mSiemen s/cm
DBO	44.70	25.29	43.42	39.77	16.99	57.98	200*	mg/L DBO ₅

DQO	179	127.75	28.63	68.75	38.5	78.57	360***	mg/L O ₂
Grasas y aceites	24.68	13.22	46.43	N.D	137.36	137.36	25*	mg/L G y A
Sólidos suspendidos totales	59	31	47.46	25	68	172	200*	mg/L SST
Sólidos sedimentables	<1	<1	-	<0.1	<0.1	-	2*	mL/L

*NOM-001-SEMARNAT-1996- Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

**NOM-031-ECOL-1993- que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales de servicios y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal.

***NOM-073-ECOL-1994, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las industrias farmacéutica y farmoquímica.

Solo se realizó la determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas en dos de los tres muestreos. Los resultados se muestran en la tabla 6 y 7.

En el caso de la temperatura, existió un aumento debido a las condiciones del tratamiento y esto trajo consigo un aumento en el pH del agua después de tratada con la zeolita.

El pH del ARHT fue ligeramente alcalino (7.31 y 7.76) siendo mayor en la primer época de muestreo. Topal et al., 2016 reporta la disminución del pH (8.2 a 7.77) de un influente hospitalario después de pasar por la planta tratadora la cual cuenta con un tratamiento de pulimiento con radiación UV donde aumenta el valor de pH, este comportamiento es contrario al que se presenta por el tratamiento con zeolita esto puede estar relacionado con la absorción de contaminantes por el tratamiento de adsorción contrario a lo que pasa en el tratamiento UV donde se descomponen los compuestos formando otros.

Para ambos muestreos se puede observar una reducción de DBO, DQO, grasas y aceites y sólidos suspendidos totales entre ambos muestreos esto está relacionado con las condiciones climáticas y la carga de compuestos que existe en las diferentes muestras. Aunado a esto, en

ambos muestreo el tratamiento con zeolita disminuyó dichos parámetros exceptuando las grasas y aceites y los sólidos suspendidos totales, los cuales se vieron aumentados con los siguientes porcentajes: 137.36% y 172%, esto puede deberse a la existencia de surfactante libre en la superficie de la zeolita así como a la separación de la muestra después del contacto con el material adsorbente donde puede haberse pasado partículas de zeolita al agua residual antes de ser analizada.

La disminución de los parámetros antes mencionados refleja la capacidad de la zeolita para absorber los compuestos orgánicos ya que el DQO y el DBO se relaciona con la cantidad de compuestos oxidables disueltos en el agua residual los cuales al disminuir los valores de estas pruebas reflejan la disminución de ellos (US EPA, 1993; Patil et al., 2012).

En cuanto a la conductividad se observa que fue mayor en el segundo muestreo con respecto al primero, por lo que la cantidad de iones fue menor para el primer muestreo. En el caso del tratamiento con zeolita no hubo una diferencia notable para lo que indica que la cantidad de iones en el agua no se disminuyó. La conductividad muestra una correlación significativa con parámetros como temperatura, pH, alcalinidad, sólidos totales, sólidos disueltos totales, la demanda química de oxígeno y cloruro (Patil et al., 2012), Kumar et al (2010) sugiere que la calidad del agua se puede comprobar de manera efectiva mediante el control de la conductividad del agua pero en este caso no habría una mejora en la calidad del agua.

Por otro lado, en el segundo periodo, los resultados para DBO y DQO disminuyeron como en el primer caso en porcentajes de 57.98% y 78.57%. A pesar de esto, las grasas y aceites y los sólidos suspendidos totales se vieron aumentados con los siguientes porcentajes: 137.36% y 172%, esto puede deberse a la existencia de surfactante libre en la superficie de la zeolita así como a la separación de la muestra después del contacto con el material adsorbente donde puede haberse pasado partículas de zeolita al agua residual antes de ser analizada.

En el caso de los parámetros microbiológicos, los coliformes fecales y coliformes totales disminuyeron en porcentajes elevados (95% y 99%).

Por lo tanto, el material zeolítico modificado con hexadeciltrimetilamonio tiene la capacidad de captar compuestos orgánicos disminuyendo así los parámetros de DQO y DBO, aunado a esto se observa la capacidad de la zeolita para disminuir microorganismos en el agua residual

hospitalaria.

Tabla 7. Parámetros microbiológicos del agua residual hospitalaria

Parámetro	Primer muestreo		% de cambio	Segundo muestreo		% de cambio	Valor referencia	Unidades
	ARHT	ARHZ		ARHT	ARHZ			
Coliformes totales	1,600,000	220,000	86.25	1400	<200	95	20,000 [^]	NMP/100 mL
Coliformes fecales	170,000	49,000	71.18	400	<200	>99.28	1,000 [°]	NMP/100 mL

NMP/100mL= número más probable en 100 mililitros.

[^]NOM-003-SEMARNAT-1997- que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

[°]NOM-073-ECOL-1994, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las industrias farmacéutica y farmoquímica.

7.5 Estudio de Toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Se obtuvo un lote de semillas de lechuga de *Lactuca sativa* de la marca ITSCO, el cual presentó un porcentaje de germinación mayor al 90% por lo cual se aceptó para realizar las pruebas de toxicidad.

Se probaron cinco diluciones porcentuales de la muestra: 6.25, 12.5, 25, 50 y 100%. Posteriormente se midieron la longitud de la radícula y el hipocotilo de las semillas expuestas a las diferentes diluciones de estudio.

Se calcularon los índices de Germinación (IG) integrando el Porcentaje Relativo de Germinación (PRG) y el Crecimiento Relativo de Raíces (CRR) como reporta Cano y colaboradores (2014). El IG es un indicador del potencial fitotóxico de una muestra, el cual establece tres niveles de fitotoxicidad: severa, moderada y baja o nula. Zucconi y colaboradores en 1981 establecieron lo siguiente: valores de $IG \geq 80\%$ indican que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy bajas concentraciones, un valor entre 50 80% refleja una presencia moderada de sustancias fitotóxicas

y valores de $IG \leq 50\%$ significa que existe una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas y. Las fórmulas empleadas para el cálculo de PGR, CRR e IG se muestran a continuación:

$$PGR = \frac{\text{No. semillas germinadas con extracto}}{\text{No. semillas germinadas control}} \times 100 \quad IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

$$CRR = \frac{\text{Enlongación de la radícula con extracto}}{\text{Enlongación de la radícula con control}} \times 100$$

7.5.1 Primer muestreo

Los resultados obtenidos para las diluciones evaluadas se muestran en la figura 2 donde se observa que el índice de la germinación en el caso del ARTH para la concentración de 6.25% es mayor a la germinación presentada por el control, mientras que en los demás casos se ve una disminución del IG a medida que la concentración aumenta, exceptuando el caso de 25%. A pesar de esto, el IG en estos los casos es del 50% al 79% lo cual refleja la presencia moderada de sustancias fitotóxicas en el agua residual.

Para el caso del tratamiento con zeolita modificada con HDTMA, se observa un decremento en el valor de IG conforme incrementa la concentración del agua residual, para la concentración de 6.25% se observa una IG mayor al 100% lo cual puede deberse a que las semillas están consiguiendo nutrientes del agua residual por lo que se produce una inducción del crecimiento y por ende del índice de germinación (Rodríguez et al., 2014). Por otro lado, a partir de la concentración de 12.5 el índice de germinación está entre 50% y 80% lo que propone la presencia moderada de sustancias tóxicas por lo que la remoción de contaminantes después del tratamiento no afectó el índice de germinación. Sin embargo, en la concentración de 100% se presentó un índice de germinación menor al 50% lo que significa que existe una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas en el agua residual a pesar del tratamiento posterior con zeolita. A pesar de esto, la disminución del índice de germinación puede deberse a la disminución de contaminantes, por la adsorción de éstos por la zeolita, que podían ser utilizados como fuente de nutrientes. Por otro lado, la adsorción de algunos compuestos inmersos en el agua residual pueden causar una mayor disponibilidad de otros contaminantes, lo cual puede relacionarse con el decremento del índice de germinación en el caso de la concentración de 100%.

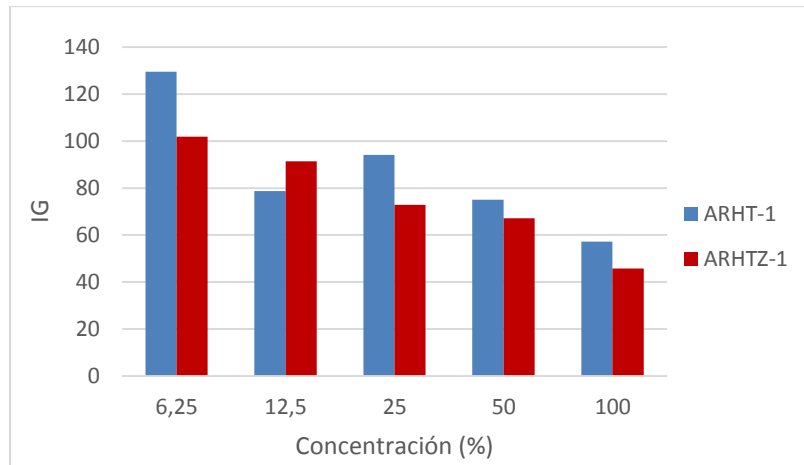


Figura 4. Índice de germinación de *Lactuca sativa* para el primer muestreo.

Se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación obteniendo para ARHT una inhibición del 10% para 6.25% y posteriormente se mantuvo la inhibición con un porcentaje promedio de 31%, como se muestra en la figura 3.

Se puede observar que a la concentración más baja se presenta una inducción en la germinación de las semillas, esto puede ser debido a la menor cantidad de contaminantes por la dilución de la muestra lo cual deje más biodisponibles a los compuestos presentes en el agua que puedan actuar como nutrientes favoreciendo así el crecimiento de la planta y por ende aumentando el Índice de germinación.

El crecimiento de la radícula se vio inducido por el agua residual, en la figura 4 se observa que a mayor concentración la inducción es menor. Sin embargo, se observa un comportamiento inverso en el crecimiento del hipocotilo, donde a mayor concentración mayor la inducción sobre la longitud.

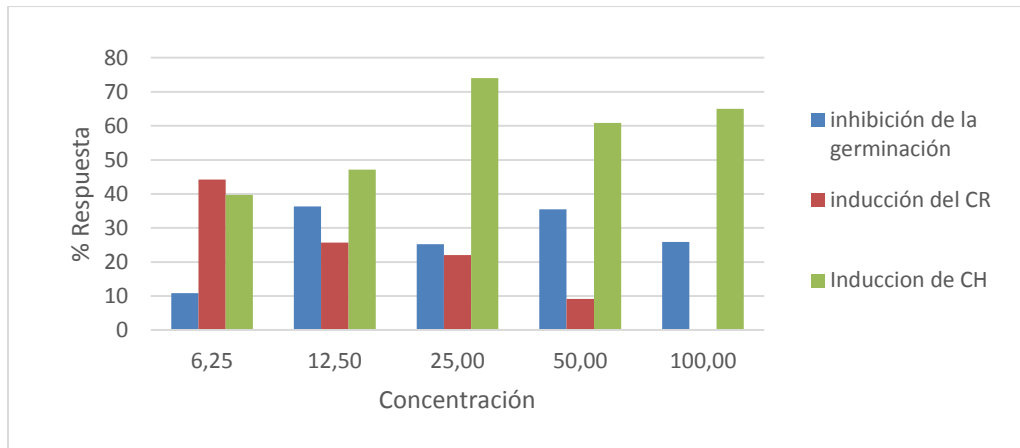


Figura 5. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria antes de la cloración- primer muestreo. CR= crecimiento de la radícula, CH= crecimiento del hipocotilo.

En el caso del agua después del tratamiento con zeolita (ARHTZ), la inhibición de la germinación incremento proporcionalmente al aumento de la concentración, manteniéndose constante después de la concentración de 25% con una inhibición máxima de 41.94%, como se muestra en la figura 4.

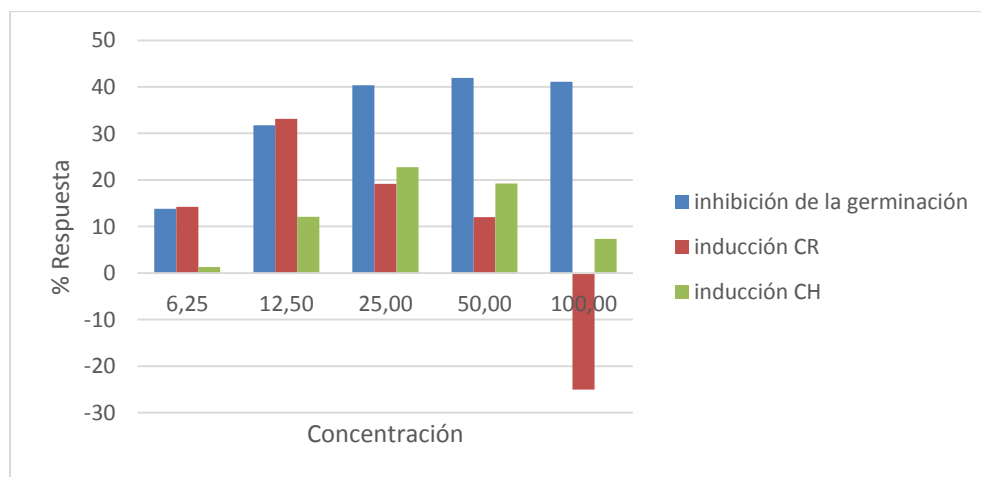


Figura 6. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria después del tratamiento con zeolita modificada- primer muestreo.

