



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

ESTUDIO SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LAS ALMAZARAS SOBRE *DAPHNIA MAGNA*

Alumno: Garrido Godino, Francisco

Tutora: Prof. Dña Gema Parra Anguita
Dpto: Departamento de Biología Animal, Biología
Vegetal y Ecología.

Diciembre, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Centro de Estudios de Postgrado

**Máster Universitario en Análisis, Conservación y
Restauración de Componentes Físicos y Bióticos de los
Hábitats**

Trabajo Fin de Máster

**ESTUDIO SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS AGUAS
RESIDUALES DE LAS ALMAZARAS SOBRE
*DAPHNIA MAGNA***

Francisco Garrido Godino

DIRECCIÓN

Dra. Gema Parra Anguita

Jaén, Diciembre 2020

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Problemática de la contaminación por las aguas residuales de las almazaras	7
1.2. Formación y Composición.....	8
1.3. Depuración de las aguas residuales	9
1.4. <i>Daphnia</i> (Características y ciclo de vida)	9
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL Y MÉTODOS	14
4.1. Selección de individuos para el ensayo	14
4.2. Formación de colonia de <i>D. magna</i>	14
4.3. Muestreo de alpechín (zona y método de muestreo).....	15
4.4. Procedimiento experimental de determinación de polifenoles totales	16
4.4.1. Procedimiento experimental.....	17
4.5. Preparación de las diluciones para los ensayos de 48 horas y 21 días con <i>D.magna</i>	17
4.6. Ensayo de 48 horas de exposición para el cálculo de la dosis letal media (DL50).....	18
4.6.1. Descripción del ensayo.....	19
4.6.2. Validación del test.....	20
4.7. Test de reproducción 21 días	20
4.7.1. Validación del ensayo	21
4.8. Análisis estadístico de los resultados	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Cálculo de polifenoles totales presentes en el alpechín	23
5.2. Ensayo de supervivencia.....	24
5.2.1. Representación gráfica de la mortalidad respecto a la concentración	26
5.2.2. Gráfico de dosis-respuesta	27
5.2.3. Curva de supervivencia	28
5.2.4. Dosis letal	29
5.2.5. Gráfica de verificación predictiva	30
5.3. Ensayo de reproducción.....	31
5.3.1. Tabla de supervivencia en el ensayo de reproducción	33
5.3.2. Mortalidad en el ensayo de reproducción.....	35
5.3.3. Gráfico de dosis-respuesta	36

5.3.4. <i>Descendencia acumulada</i>	37
5.3.5. <i>Cálculo estadístico</i>	38
5.3.6. <i>Gráfico de respuesta a la dosis</i>	39
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9. RESUMEN DE LAS ASIGNATURAS CURSADAS EN EL MÁSTER	51
10. CURRICULUM VITAE	54

RESUMEN

Hoy en día existen grandes problemas asociados a la contaminación de aguas residuales provenientes de las almazaras (alpechín) que una vez llegan al medio acuático contaminan todo el ecosistema debido a su alta toxicidad. Debido a estos problemas asociados a la producción del aceite se propuso este trabajo para conocer el poder de toxicidad sobre bioindicadores presentes en las zonas acuáticas cercanas a las salidas de residuos de las almazaras. En nuestro estudio utilizamos la especie *Daphnia magna* de la clase Crustácea. Para comprobar la toxicidad del alpechín se realizaron dos experimentos: un primero de supervivencia donde se obtuvo una dosis letal del 50% con una dilución de alpechín de 4,74% demostrando una alta toxicidad sobre estos individuos. El segundo ensayo se centró en los efectos subletales como es la reproducción, con un experimento de exposición de 21 días a dos diluciones de 1% y 2%, obteniendo unos resultados que nos indican un retraso en la puesta y una inhibición casi total en la puesta en la concentración del 2%. Finalmente haciendo alusión a los resultados pudimos confirmar nuestra hipótesis de la alta toxicidad tanto letal como sub-letal del alpechín sobre las *Daphnia magna*.

Palabras clave: Alpechín, polifenoles, Zooplankton, DL50%, ecotoxicología y neonatos.