Por otro lado, para ARHTZ hubo una inducción en el crecimiento tanto de la radícula como el hipocotilo. Para la radícula, aumentó la inducción de 6.25 a 12.5% pero después disminuyó al aumentar la concentración y en la concentración de 100% se observó una inhibición del crecimiento de la radícula de 25%. El hipocotilo, presentó un comportamiento tipo campana de Gauss siendo la mayor inducción de 22.75% a la concentración de 25% lo cual puede deberse a la alta presencia de contaminantes debido a que la muestra está concentrada y por otro lado a que al pasar por el tratamiento con la zeolita la materia orgánica y los sólidos suspendidos se retuvieron causando así un aumento en la biodisponibilidad de los compuestos tóxicos para los organismos (Rizzo et al., 2015).

A pesar, de que se presenta una inducción en el crecimiento de la semilla de lechuga, se observó necrosis en los cotiledones y enroscamiento de la radícula como se muestra en la figura 5, lo cual refleja que existe un daño morfológico sobre *Lactuca sativa*.

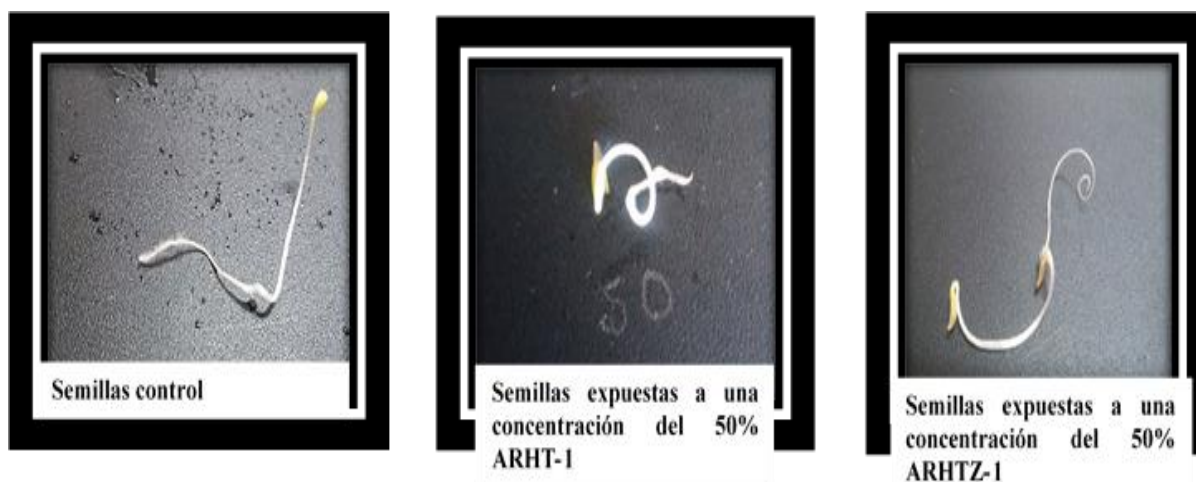


Figura 7. Cambios morfológicos en las semillas germinadas- primer muestreo.

7.5.2 Segundo muestreo

En este caso, se incluyó el estudio de la toxicidad del agua residual hospitalaria después de la cloración.

Los índices de germinación para ARHT, ARHTZ y ARTHCl se presentan en la figura 6 donde se observa que para ARHT el índice de germinación es muy cercano entre las concentraciones probadas (53-59%), al ser todos los índices de germinación mayores al 50%, tomando la

referencia de Zucconi y colaboradores (1981) existe una presencia moderada de sustancias fitotóxicas.

Para ARHTZ se observa que el índice de germinación se mantiene entre 65 y 73 en las concentraciones de 6.25% a 25% pero aumenta hasta un 116 a la concentración de 50% y vuelve a disminuir en 100% con un IG de 80. Por lo cual en este caso existe una moderada presencia de sustancias fitotóxicas (Zucconi et al., 1981).

ARHCl en contraste con las dos muestras anteriores, presenta índices de germinación mayores al 80%, excepto en la concentración de 100% el cual tiene un IG de 78, por lo cual en este caso no hay presencia de sustancias fitotóxicas

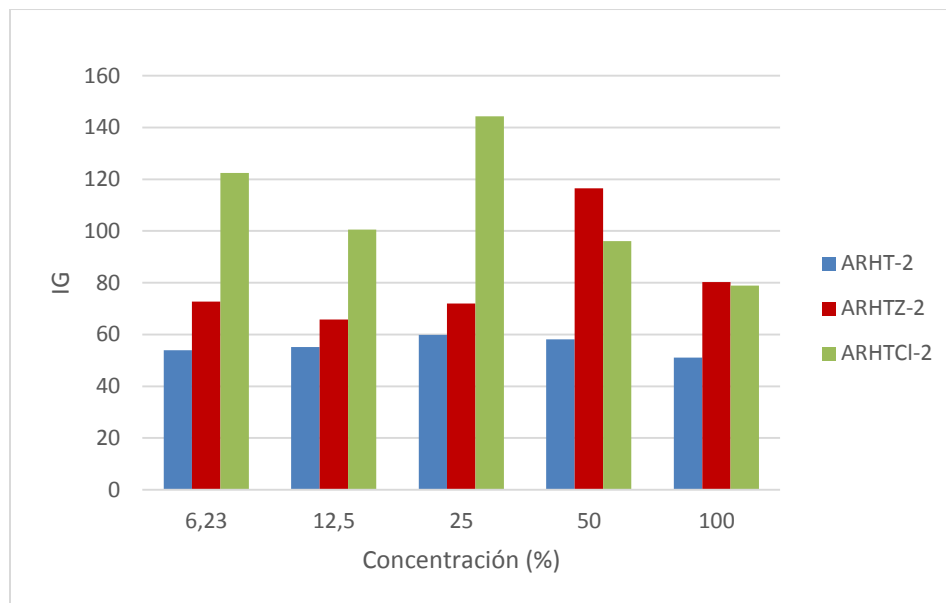


Figura 8. Índice de germinación de *Lactuca sativa* para el segundo muestreo.

Los parámetros evaluados para ARHT se presentan en la figura 7. La inhibición de la germinación para ARHT, en general, aumento de manera proporcional a la concentración, siendo la mayor inhibición de 42.56%, En el caso del crecimiento de la radícula, se observa la presencia de ambos efectos, la inducción e inhibición sobre la elongación, el efecto inductor se observó en las concentraciones de 25% y 100% siendo la inducción promedio de 10%. Para el hipocotilo, no se presentó ninguna tendencia en la inducción del crecimiento. El porcentaje mayor de inducción para este caso fue de 35.76% a la concentración de 100%.

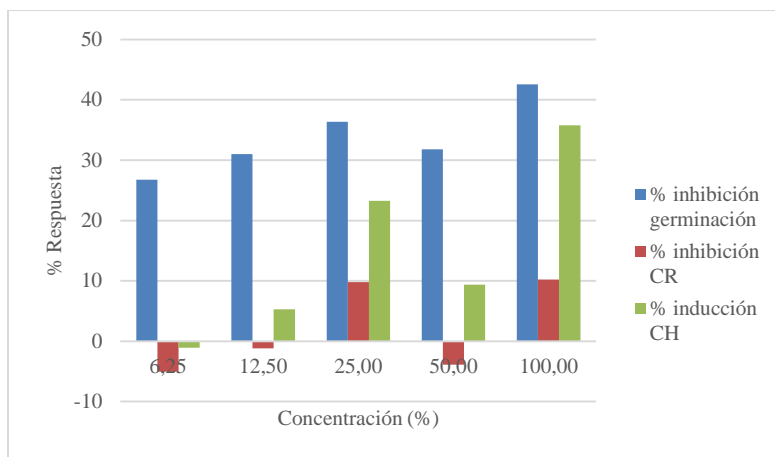


Figura 9. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria antes de la cloración- segundo muestreo.

Los resultados obtenidos para ARHTZ se muestran en la figura 8, donde se puede observar una inhibición de la germinación mayor al 80% para todas las concentraciones. En el caso de la enlongación tanto de la radícula como el hipocotilo, se puede ver un crecimiento que aumenta proporcionalmente a la concentración. En el caso del crecimiento de la radícula, la concentración del 100% no siguió la tendencia antes descrita, ya que disminuyó la inducción del crecimiento.

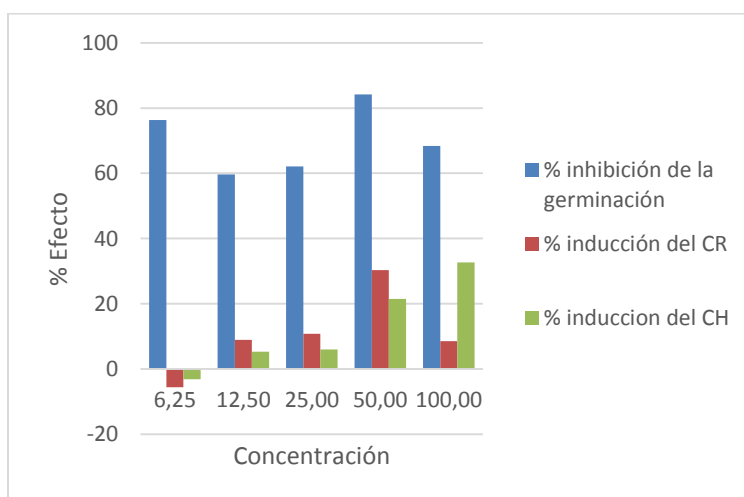


Figura 10. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria después del tratamiento con zeolita modificada- segundo muestreo.

Los resultados para ARHTCl se presentan en la figura 9. La inhibición de la germinación es muy poca, ya que la máxima inducción fue del 10.88% sin embargo, para la concentración de 6.25% se presentó un efecto inductor de la germinación.

Para el caso del crecimiento de la radícula e hipocotilo, se observa una inducción de la enlongación de ambas partes de la semilla en el intervalo de concentraciones de 6.25%- 25% mientras que al aumentar esta concentración, el efecto que se presenta es una inhibición. Por tanto, se observa que a partir de la concentración del 25% a mayor inhibición de la germinación, menor inducción del crecimiento del hipocotilo y la radícula.

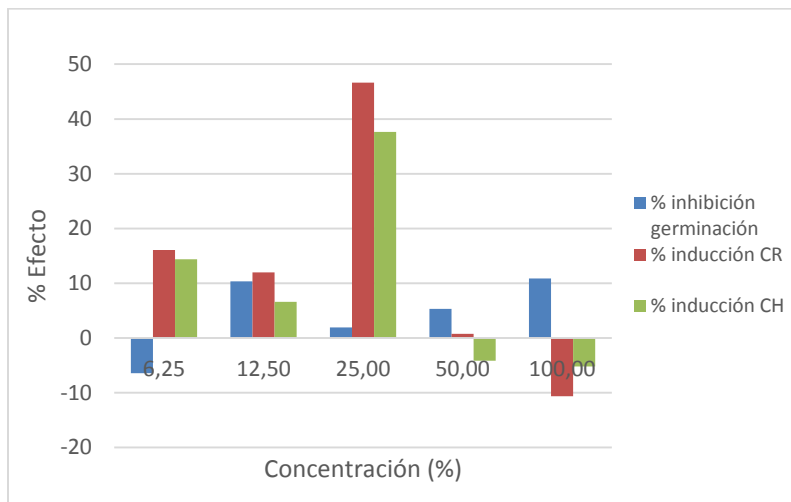


Figura 11. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria después de la cloración- segundo muestreo.

Para este muestreo, también se observó daño morfológico en las semillas germinadas, presentando los mismos efectos antes descrito, así como la disminución de las vellosidades de las radículas. Las imágenes se muestran en la figura 10.

El agua residual después de la cloración fue la que presentó los mejores índices de germinación así como los menores porcentajes de inhibición de la germinación.

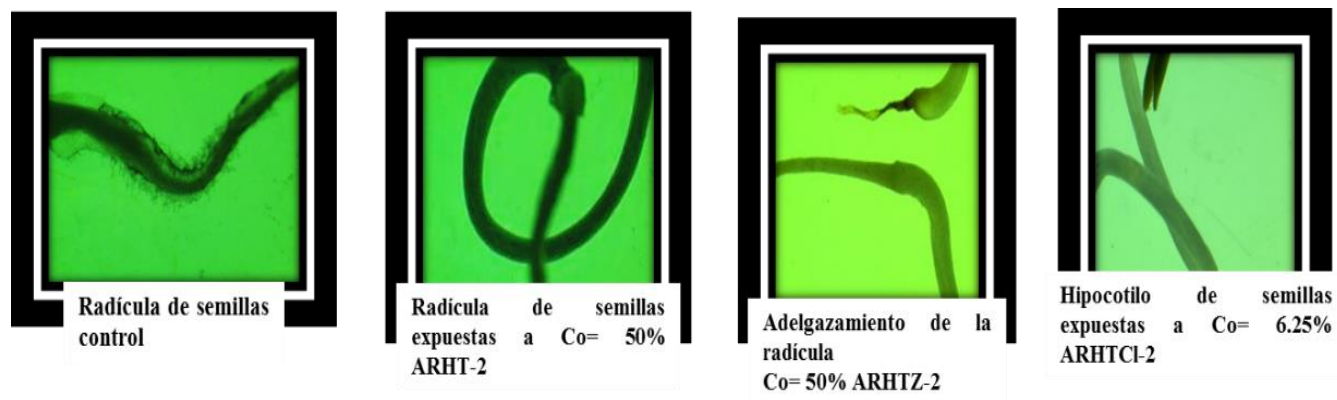


Figura 12. Cambios morfológicos en las semillas germinadas- segundo muestreo.

7.5.3 Tercer muestreo

Para el tercer muestreo se realizaron pruebas de toxicidad con *L. sativa* para el agua antes y después de la cloración (ARHT y ARHTCl respectivamente) y el agua tratada con la zeolita natural modificada (ARHTZ). Se evaluaron dos concentraciones más (1.562% y 3.125%) en este experimento para observar mejor el comportamiento de la germinación en un intervalo más amplio. En la figura 11 se muestran los resultados para el índice de germinación de las muestras correspondientes al tercer muestreo.

Para el caso del agua residual hospitalaria antes de la cloración (ARHT-3) se observa un comportamiento concentración dependiente de la concentración de 1.56 a 6.25%, para esta muestra según la clasificación se Zucconi y colaboradores en 1981, existe una moderada presencia de sustancia fitotóxicas (IG= 50-80).

Por otro lado, para el agua tratada con zeolita (ARHTZ-3) se observa un aumento en el índice de germinación proporcional al aumento de concentración en el intervalo de concentraciones de 1.56 a 12.5%, posteriormente no se observa ninguna tendencia en el comportamiento de germinación de las semillas de lechuga. Todos los valores de IG reflejan según los criterios empleados una presencia de moderada (50-80) a leve (>80) de sustancias fitotóxicas. Se puede observar que existen IG mayores al 100%, lo cual puede estar relacionado con la presencia de nutrientes en el agua residual. Por otro lado, los resultados muestran que ARHT-3 pasa de presencia moderada de sustancias fitotóxicas a leve presencia de éstas por el tratamiento con zeolita, excepto en la concentración de 100%.

En la muestra de agua residual hospitalaria después de la cloración (ARHTCl-3) se observa un índice de germinación dependiente de la concentración, donde a mayor concentración menor

índice de germinación. Esta conducta de germinación se ve modificada a partir de la concentración de 25%. En el caso de esta muestra se observa un IG menor al 50 en el caso de la concentración de 12.5%, lo cual según Zuccato y colaboradores existe una presencia de sustancias fitotóxicas elevada.

La inducción del crecimiento tanto de la radícula como el hipocotilo presentada en todos los casos, puede estar relacionada con la presencia de sustancias nutritivas para el organismo de estudio. Rodríguez y colaboradores (2014) mencionan que la presencia de amonio en aguas residuales inhibe el porcentaje de germinación de las semillas y aumenta la longitud de la radícula e hipocotilo, lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio para *Lactuca sativa*.

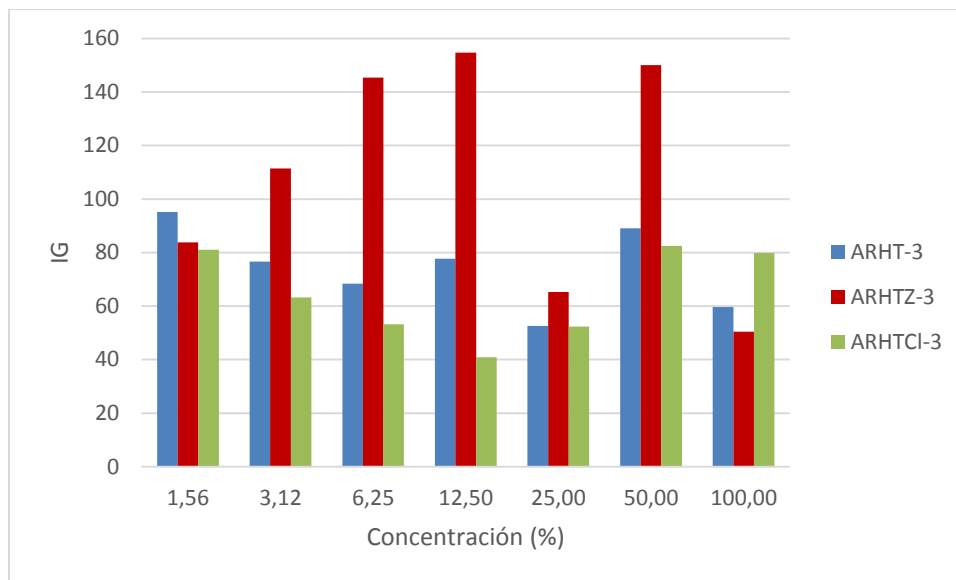


Figura 13. Índice de germinación de *Lactuca sativa* para el tercer muestreo.

Los parámetros evaluados para ARHT-3 se muestran en la figura 11. La inhibición de la germinación disminuye directamente proporcional a la concentración en el intervalo de 1.56 a 25%, sin embargo, en 50 y 100% disminuye la inducción. En la muestra ARHT-3 la inhibición máxima es de 55.90% y estadísticamente no existen diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). Por otro lado, para el crecimiento de la radícula, se observa una inducción de 4.58% a 72.71%.

El comportamiento del crecimiento a partir de la concentración de 3.125% existe un aumento proporcional a la concentración sin embargo a la concentración de 100% hay una disminución en la inducción. Por último, para el crecimiento del hipocotilo, no se observa un comportamiento en

las concentraciones de estudio. Para esta estructura, el porcentaje máximo de inducción fue de 35.35%.

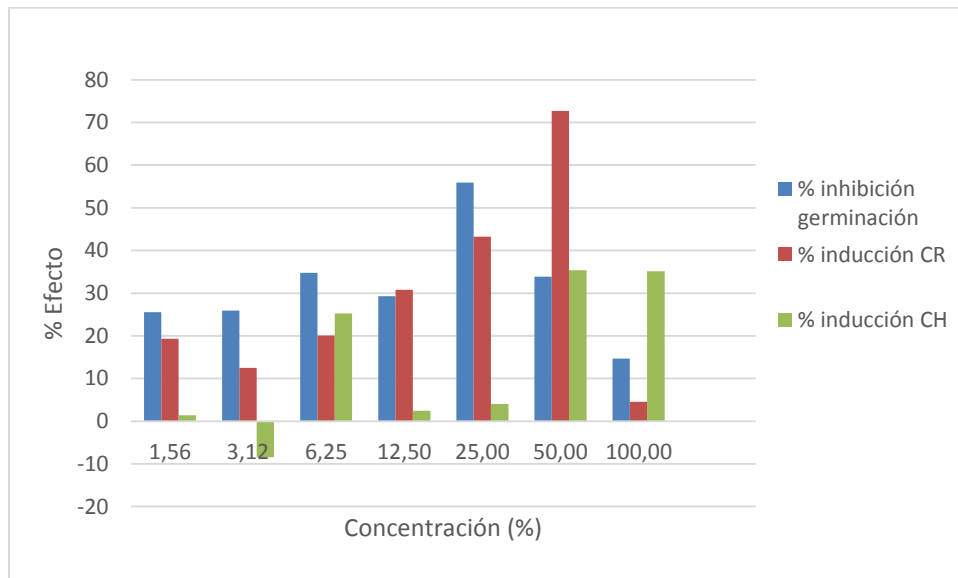


Figura 14. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria antes de la cloración- tercer muestreo.

Los efectos presentados en la muestra tratada con zeolita se ilustran en la figura 13, donde se observa que la inducción de la germinación tiene un comportamiento no lineal, donde la inhibición presentada está entre 32.35 y 54.9%.

ARHTZ-3 causó una inducción del crecimiento de la radícula de 13.32%- 68.49%. Las inducciones a las distintas concentraciones fueron muy parecidas a excepción de la concentración de 3.12% donde la inducción se vio muy disminuida a comparación de las otras concentraciones probadas.

Para el caso del hipocotilo se observa un comportamiento tipo campana de Gauss de la concentración de 3.12 a 50% y la inducción máxima se presentó a la concentración de 100% la cual fue de 68.49%.

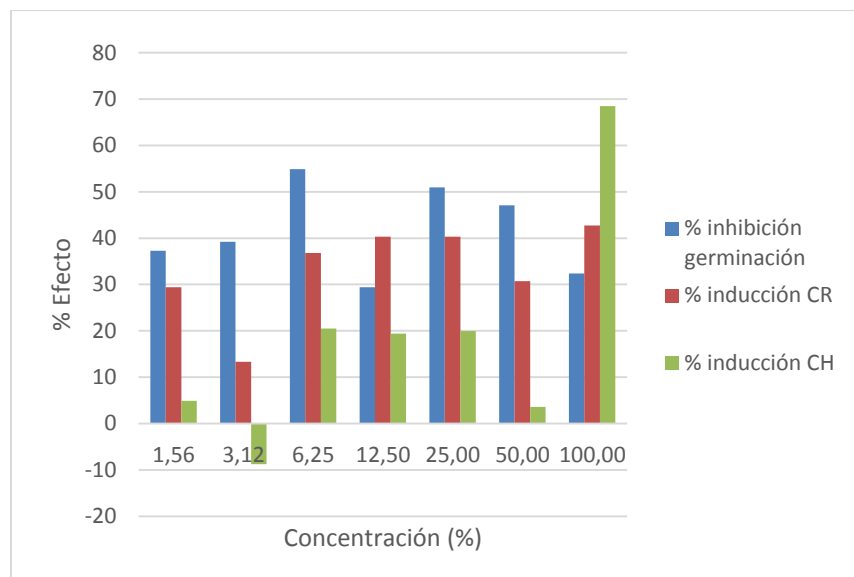


Figura 15. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la raíz e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria tratada con zeolita- tercer muestreo.

A continuación se muestran los efectos calculados para el agua residual después de la cloración, figura 14. Para esta muestra se observa un aumento de la inhibición dependiente de la concentración hasta la concentración de 12.5%, para las siguientes dos concentraciones se presenta una disminución del efecto y finalmente a la concentración de 100% la inducción aumenta nuevamente. El crecimiento de la raíz de los organismos de ARHTCl-3 no muestra una dependencia a la concentración ya que no se presenta ninguna tendencia. En este caso, para la concentración del 100% se presenta una inhibición del crecimiento en lugar de una inducción.

El crecimiento del hipocotilo se ve una inhibición para la primera concentración y posteriormente una inducción la cual se ve marcada en dos fases, de la concentración 3.125%- 12.5% existe una disminución de la inducción pero de 25%- 100% vuelve a aumentar la inducción.

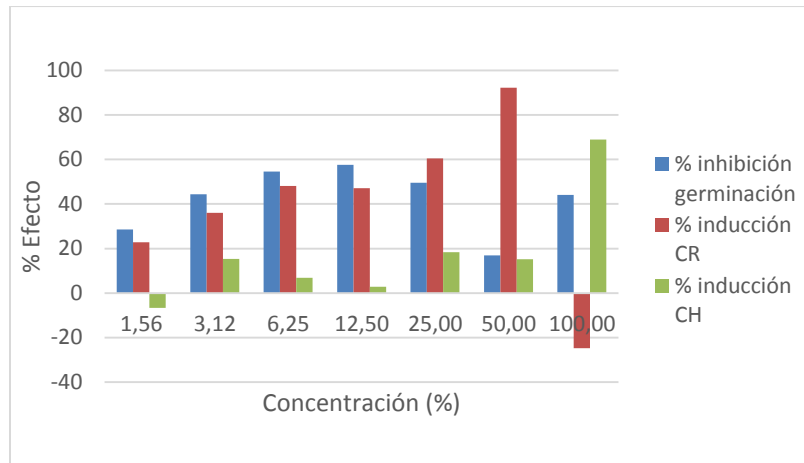


Figura 16. Inhibición de la germinación, inducción del crecimiento de la radícula e hipocotilo en *Lactuca sativa* por el agua residual hospitalaria después de la cloración- tercer muestreo.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos a la concentración de 100% para el índice de germinación, inhibición de la germinación y crecimiento de la radícula e hipocotilo. Se puede observar que el índice de la germinación en los tres muestreos para el agua antes de la cloración (ARHT) está por encima del 50 lo cual evidencia que en las tres muestras a pesar de las diferencias estacionales la presencia de sustancias fitotóxicas es moderada.

El tratamiento con zeolita modificada muestra un aumento del índice de germinación para el segundo y tercer muestreo pero una disminución en el primer muestreo esto puede deberse a las diversas naturalezas de los compuestos inmersos en el agua residual las cuales si se ven relacionadas con la variación del consumo de compuestos y el comportamiento de estos en medio acuoso por las variaciones climáticas.

Comparando las primeras dos muestras descritas con el agua residual después de la cloración podemos ver que en el segundo muestreo existe un aumento muy ligero del IG respecto al presentado por ARHTZ-2, caso contrario en el tercer muestreo donde se observa una disminución en el índice de germinación respecto a las dos muestras.

Para la inhibición de la germinación en los tres muestreos es menor al 50% en la muestra tomada antes de la cloración y la inhibición se ve distinta entre las muestras. Se observó un aumento de la inhibición de la germinación después del tratamiento con zeolita en los tres muestreos pero tampoco se alcanza un valor mayor al 50% para la inhibición. Al igual que en el índice de

germinación en el caso del segundo muestreo existe una mejora en este parámetro (disminuye el porcentaje de inhibición) sin embargo en el tercer muestreo hay un aumento de la inhibición.

Para el caso del crecimiento de la radícula se observa que en la primera muestra existe una inhibición del crecimiento para ambas muestras (ARHT y ARHTZ) siendo mayor en la muestra tratada con zeolita, por lo que en este muestreo no hubo mejora por el tratamiento acoplado.