ABSTRACT

Nowadays there are major problems related with the contamination of wastewater from oil mills (alpechín) that, once they reach the aquatic environment, they contaminate the entire ecosystem due to their high toxicity. Due to these problems, associated with oil production, this work was proposed to find out the power of toxicity on bio-indicators present in the aquatic areas near the waste outlets of the oil mills. In our study, we used the *Daphnia magna* species, which belong to the Crustacea class. To verify the toxicity of vegetable water, two experiments were carried out: the first one was a survival experiment where a lethal dose of 50% was obtained with a concentration a vegetable water dilution of 4.74%, thus demonstrating a high toxicity on these individuals. The second trial focused on sub-lethal effects, such as reproduction, with a 21-day exposure to two dilutions of 1% and 2%, obtaining results that indicate a delay in laying and an almost total inhibition in laying put in the concentration of 2%. Finally, referring to the results, we were able to confirm our high toxicity hypothesis both lethal and sub-lethal toxicity of vegetable water on *Daphnia magna*.

Key words: Alpechín, polyphenols, Zooplankton, LC50%, ecotoxicology and neonate

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática de la contaminación por las aguas residuales de las almazaras

Según el Consejo Oleícola Internacional (International Olive Oil Council, 2010) los principales países que producen aceite de oliva se encuentran en la Unión Europea (74,3%) en lo que se subdivide el 46,2% en España, 15% Italia, 10% Grecia y un 1,9% en Portugal. El consumo mundial de aceite de oliva también se concentra en la zona mediterránea, más concretamente en Italia (23,5%), España (19,1%) y Grecia (7,8%) y fuera de Europa los Estados Unidos con un 9% son el país con mayor consumo de este producto.

La demanda del aceite de oliva es debido a sus características beneficiosas para la salud, esta generalmente aceptado que el consumo de aceite de oliva provoca una reducción de factores de riesgo como enfermedades coronarias o prevención de varios tipos de cáncer (Tuck & Hayball, 2002).

Pero los problemas vienen cuando hablamos de los desechos que producen la manufacturación del aceite de oliva, estos problemas se agrupan en dos grandes grupos:

- La toxicidad de las aguas residuales de las almazaras (alpechín) la cual si son vertidas al medio pueden causar daños considerables en el suelo, aguas superficiales, aguas subterráneas y por consiguiente en el ecosistema en el que se viertan (Justino et al., 2012).
- Las grandes cantidades de agua que son necesarias para producir el aceite de oliva (Justino et al., 2012).

La eliminación de los efluentes de las almazaras es un grave problema ambiental debido a su elevada concentración de polifenoles, taninos, gran cantidad de materia orgánica, sólidos en suspensión y acidez.

En los últimos años ha habido muchos estudios que abordaban la forma de tratar las aguas residuales de almazara, pero la ecotoxicidad de estas aguas problema rara vez se ha estudiado (Paixao, Mendoça, Picado & Anselmo, 1999).

El objetivo del presente trabajo es buscar el grado de toxicidad que presentan estas aguas residuales producidas en las almazaras, utilizando a los microcrustaceos plantónicos *Daphnia* del orden cladócero.

1.2. Formación y Composición

A pesar de los numerosos beneficios económicos y sobre la salud del aceite de oliva, los países productores se enfrentan con dos problemas ambientales serios como son el consumo de grandes cantidades de agua y la alta toxicidad de los efluentes resultantes (Justino et al., 2012).

El proceso tradicional por lotes de la extracción de aceite ha quedado obsoleto y ahora se pueden utilizar dos procesos continuos diferentes, que pueden ser, sistemas de extracción en dos fases o en tres fases (Obied et al., 2005).

Estos procesos tienen como desechos resultantes un efluente líquido negro llamado aguas residuales de molino de aceite de oliva (OMW), y un residuo sólido, al cual normalmente se le conoce como orujo (Asses, Ayed, Bouallagui, Sayadi & Hamdi, 2009).

El proceso de extracción consiste en la molienda de las aceitunas y el presado de las mismas para separar la cáscara y los demás sólidos residuales que pueden contener aceite el cual posteriormente se recupera con la extracción de disolventes. Finalmente se separa el aceite de las aguas residuales mediante centrifugación.

El volumen de aguas residuales obtenido por el proceso tradicional es de 0,5/0,6 m³/ton de aceitunas mientras que en el proceso continuo se genera 1,3/1,4 m³ de aguas residuales lo que nos proporciona unas aguas más diluidas y con menor toxicidad (Paixao, Mendoça, Picado & Anselmo, 1999).

La cantidad de polifenoles que se encuentran en el alpechín dependerá del procedimiento de extracción del aceite. El proceso más común es el continuo que consiste en adicionar a la pasta de aceitunas grandes cantidades de agua para facilitar la centrifugación. Esta agua disminuye la concentración de alpechín, pero genera una enorme cantidad de residuos.