En el caso del segundo y tercer muestreo existió una inducción $\leq 10\%$ el cual disminuye en el segundo muestreo levemente (de 10% a 8.54%) pero para el tercer muestreo existe el efecto contrario siendo la inducción cerca de diez veces mayor.

Para el segundo muestreo el tratamiento con cloro causó una inducción del 10%, valor muy cercano al resultado obtenido en ARHT, pero para el tercer muestreo se encontró un efecto contrario teniendo una inhibición del crecimiento de la radícula del 24.71%.

En cuanto al hipocotilo, existen diferencias entre los valores encontrados en los tres muestreos donde el tercero fue el que presentó menor inducción para los tres tratamientos (ARHT, ARHTZ y ARHTCl). El tratamiento con zeolita muestra una mejor en el primer y segundo muestreo. En el caso del agua residual clorada para el segundo muestreo se observa que se presentó una inhibición del crecimiento del hipocotilo, efecto contrario a ARHT y ARHTZ, mientras que en el tercer muestreo la inducción fue igual a la presentada en ARHTZ y mayor a la calculada para ARHT.

Con todos estos resultados podemos ver que si existen fluctuaciones tanto en la toxicidad del agua residual como en la eficiencia que tendrán tanto el tratamiento con zeolita como el tratamiento de cloración.

Tabla 8. Resultados de *Lactuca sativa* expuesta a la concentración del 100% del agua residual.

Parámetro	Primer muestreo		Segundo muestreo			Tercer muestreo		
	ARHT	ARHTZ	ARHT	ARHTZ	ARHTCI	ARHT	ARHTZ	ARHTCI
IG	52.73	40.74	51.11	78.97	80.21	59.59	79.83	50.43
%Inhibición de la germinación	25.92	41.94	31.61	42.54	10.88	14.70	32.35	44.12
%Inducción del Crec. Radícula	-6.25	-25.05	10	8.54	10.59	4.58	49.92	-24.71
%Inducción del Crec. Hipocotilo	65.02	7.33	35.76	32.72	-5	35.16	68.49	68.91

En el caso de *Lactuca sativa*, se aprecia que el tratamiento con zeolita aumenta el porcentaje de efecto en todas las muestras, esto puede deberse al aumento de biodisponibilidad de los contaminantes por la adsorción de materia orgánica. Nikkilä en 2001 menciona que la materia orgánica existente en el agua residual puede enmascarar los compuestos tóxicos por lo cual contrastando esto con lo anterior, el tratamiento con zeolita disminuiría la cantidad de materia orgánica dejando a los compuestos orgánicos libres para ejercer un efecto en los organismos de estudio.

7.6 Estudio de Toxicidad aguda con *Daphnia pulex*

Se logró obtener un cultivo puro de *Daphnia pulex*, del cual se seleccionaron organismos neonatos de menos de 24 horas de vida para realizar los experimentos de toxicidad.

Para todos los casos, *Daphnia pulex* no presentó una toxicidad aguda, por lo cual solo se reportan resultados de la prueba de toxicidad crónica.

7.6.1 Primer muestreo

Para el agua residual hospitalaria tratada (ARHT) y el agua residual hospitalaria con zeolita (ARHTZ) se presentó la primera camada a los 6 días mientras que el control inició su proceso reproductivo al noveno día. Las camadas para ARHT y ARHTZ fueron mayores que las camadas de los organismos control. Los resultados se expresan con un índice de reproducción (neonatos/ *Daphnia* vivas). En la figura 15 se muestran los resultados de reproducción del estudio, los cuales se dividieron en tres periodos.

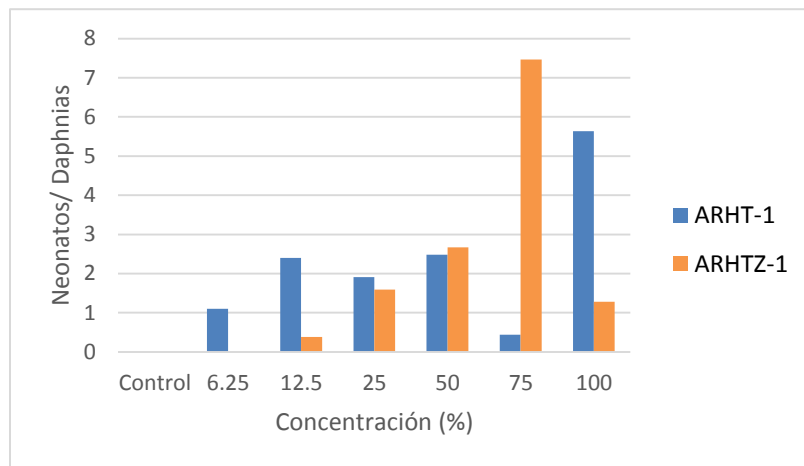


Figura 17.1 Reproducción de *Daphnia pulex* en la primera semana de estudio.

Se puede observar que la reproducción para ARH se presenta desde la concentración más baja estudiada (6.25%) mientras que la zeolita no presenta neonatos en esa concentración. Se puede observar que para el caso de ARHT no existe gran diferencia entre el número de neonatos mientras que ARHTZ muestra un aumento en el número de neonatos al aumentar la concentración.

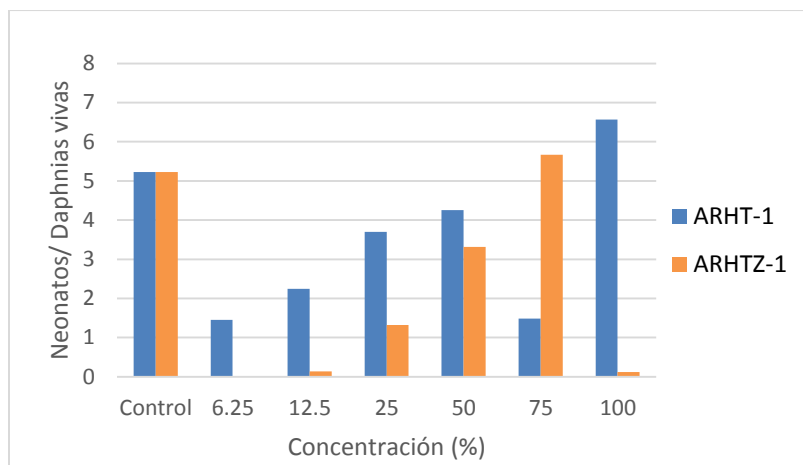


Figura 17.2 Reproducción de *Daphnia pulex* en la segunda semana de estudio- Primer muestreo.

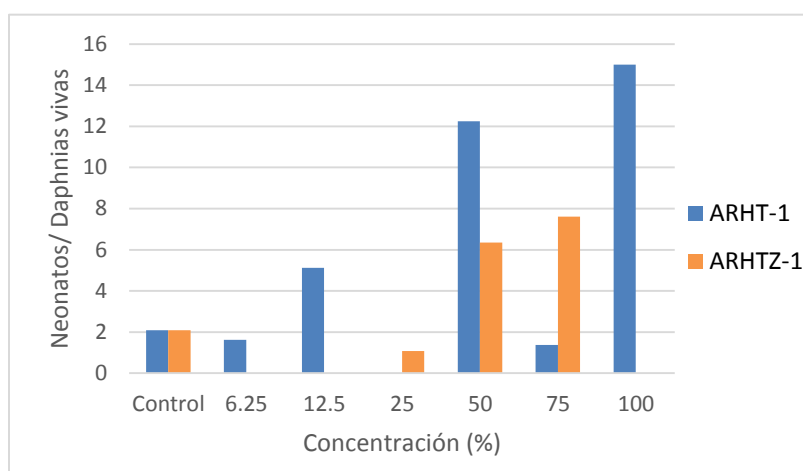
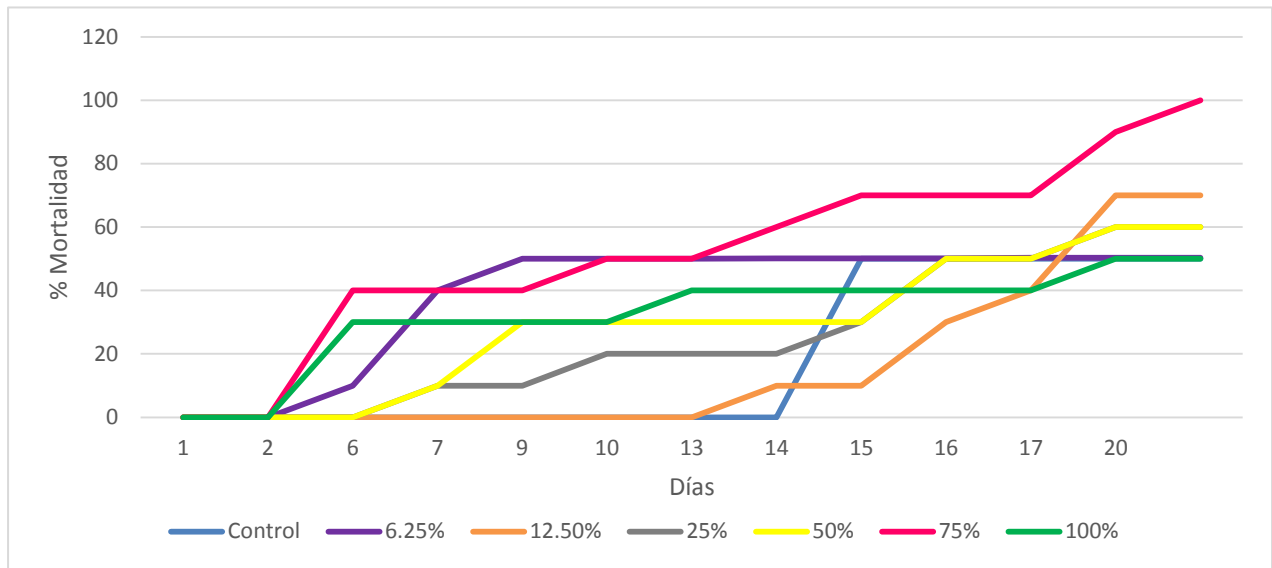


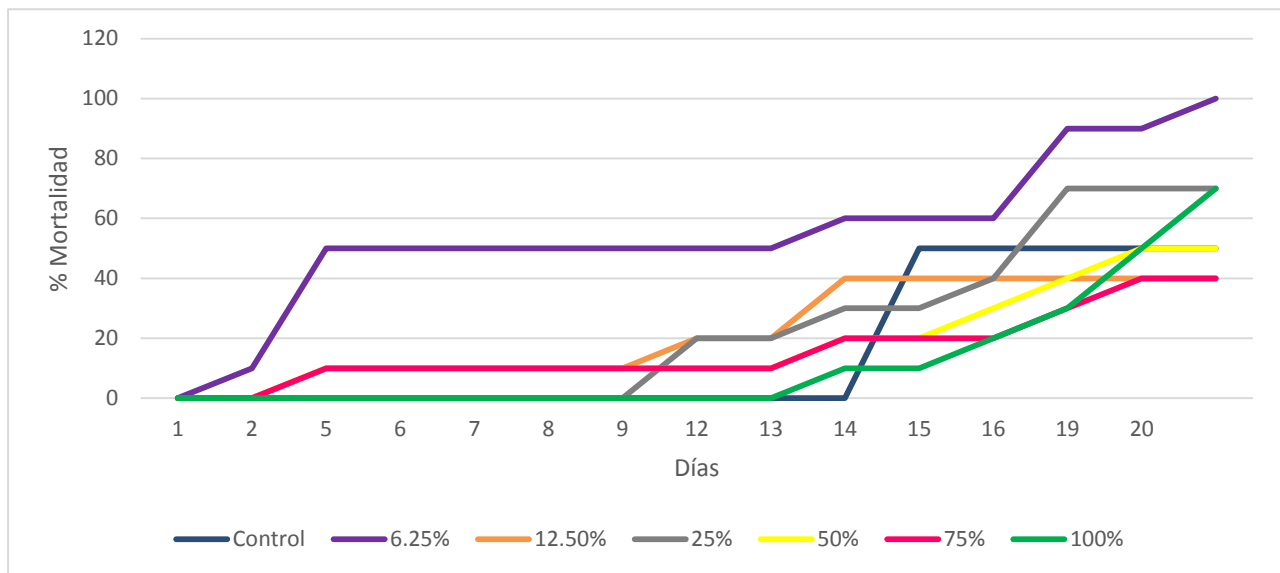
Figura 17.3 Reproducción de *Daphnia pulex* en la tercera semana de estudio- Primer muestreo.

Por otro lado, se determinó la mortalidad de los organismos de estudio durante el estudio. Para el caso de 6.25%, la mortalidad alcanzó el 50% en el día 9 para antes de la cloración mientras que el agua tratada con zeolita la mitad de los organismos habían muerto para el día 5 siendo la mortalidad al término del estudio de 50% y 100% respectivamente. Sin embargo, para la concentración de 12.5% se observa un comportamiento contrario donde la mortalidad del 50% se observa en el día en el día 20 para ARHT-3 mientras que para ARHTZ el mayor porcentaje de muertes fue del 40%. Los resultados de las concentraciones de 25% a 75% fueron uy parecidos a los encontrados para 12.5% donde se aprecia que hay una disminución de la mortalidad por el tratamiento con zeolita. Mientras que para la concentración del 100% el efecto se comportó como

en la concentración de 6.25% siendo mayor el porcentaje de mortalidad en el agua tratada con el material adsorbente. Los resultados se pueden observar en las figuras 16.1 y 16.2.



18.1. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada antes de la cloración- Primer muestreo.



18.2. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita modificada- Primer muestreo.

7.6.2 Segundo muestreo

De la misma manera que en el primer muestreo, se dividieron los resultados entre periodos. En las figuras 17.1, 17.2 y 17.3 se muestran los resultados para esta prueba.

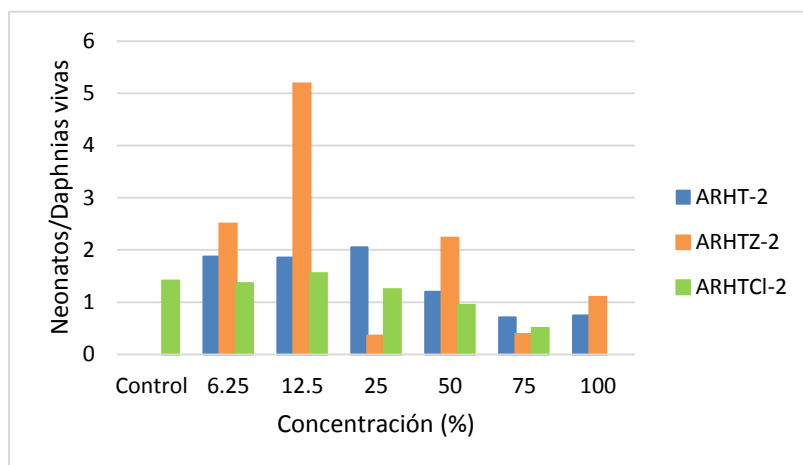


Figura 19.1 Reproducción de *Daphnia pulex* en la primera semana de estudio - Segundo muestreo.

Se puede observar que existe una inducción de la reproducción ya que para el caso del control, no se presentaron neonatos. Para el caso de ARHT y ARHTCI la inducción fue inversamente proporcional a la concentración a pesar de que todas las inducciones en estos casos son menores a 2. Por otro lado, para ARHTZ no existe una tendencia y se presenta la mayor inducción a 12.5% con un promedio de 5.

En el segundo caso, a pesar de que los controles llegaron a su madurez reproductiva, el número de neonatos por organismo vivo fue mucho menor en el caso del control respecto a las muestras de agua residual. En el caso de ARHT, se tiene un promedio de 7 neonatos/*Daphnias* vivas mientras que para ARHTZ de la concentración de 12.5% en adelante la inducción de la reproducción aumenta conforme la concentración incrementa. Por último, para ARHTCI el número de neonatos por *Daphnias* vivas se mantiene entre 4 y 6 en la mayoría de los casos, observándose la menor inducción a la concentración de 100%.

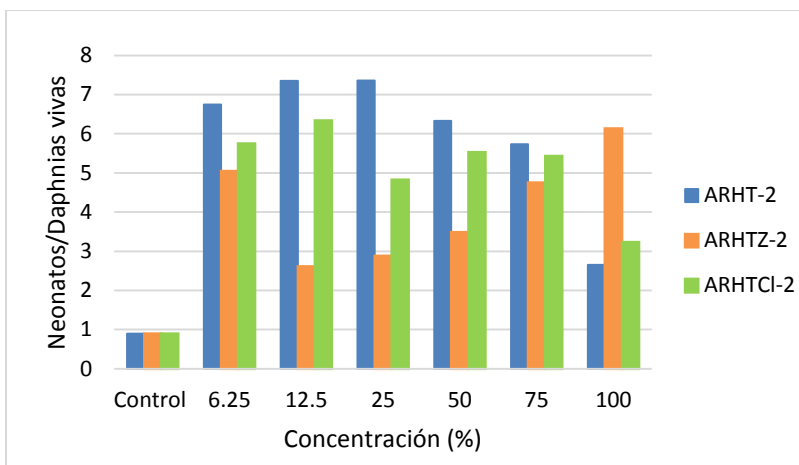


Figura 19.2 Reproducción de *Daphnia pulex* en la segunda semana de estudio- Segundo muestreo.

Para el último periodo de estudio, ARH no se observa una tendencia definida y el efecto mayor se observa a la concentración de 12.5%, lo mismo pasa en los otros dos casos, ARHTZ y ARHTCI, en el primer caso el mayor efecto se muestra a la concentración menor (6.25%) mientras que para el segundo caso es a la concentración de 75%. ARHTCI presentó la menor inducción de la reproducción en este caso.

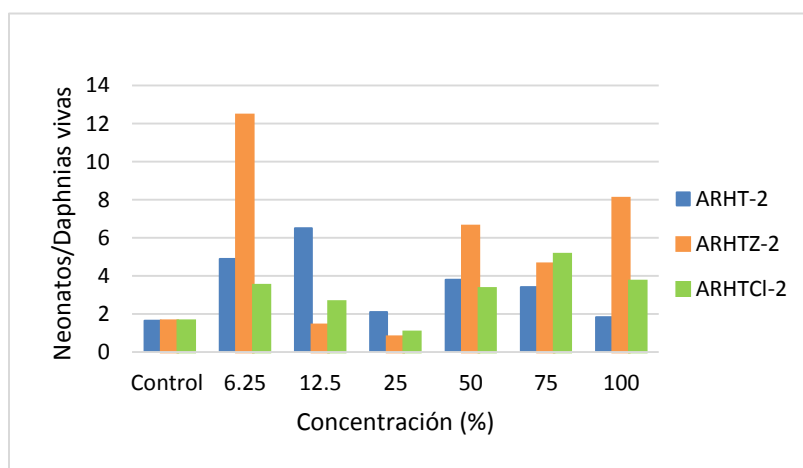
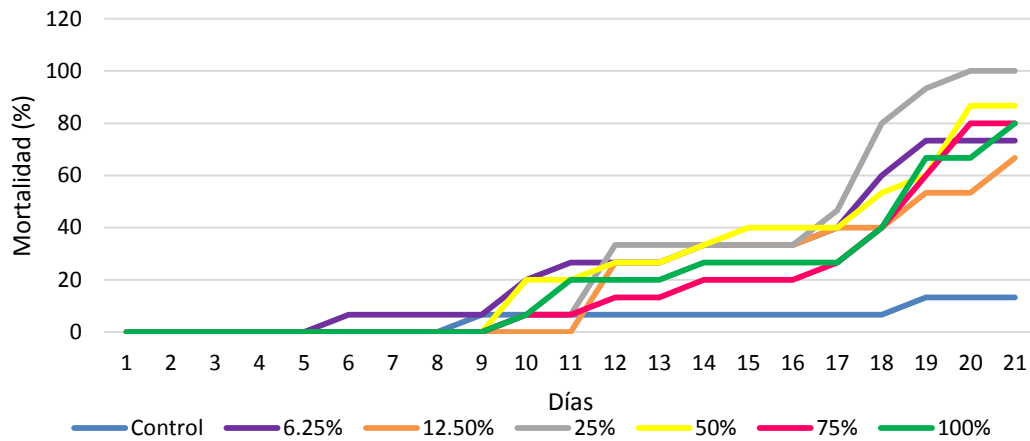


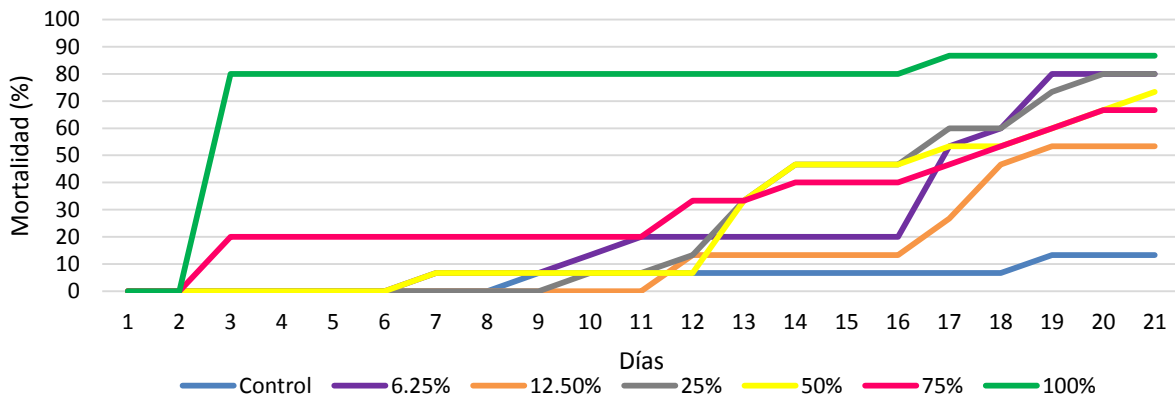
Figura 19.3 Reproducción de *Daphnia pulex* en la tercera semana de estudio- Segundo muestreo.

Los resultados de mortalidad para las muestras del segundo muestreo se presentan en las figuras 18.1, 18.2 y 18.3. En este muestreo se observa que a la concentración al 100% para la muestra ARHT-2 la mortalidad aumenta gradualmente hasta alcanzar un máximo de 80% mientras que

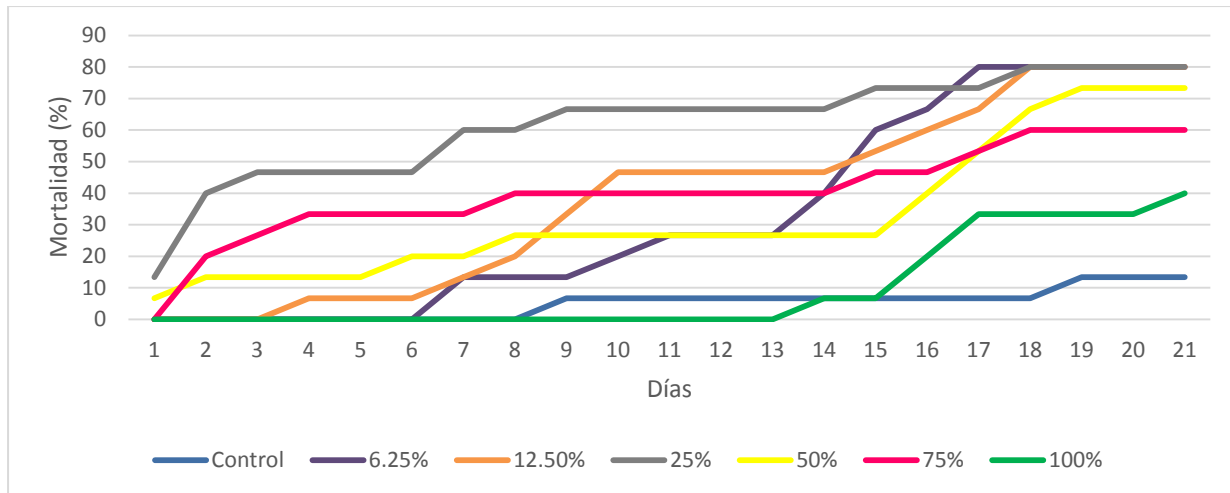
para el agua residual tratada con zeolita (ARHTZ-2) se alcanzó un porcentaje de muerte del 80% para el tercer día y al término del estudio la mortalidad alcanzada fue el 86.66%. En contraste, con la respuesta encontrada para las dos muestras anteriores, el agua residual después de la cloración mostro una mortalidad final de 40% la cual se alcanzó hasta el día 20.



20.1. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada antes de la cloración- Segundo muestreo.



20.2. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita modificada- Segundo muestreo.



20.3. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada después de la cloración- Segundo muestreo.

7.6.3 Tercer muestreo

Para el tercer muestreo, se evaluaron diferentes concentraciones: 0.5%, 2%, 6.2%, 12.5%, 25%, 50% y 100%. Sin embargo, las concentraciones de 0.5% y 2.0% tuvieron una mortalidad muy elevada por lo cual se omitieron estos organismos.

Para el caso de la primera semana de estudio, solo se observó una inducción de la reproducción para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita (ARHTZ) ya que fue la única muestra con presencia de neonatos como se muestra en la figura 19.1.

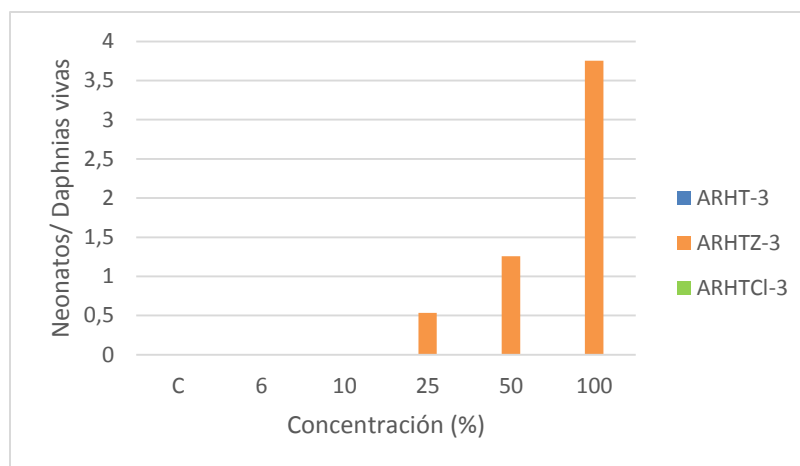


Figura 21.1 Reproducción de *Daphnia pulex* en la primera semana de estudio- Tercer muestreo.

Para la segunda semana, la inducción de la reproducción se evidenció en las tres muestras, como se muestra en la figura 19.2. La inducción en este periodo se ve mayormente en la muestra ARHTCl-3 en la mayoría de las concentraciones exceptuando la concentración de 100% donde la inducción es muy elevada con relación a las demás muestras. En ARHT-3 se puede observar una inhibición de la reproducción en las concentraciones de 6 y 10% donde no hubo presencia de neonatos.