Esta cantidad de polifenoles presente en las aguas residuales de las almazaras junto con otras sustancias orgánicas producen una demanda química del oxígeno (DQO) de 50.000 mg/L (Durán, Padilla, Martín, de Ursinos & Mendoza, 1991).

Los orto-difenoles tienen un porcentaje menor en el alpechín que en la pulpa de la aceituna donde este compuesto es de carácter mayoritario donde pueden llegar al alcanzar el 90% del total de los polifenoles. Pero en el alpechín este porcentaje se reduce considerablemente debido a las oxidaciones que se producen durante la extracción del aceite.

Otros compuestos que se encuentran en el alpechín son: meta-difenoles y flavonoides. Según los resultados del estudio de Durán et al. (1991) que la presencia de catequinas y taninos condensados no suponen apenas contribución a los polifenoles del alpechín.

1.3. Depuración de las aguas residuales

La depuración se lleva a cabo en dos fases. En la primera al alpechín se le realiza un tratamiento aerobio con microorganismos específicos que se prolonga durante 5 días, tras pasar este periodo de tiempo se ha disminuido considerablemente los polifenoles totales, orto-difenoles, meta-difenoles y la demanda química de oxígeno(DQO) presentes en el alpechín.

Posteriormente en la segunda fase, el alpechín residual que ya ha pasado por la centrifugadora y se le ha extraído la biomasa se somete a un proceso de biometanización anaerobia con la ayuda de un reactor discontinuo de mezcla completa que contiene Sepiolita como soporte para la inmovilización de las bacterias que realizan este proceso (Durán et al., 1991).

1.4. *Daphnia* (Características y ciclo de vida)

La *Daphnia magna* es la especie que vamos a utilizar como bioindicador para conocer la capacidad de toxicidad de las aguas residuales de las almazaras (alpechín) a su llegada al medio ambiente.

La ubicación taxonómica de las *daphnias* es:

PHILUM	ARTROPODA
CLASE	CRUSTÁCEA
SUBCLASE	BRACHIOPODA
ORDEN	DIPLOSTRACA
SUBORDEN	CLADOCERA
FAMILIA	DAPHNIDAE
GÉNERO	<i>Daphnia</i>

El género *Daphnia* denominado comúnmente como “pulga de agua” debido a su cierta similitud tanto en forma como en movimiento, presenta un cuerpo ovalado, achatado por los

costados y sin segmentación externa. Son exclusivos de aguas dulces, habitando lagos, lagunas, charcas permanentes o de carácter temporal (Ebert, 2005).

Respecto a su estructura externa, el género *Daphnia* presenta un tamaño que oscila entre 0.2 y 3mm. Se caracteriza por tener un caparazón quitinoso que protege tanto la cabeza como el cuerpo. En la parte ventral aparece una pieza cuticular plegada, en cambio en la zona dorsal, abdominal y torácica el caparazón se encuentra sellado. Se le denomina cabeza a la parte más separa del cuerpo la cual presenta un pico corto de forma variable, además de 2 anténulas de tamaño y forma variable, las cuales se encuentran en la zona ventral de la cabeza. Cada una de estas anténulas tiene un gran número de sedas sensitivas apicales. A cada lado se encuentra un fórnix, una quilla donde aparecen dos antenas fuertes, móviles y biseriadas. Las cuales tienen una función natatoria.

Finalmente, en la zona dorsal del cuerpo aparece la cámara de cría, que puede tener dos funciones. La primera es de almacenamiento de huevos partenogenéticos o bien la segunda es la transformación de la misma en el epipio que aloja uno o dos huevos de resistencia (González Gómez & Gutiérrez Álvarez, 1995).

Pasando a su estructura interna y nutrición el género *Daphnia* tiene un sistema digestivo muy simple el cual inicia en la boca ventral y acaba en el ano que se encuentra en la zona post-abdomen. Las partículas alimenticias pasan a través de un corto esófago y al llegar al intestino medio son digeridas y asimiladas. Las daphnia son organismos filtradores de aguas que separan las partículas de materia orgánica. Este proceso lo desencadena un movimiento producido por los cinco o seis pares de patas torácicas que desplazan el agua y las partículas hacia la boca del organismo (González Gómez & Gutiérrez Álvarez, 1995).

La dieta alimenticia de estos cladóceros son las algas unicelulares que presentan gruesas paredes que son digeridas fácilmente y consumidas por completo. También consumen algas coloniales las cuales presentan vainas gelatinosas que pasan intactas a través del todo el conducto digestivo.

El ciclo de vida de esta especie tiende a reproducirse tanto asexual (en condiciones óptimas "partenogénesis") como sexualmente (condiciones desfavorables "gametogénesis"), es decir, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre utilizará un tipo de reproducción u otro (González Gómez & Gutiérrez Álvarez, 1995).