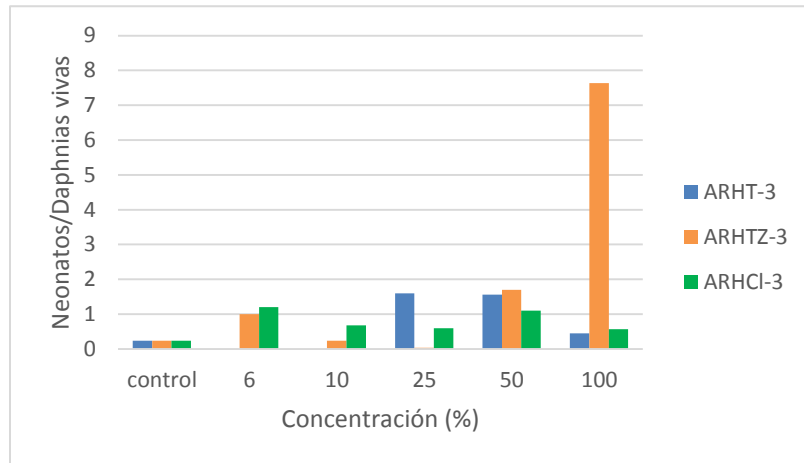


Figura 21.2 Reproducción de *Daphnia pulex* en la segunda semana de estudio- Tercer muestreo.

Por último, en el caso de la semana tres, para la muestra ARHT-3 se observa un comportamiento dependiente a la concentración y para esta muestra se observa una inducción en la reproducción de los organismos a partir de la concentración de 10% mayor a las otras muestras. En el caso del agua tratada con zeolita modificada, existe una inhibición de la reproducción y en las concentraciones de 10% y 25% la inhibición fue completa ya que los organismos no tuvieron crías. La muestra ARHTCl-3 presenta una inducción en la concentración de 6% y en 100%, para el segundo caso la inducción fue muy ligera. Para las demás concentraciones (10%, 25% y 50%) el efecto fue una inhibición de la reproducción respecto al control.

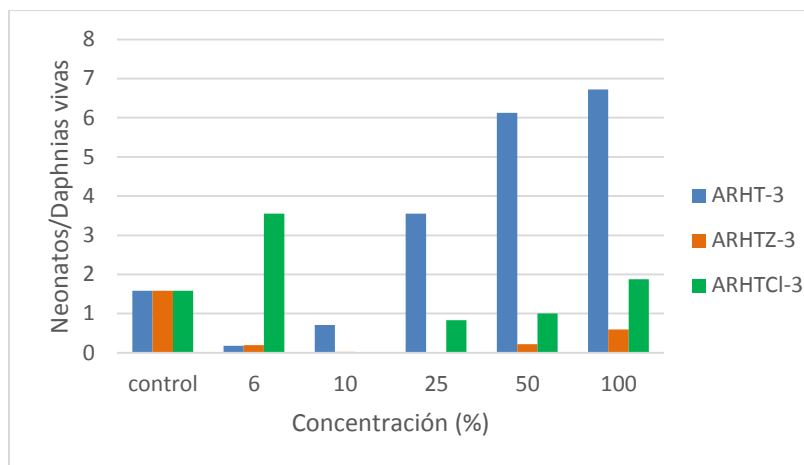
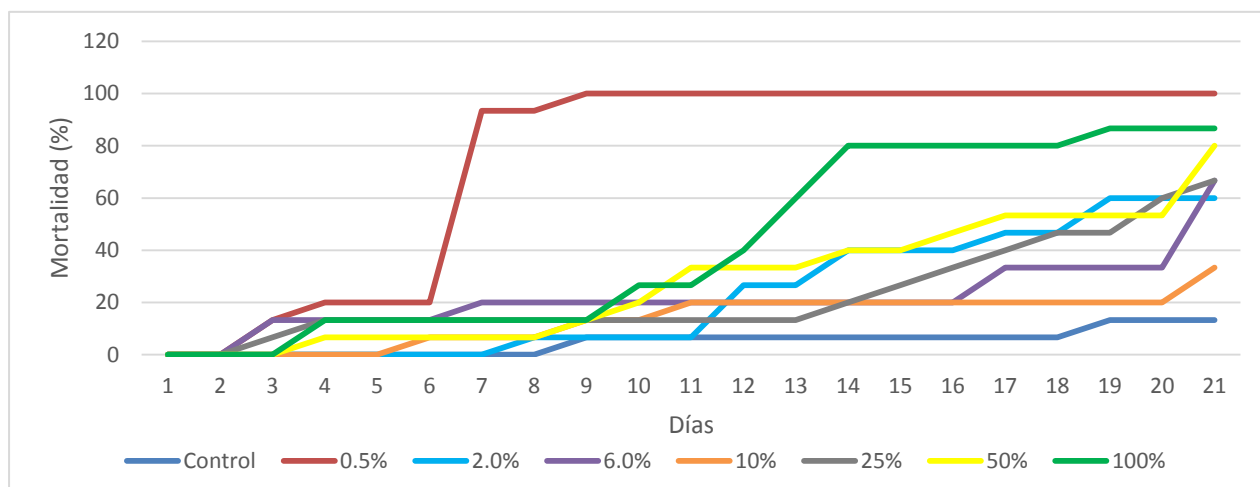


Figura 21.3 Reproducción de *Daphnia pulex* en la tercera semana de estudio- Tercer muestreo.

La mortalidad para el tercer muestreo las muestras ARHT-3 y ARHTZ-3 tuvieron un porcentaje de mortalidad muy parecido al final del estudio (86.66% y 93.33% respectivamente), pero difieren en el tiempo en que se observaron neonatos muertos ya que para ARHT-3 el día 14 es donde se ve el primer incremento en la mortalidad mientras que para ARHTZ-3 esto se ve en el día 7. Mientras que en ARHTCI la mortalidad máxima fue de 70 iniciando a muerte de los organismos a partir del día 3.



22.1. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada antes de la cloración- Tercer muestreo.

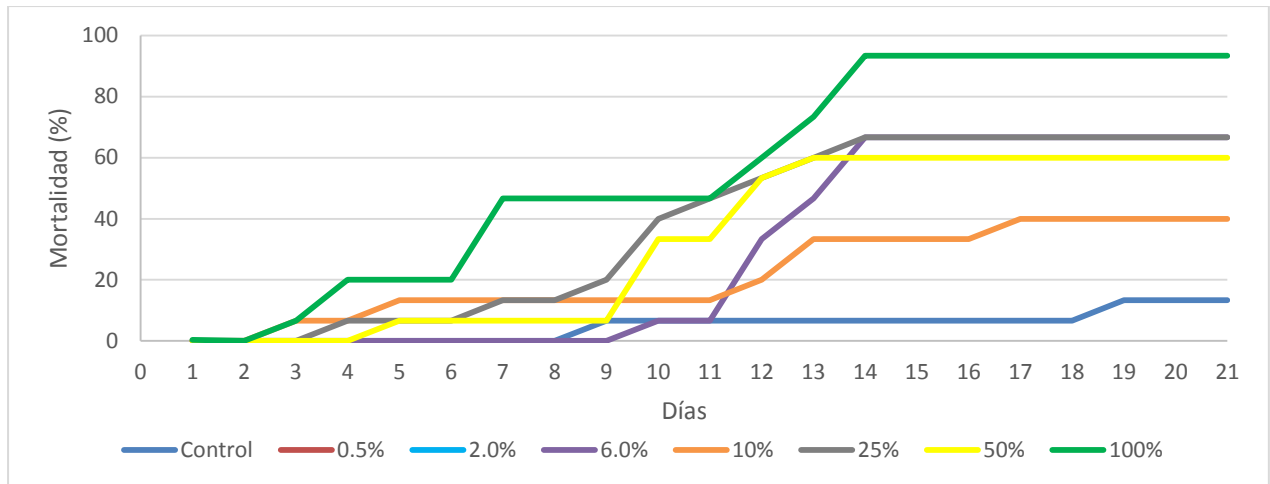


Figura 22.2. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada con zeolita modificada- Tercer muestreo.

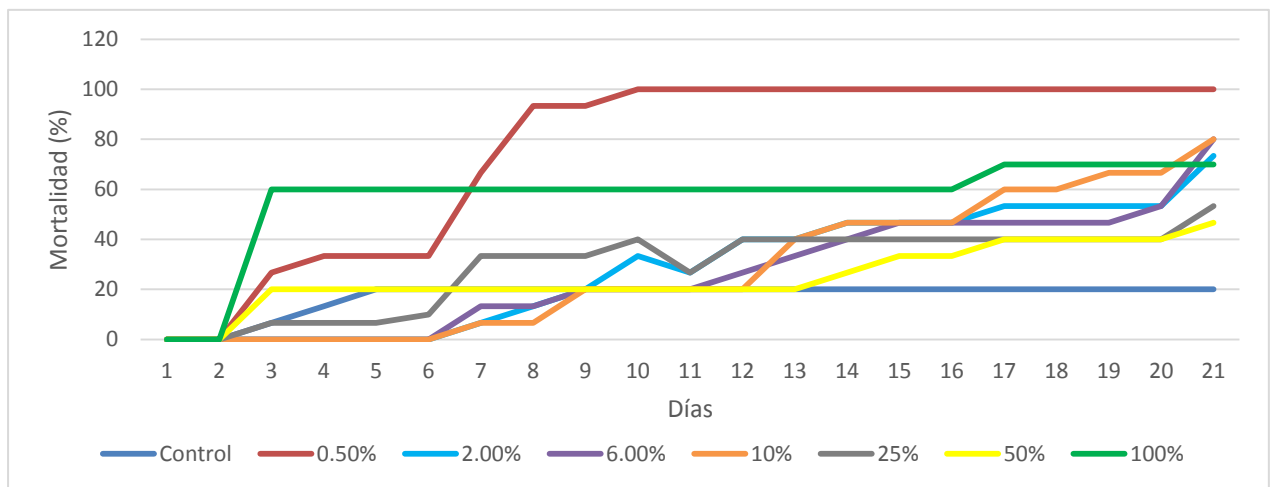


Figura 22.3. Porcentajes de mortalidad durante el estudio para el agua residual hospitalaria tratada después de la cloración- Tercer muestreo.

En la figura 22.4 se muestran los resultados de la mortalidad a una concentración de 100% presentada durante todo el estudio donde se observa que la mortalidad varían entre muestras y muestreos y que la mortalidad se encuentra de la siguiente manera: ARHTZ-3 > ARHTCI-2> ARHT-3> ARHT-2> ARHTCI-3>ARHTZ-1>ARHT-1>ARHTZ-2.

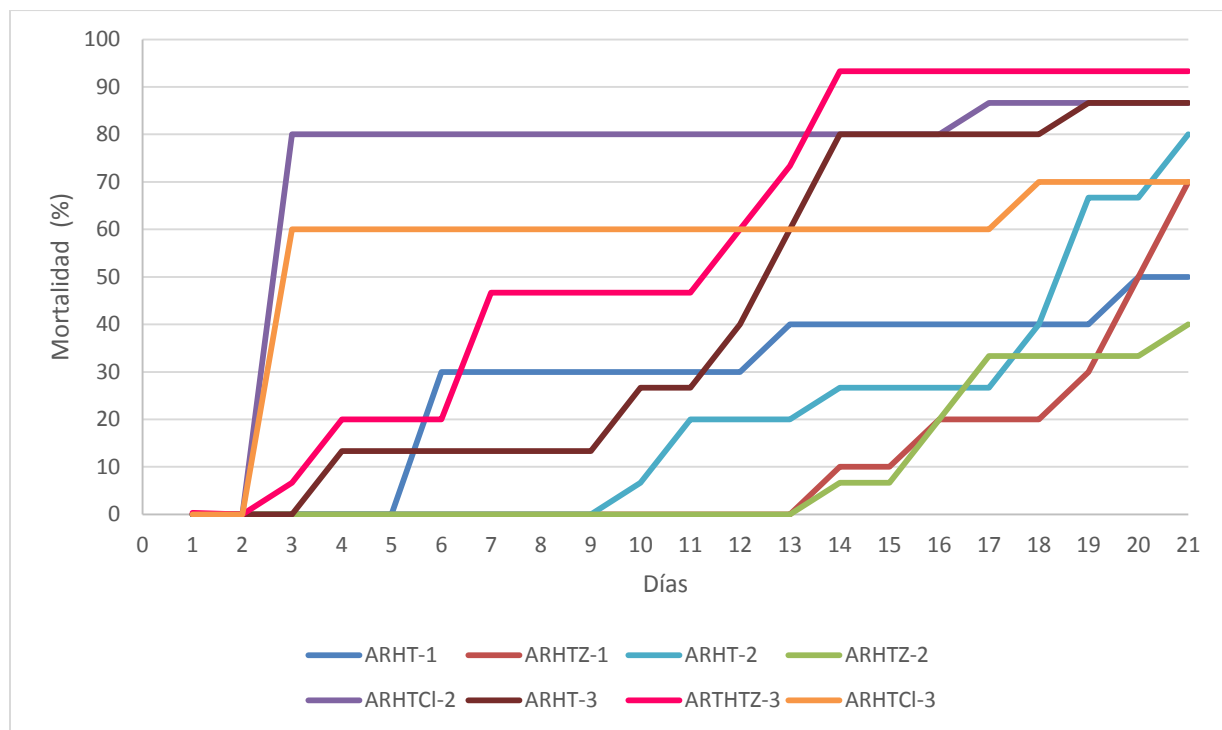


Figura 22.4 Porcentaje de mortalidad diario en *Daphnia pulex*

A continuación se muestra la tabla resumen de los resultados obtenidos para *Daphnia pulex* en los tres muestreos realizados (tabla 9).

Tabla 9. Resultados de toxicidad crónica en *Daphnia pulex*, a la concentración de 100%, después de 21 días de exposición

	Muestra	Neonatos/ Daphnias vivas	Mortalidad (%)	Sobrevivencia de neonatos (días)
Primer muestreo	Control	2	50	14
	ARHT	15	50	14
	ARHZ	0	70	14
Segundo muestreo	Control	2	13.33	14
	ARHT	23	80	3
	ARHZ	1.8	40	14
	ARHCl	8	86.6	1
Tercer muestreo	Control	1.58	20	14
	ARHT	6.71	93.3	14
	ARHZ	0.59	93.3	14
	ARHCl	1.8	70	14

En todos los casos se observó una inducción en la reproducción, es decir, los organismos de estudio presentaron una maduración reproductiva temprana, lo cual es posible se deba a la presencia de compuestos hormonales en el agua ya que este tipo de compuestos han sido detectados en diversas matrices de agua residual (Birkett y Lester, 2003).

Aunado a esto, también se presentó un incremento en el número y tamaño de los neonatos, principalmente esto se presentó en las concentraciones de 50%. Flohr y colaboradores en 2012 mencionan que la inducción del crecimiento puede estar debida a los nutrientes inmersos en el agua residual (Figura 21).

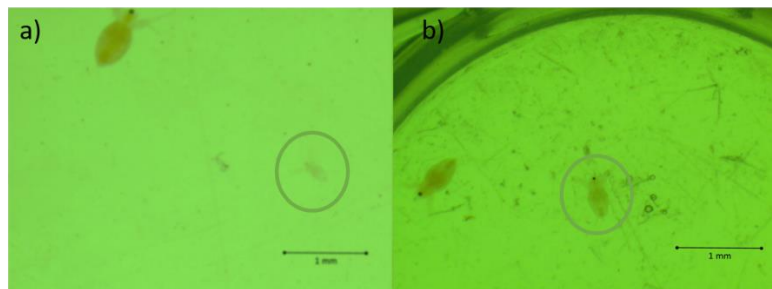


Figura 23. Efecto del agua residual hospitalaria sobre el desarrollo de los neonatos: a) neonato control encerrado. B) neonato expuesto a una concentración de 50% de ARHT.

Cabe resaltar que algunas muestras presentaron neonatos con periodos cortos de vida, tal es el caso de la muestra ARHT-3 y ARHTCI-3 donde los neonatos de la primera camada vivieron menos de cinco días.

La mortalidad de los organismos en todos los casos, puede estar asociada a una alteración en el sistema antioxidante de las *Daphnias*. Oliveira y colaboradores en 2015 reportaron una disminución de la enzima glutatión peroxidasa causada por los fármacos diclofenaco y paracetamol, lo cual puede pasar en nuestras muestras de estudio ya que las aguas residuales presentan gran cantidad de fármacos.

Combinando los resultados de reproducción y mortalidad se observa que siguen el comportamiento descrito por Terra y colaboradores en 2008 donde indican que ante condiciones

de estrés este tipo de organismos aumenta su reproducción y mortalidad con el fin de conservar la especie.

Comparando los resultados obtenidos del agua tratada con zeolita y el agua residual antes de la cloración, se puede observar que la inducción de la reproducción se vio disminuida por el tratamiento con zeolita, a pesar de esto, en el primer y tercer muestreo, la reproducción de las muestras tratadas con zeolita fue menor a la presentada por el control lo cual puede deberse a la remoción de ciertos compuestos que los organismos tomaron como nutrientes, disminuyendo así su consumo alimenticio y por tanto su reproducción como se mencionó anteriormente. Por otra parte, en el caso de la mortalidad se puede ver que los resultados son diferentes entre muestras lo cual evidencia la existencia de variaciones de contaminantes en las aguas residuales hospitalarias

7.7 Estudio de Toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum*

7.7.1 Primer muestreo

Los resultados de este estudio se ilustran en la figura 17. Para esta prueba la concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue de 12.55% para el agua residual y 9.17% para el agua tratada con zeolita. Para ambos casos se observó un aumento en el tamaño de las células.

Figura 24. Inhibición del crecimiento en *Selenastrum capricornutum*- primer muestreo.

7.7.2 Segundo muestreo

En el caso del segundo muestreo se encontraron las siguientes concentraciones inhibitorias medias: ARHT-2= 17.74%, ARHTZ-2= 6.64% y ARHTCI-2= 26.59%. Para este caso no se observó una mejora en el agua residual tratada con zeolita mientras que en el caso del agua clorada si hubo una mejora. Esto se puede deber principalmente a la cantidad de microorganismos inmersos en ambas muestras. Cabe resaltar que en el caso del ARHTCI-2 no se logró calcular la concentración inhibitoria media por el método Probit por lo que se hizo una curva dosis respuesta. En las figuras 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos de esta prueba.

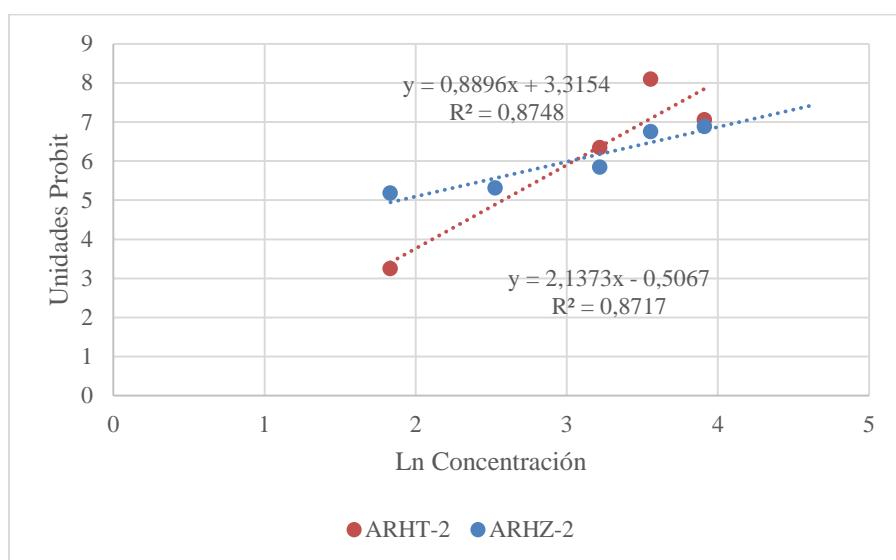


Figura 25. Inhibición del crecimiento en *Selenastrum capricornutum*- segundo muestreo.

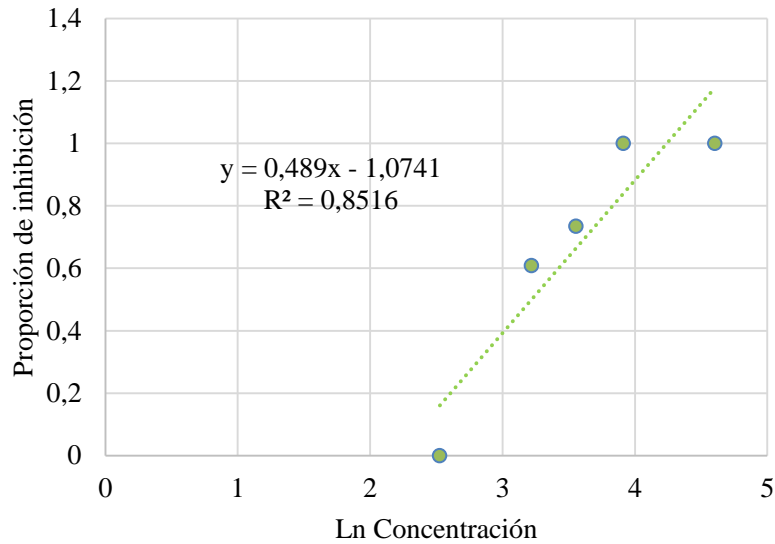


Figura 26. Inhibición del crecimiento en *Selenastrum capricornutum*- segundo muestreo ARHTCI.

7.7.3 Tercer muestreo

Para el tercer muestreo se muestran los resultados en la figura 20. En el caso de este muestreo, no se logró calcular una concentración inhibitoria media para ARHTZ ya que la menor inhibición presentada fue de 98%. ARHT tuvo una $CI_{50} = 3.06$ y $ARHTCI = 10.97$.

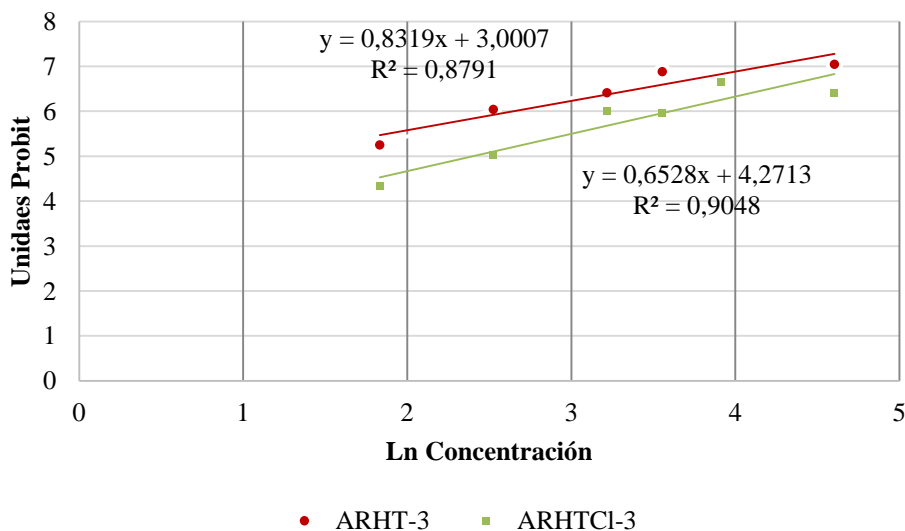


Figura 27. Inhibición del crecimiento en *Selenastrum capricornutum*- tercer muestreo.

Esta muestra mostro ser la más tóxica de los tres muestreos realizados como se puede observar en

la tabla 10. El tratamiento con zeolita en el primer caso tuvo valores de toxicidad muy cercanos para el agua residual tratada y el agua residual tratada con zeolita. Sin embargo, la toxicidad fue mayo para el agua residual tratada con zeolita en todos los casos.

El tratamiento con cloro disminuye la toxicidad en ambas muestras.

Tabla 10. Resultados de CI₅₀ de *Selenastrum capricornutum*

	Muestra	Ecuación	r ²	CI ₅₀	IC ₉₅	NOAEL
Primer muestreo	ARHT	$y = 1.5714x + 1.5177$	0.8608	12.55%	8.36-19.31	6.25%
	ARHZ	$y = 0.9738x + 2.5404$	0.928	9.17%	6.84-12.3	N.C.
Segundo muestreo	ARHT	$y = 2.1373x - 0.5067$	0.8717	17.74%	16.43-19.17	12.5%
	ARHZ	$y = 0.8896x + 3.3154$	0.8748	6.64%	1.46-30.29	N.C.
	ARHCl	$y = 0,489x - 1,0741$	0,8516	26.59%	12.55-29.22	12.5%
Tercer muestreo	ARHT	$y = 0.6528x + 4.2713$	0.9048	3.06	0.67-13.87	6.25%
	ARHZ	Muy tóxica no se pudieron realizar los cálculos				
	ARHCl	$y = 0.8319x + 3.0007$	0.8791	10.97	4.04-29.47	N.C.

N.C.= no calculable.

El tratamiento con zeolita dio diferentes resultados entre los muestreos lo cual puede estar relacionado con los diferentes contaminantes inmersos en las muestras.

En todos los casos, se puede observar que a pesar de que existe una modificación con el tratamiento de zeolita natural modificada con HDTMA, la cercanía entre los efectos causados en

cada organismo evidencia que el material adsorbente si adsorbe los contaminantes y por tanto, mejora las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas del agua residual pero no disminuye significativamente la toxicidad del agua residual hospitalaria, es por ello, que deben optimizarse las condiciones del tratamiento o acoplarse a otros métodos de tratamiento.

8. CONCLUSIONES

La planta tratadora de aguas residuales cumple con la normatividad mexicana sin embargo, el agua sigue siendo tóxica.

El tratamiento acoplado planta tratadora de aguas residuales con zeolita modificada con HDTMA, mejora las propiedades fisicoquímicas (DBO-43.42%, DQO-28.63, G y A- 46.43, SST-47.46) y microbiológicas (CT-86.25% y CF- 71.85%).

El tratamiento acoplado con zeolita modificada no disminuye significativamente la toxicidad del agua residual por lo cual el tratamiento debe ser optimizado.

Existen fluctuaciones en el contenido de contaminantes en el agua residual hospitalaria, por lo cual los muestreos en diferentes fechas son de gran relevancia.

El agua residual induce el crecimiento de las semillas de lechuga pero produce efectos tóxicos a nivel morfológico.

Microtox fue muy sensible con el Basic Test al agua residual hospitalaria.

No se observó un efecto adverso en *Daphnia pulex* por la exposición aguda al agua residual hospitalaria. Sin embargo, se presentaron efectos en la exposición crónica a nivel reproductivo y de desarrollo.

El agua residual hospitalaria causa una aceleración en la madurez reproductiva de *Daphnia pulex* y un aumento en el tamaño de las crías.

El agua residual hospitalaria inhibe el crecimiento de *Selenastrum capricornutum* en un 50% de la población a concentraciones bajas (3.03-26%).

Lactuca sativa resultó ser el mejor organismo de prueba para la evaluación de la toxicidad aguda mientras que para la toxicidad crónica lo fue *Daphnia pulex*.

El desarrollo de estudios crónicos es importante para determinar la toxicidad del agua residual proveniente de efluentes hospitalarios.

REFERENCIAS

1. Akoteyon I, Omotayo A, Soladoye O, Olaoye H, 2011. Determination of Water Quality Index and Suitability of Urban River for Municipal Water Supply in Lagos-Nigeria. *European Journal of Scientific Research*. 54 (2), 263-271.
2. Ali A, Hasan Y, A- Farraj A, 2014. Olive mill wastewater treatment using a simple zeolite-based low-cost method. *J. Environ. Manage.* 145, 341-348.
3. Alvarez GS, 2015. Evaluación de la remoción de dicloxacilina en medio acuoso con una zeolita natural modificada con hexadeciltrimetilamonio (HDTMA). Tesis de doctorado. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
4. Arango SS, 2011. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*; 30(1): 75-82.
5. Bagur G. M.C., Estepa M.C., Martín P.F., Morales R.S., 2010. Toxicity assessment using *Lactuca sativa*. Bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *J Soils Sediments*. 11 (2), 281-289.
6. Bolong N, Ismail AF, Salim MR, Matsura T, 2009. A review of effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*. 239, 229-246.
7. Birkett J.W., Lester J.N. (2002) Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. Lewis Publishe, London.
8. Caldwell D.J., Mastrocco F., Anderson P.D., Lange R., Sumpter J.P., 2012. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol. *Environ Toxicol Chem*. 31(6), 1396-406.
9. Cano C., Roa G., Amaya A., Valdés R., Barra C., Balderas P., 2014. Tolerance of *Myriophyllum aquaticum* to exposure of industrial wastewater pretreatment with electrocoagulation and their efficiency in the removal of pollutants. *J.Environ.Biol*. 35 (1), 127-136.
10. Cano C.R., 2014. Remoción de contaminantes orgánicos presentes en Aguas residuales industriales empleando métodos electroquímicos y fitorremediación Tesis de doctorado. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
11. Castillo G, (2004) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México, IMTA.

12. Cortés, J., Calderon C, Martin A, Espino E, Gelover S, Hernández S, Moeller G, 2012. Endocrine Disruptors in Water Sources: Human Health Risks and EDS Removal through Water Treatment Alternatives. *Water Quality Management*: ISBN 978-953-307-1323-6. Nigel Quin (Ed.) Berkeley National Lab.
13. Czech B, Josko I, Oleszczuk P, 2014. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals in *Vibrio fischeri* and *Daphnia* before and after photooxidation process. *Ecotox. Environ. Safe.* 104, 247-253.
14. Dávila E.A.M. 2015. Identificación y cuantificación de fármacos por LC-MS presentes en aguas residuales provenientes de un hospital y evaluación de su remoción con una clinoptilolita modificada con HDTMA. Tesis de maestría. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
15. Dietrich S., Ploessl F., Bracher F., Laforsch C. 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere* 79; 60–66.
16. Egashira R, Tanabe S, Habaki H, 2012. Adsorption of heavy metals in mine wastewater by Mongolian natural zeolite. *Procedia Engineering* 42, 49-57.
17. Escher, B, Baumgartner, R, Koller, M, Treyer, K, Judit, L, Mc Ardell, C, 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75-92.
18. Estrada A, Baltazar E, Mijaylova P, Moeller G, Mantilla G, 2013. Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endocrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XIV, 02, 275-284. ISSN1405-7743, FI-UNAM.
19. Félix T, Durán J, Jiménez B, 2013. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci. Total Environ.* 454-455, 109-118.
20. Flohr L, Borges CJA, Gerson MW (2012) Acute and Chronic Toxicity of Soluble Fractions of Industrial Solid Wastes on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *The Scientific World Journal*, Article ID 643904, 10 pages.
21. Gamboa DPA, 2016. Identificación y cuantificación de fármacos presentes en efluentes de aguas residuales de una planta tratadora hospitalaria y evaluación de la remoción. Tesis de doctorado. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

22. Gabet G, 2010. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 408, 4257-4269.
23. Gibson R, Durán A, León E., Chávez A., Cisneros B, 2010. Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere* 81, 1437-1445.
24. Goldstein A, Aronov L, Kalman S, (1978) Farmacología. México. Limusa.
25. Gómez L, Galar M, Islas H, García S, San Juan N, 2014. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 164, 21-26.
26. González OA, 2015 Proceso de sorción de ranitidina con un material zeolítico modificado con hexadeciltrimetilamonio (HDTMA). Tesis de doctorado. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
27. Grupo Ángeles. Manifestación de impacto ambiental modalidad particular. Planta de tratamiento de aguas residuales del hospital ángeles Villahermosa [Internet] Disponible en:<http://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/tab/estudios/2010/27TA2010HD012.pdf>
28. Hamid H y Eskicioglu C, 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res.* 46, 5813-5833.
29. Hernando M.D., Fernández A.A.R., Tauler R., Barceló D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358-366.
30. Herrera C., 2013 Métodos de remoción y degradación de antibióticos en medio acuoso. Tesis de licenciatura. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
31. Homem V, Santos L, 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *J. Environ. Manage.* 92 (10), 2304-2347.
32. Islas H, Gómez L, Galar M, Colín A, Neri N, García S, 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox. Environ. Safe.* 92, 32-38.

33. Kumar N., Sinha D.K., (2010), Drinking water quality management through correlation studies among various physicochemical parameters: A case study, *International Journal of Environmental Sciences*, 1(2), 253-259.
34. Langford, K.H., Thomas, K.V., 2009. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* 35, 766-770.
35. Ley De Aguas Nacionales, México 1994.
36. Liu S, Ying G, Zhou L, Zhang R, Chen Z, Lai H, 2012. Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *Water Res.* 46, 3754-3768.
37. Ma Y, Wang X, Ngo H, Guo W, Wu M, Wang, 2014. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Sci. Total Environ.* 468-469, 1-11
38. Misaelides P, 2011. Application of natural zeolites in environmental remediation: A short review. *Micropor. Mesopor. Mat.* 144, 15-18.
39. NMX-AA-004-SCFI-2000. Determinación de sólidos sedimentables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
40. NMX-AA-005-SCFI-2000 Análisis de agua- Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
41. NMX-AA-006-SCFI-2000. Método para la determinación de materia flotante en aguas residuales y tratadas.
42. NMX-AA-008-SCFI-2011. Análisis de agua - Determinación del pH - Método de prueba- (cancela a la nmx-aa-008-SCFI-2000).
43. NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua- Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO₅) y residuales tratadas - Método de prueba.
44. NMX-AA-029-SCFI-2001 Análisis de aguas- Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba.
45. NMX-AA-030-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba
46. NMX-AA-034-SCFI-2001. Análisis de agua- Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de prueba.
47. NMX-AA-42-1987. Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *escherichia coli* presuntiva.

48. NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - Método de prueba.
49. NMX-AA-087-SCFI-2010. Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, straus (crustacea - cladocera) - Método de prueba.
50. NMX-AA-093-SCFI-2000. Análisis de agua - Determinación de la conductividad electrolítica - Método de prueba.
51. NMX-AA-099-SCFI-2006. Análisis de agua - Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales y residuales - Método de prueba.
52. NMX-AA-110- SCFI -1995. Análisis de agua – Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana kellogg* (crustacea – anostraca) – Metido de prueba.
53. NMX-AA-112-1995-SCFI Análisis de agua y sedimentos – evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum* – método de prueba.
54. NMX-AA-113-SCFI-2012. Análisis de agua – Medición del número de huevos de helminto en aguas residuales y residuales tratadas por observación microscópica - Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-113-SCFI-1999).
55. NOM- 001- SEMARNAT- 1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
56. NOM-003-ECOL-1997, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.
57. OECD Guidelines for the testing of chemicals, No. 201: “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”, Julio 2002.
58. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test. 2004.
59. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 211: "*Daphnia magna* Reproduction Test", Octubre 2012.
60. Orias F y Yves P, 2014. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*.
61. Oviedo D, Galar M, García S, Razo S., Gómez L, 2010. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 39-43.

62. Patil. P.N, Sawant. D.V, Deshmukh. R.N., 2012. Physico-chemical parameters for testing of water – A review.
63. Penagos D, Ortega L, Rodríguez C, 2012. Remoción de la materia orgánica y toxicidad en aguas residuales hospitalarias aplicando ozono. *Dyna*. 2012; 173, 109-115.
64. Punzi M., Anbalagan A., Aragão R., Svensson B.M., Jonstrup M., Mattiasson B., 2015. Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-Fenton oxidation: Evaluation of toxicity and microbial community structure. *Chem. Eng. J.* 270, 290–299.
65. Rakic V, Rajic N, Dakovic A, Auroux A, 2013. The adsorption of salicylic acid, cetylsalicylic acid and atenolol from aqueous solutions onto natural zeolites and clays: Clinoptilolite, bentonite and kaolin. *Micropor. Mesopor. Mat.* 166, 185-194.
66. Rizzo L, 2009. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res* 4311-4340.
67. Rodríguez R, Robles S, Ruíz P, López L, Sedeño D., Rodríguez D, 2014. Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del río Chalma. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 30 (3), 307-316.
68. Rossner A, Snyder S, Knappe R, 2009. Removal of emerging contaminants of concern by alternative adsorbents. *Water Res.* 43, 3787-3796.
69. Rivera GE, 2016. Biodegradación bacteriana de la penicilina G en agua residual proveniente de un hospital y su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución. Tesis de licenciatura. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
70. SEMARNAT, 2008 Indicadores de calidad del agua. [En línea] Disponible en: http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/estadisticas/compendio2010/10.100.13.5_8080/ibi_apps/WFServlet28b9.html
71. Solache M, Villalva R, Díaz M, 2010. Sorption and Desorption of Remazol Yellow by a Fe-Zeolitic Tuff. *J. Mex. Chem. Soc.* 54(1), 59-68.
72. Smital T, Terzic S, Zaja R, Senta I, Pivcevic B, Popovic M, Mikac I, 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 844–851.

73. Tecuapetla M, 2014. Ecotoxicidad producida por agroquímicos empleados en el cultivo de *Gerbera jamesonii* en invernadero, en Villa Guerrero, Estado de México. Tesis de maestría. Toluca, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
74. Torres J, 2005. Evaluación de las propiedades adsorbentes de una roca zeolítica modificada para la remoción de colorantes azoicos como contaminantes del agua. Tesis de Licenciatura, México. Facultad de Química. UAEMex.
75. Tsolaki E., Pitta P., Diamadopoulos E. Electrochemical disinfection of simulated ballast wáter using *Artemia salina* as indicator. *Chem. Eng. J.* 156 (2), 305-312.
76. US EPA, 1993. Parameters of water quality: interpretations and standards.
77. US EPA (US Environmental Protection Agency) (1996) Ecological effects test guidelines. Seed germination/root elongation toxicity test. OPPTS 850.4200.
78. US EPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.
79. US EPA, 2013 Operating procedure wastewater sample.
80. Vedrenne M, Vasquez-Medrano R, Prato-Garcia D, Frontana-Urbe BA, Ibanez JG. 2012. Characterization and detoxification of a mature landfill leachate using a combined coagulation–flocculation/photo Fenton treatment. *J Hazard Mater* 205: 208–15.
81. Vidal C, Raulino G, Lima A, Ribeiro J, Pires M, Nascimento R., 2012. BTEX removal from aqueous solutions by HDTMA-modified Y zeolite. *J. Environ. Manage.* 112, 178-185.
82. Weinrich L, Jjemba P, Giraldo E, LeChevallier M, 2010. Implications of organic carbon in the deterioration of water quality in reclaimed water distribution systems. *Water Res.* 44, 5367-5375.
83. Xu N, Xu Y, Xu S, Li J, Tao H. 2012. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: A Chinese perspective. *Environ. Pollut.* 165, 215-224.
84. Ye Z, Zhao Q, Zhang M, Gao Y, 2011. Acute toxicity evaluation of explosive wastewater by bacterial bioluminescence assays using a freshwater luminescent bacterium, *Vibrio qinghaiensis* sp. *J. Hazard. Mater.* 186 (2-3), 1351-1354.
85. Yu X, Zuo J, Li R, Gan L, Li Z, Zhang F, 2014. A combined evaluation of the characteristics and acute toxicity of antibiotic wastewater. *Ecotox. Environ. Safe* 106, 40-45.

86. Yves P, Bazin C, Bony S, Devaux A, Bertrand-Krajewski J, Cren-Olivé C, Roch, Brelot E, 2013. A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital. *Chemosphere* 90, 1037-1046.
87. Zagatto, P. A., Lorenzetti, M. L., Perez, L. S. N., Menegon, Jr. N. and Buratini, S. V. 1998. Proposal for a new water quality index. Verhandlungen der internationale Vereinigung fur theoretische und angewandte. *Limnologie* 26, 2449–2451.
88. Zhou S., Watanabe H., Wei C., Wang D., Zhou J., Tatarazako N., Masunaga S., Zhang Y. (2015) Reduction in toxicity of coking wastewater to aquatic organisms by vertical tubular biological reactor. *Ecotox. Environ. Safe* 115, 217–222.
89. Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoli, M. 1981. Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle*. 22: 54–57.