En los cultivos madre con buen mantenimiento, la reproducción que se da es asexual debido a las hembras diploides. Las daphnias adultas producen huevos partenogenéticos que se generan en la cámara de incubación dorsal los cuales engendran a individuos jóvenes.

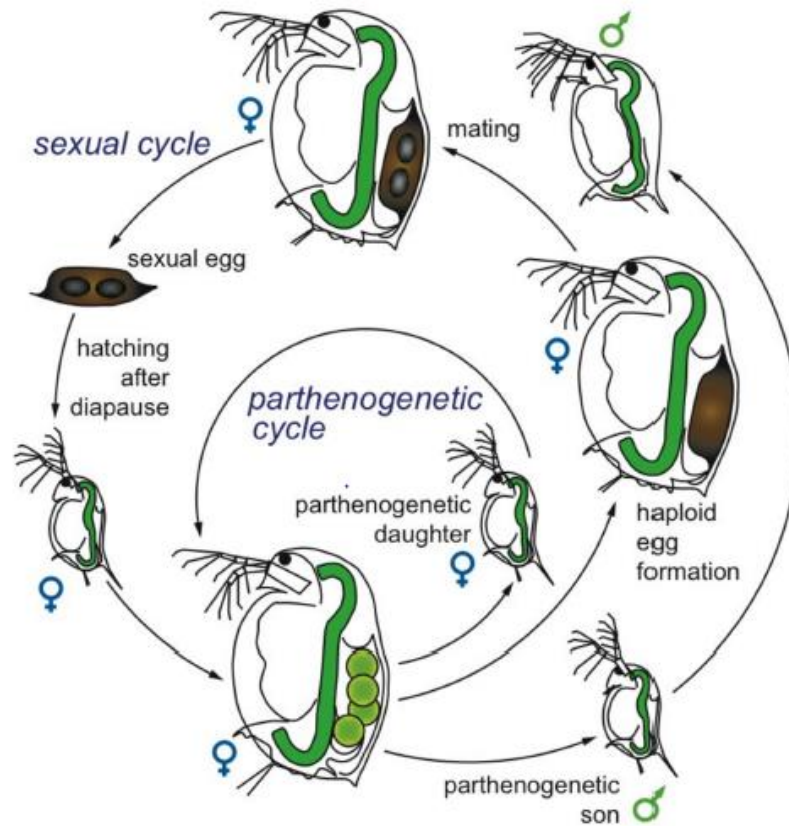


Figura (1): Ciclo reproductor partenogenético de las *Daphnia* (Ebert, 2005).

Estos jóvenes individuos pasan por distintas fases larvarias sucesivas antes de producir huevos.

En condiciones ambientales específicas (las cuales se denominan “agentes estresantes”) producen en las daphnias un cambio del tipo de reproducción de asexual a sexual, en el cual producen machos haploides además de huevos haploides, que requieren ser fertilizados por los machos.

Las hembras producen entonces un caparazón en la zona dorsal denominado efipio en el que en su interior se depositan dos huevos que necesitan ser fecundados. A estos huevos se le denominan “huevos de dormancia”.

El efipio sale al exterior con la siguiente muda de la hembra y tras hundirse queda en el fondo.

Por lo general los huevos de dormancia pasan por una fase refractaria que pueden durar hasta varios meses, mientras este activa esta fase los huevos no podrán responder a los estímulos los cuales disparan el desarrollo de los embriones y que conducen a la eclosión y alumbramiento de los neonatos.

Los denominados “neonatos” son los individuos que acaban de nacer o que acaban de eclosionar. En lo que respecta a la normativa internacional, un neonato es una daphnia en el primer estadio de desarrollo larvario, es decir, con una edad inferior a 24h (UNE-EN ISO 6341, 2013).

2. HIPÓTESIS

La presencia de alpechín en el medio natural afectará de forma letal y sub-letal, en función del grado de dilución, a *D. magna*.

3. OBJETIVOS

Estudiar los efectos del alpechín (aguas residuales de las almazaras) sobre las *D. magna* en laboratorio evaluando cómo afecta el grado de dilución. En este trabajo se estudiará tanto el efecto letal del alpechín sobre los individuos como su efecto en la reproducción.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Selección de individuos para el ensayo

Los organismos que vamos a utilizar para este ensayo van a ser neonatos de *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera Crustacea*) obtenidos por partenogénesis en condiciones de cultivo. Respecto a las características que van a presentar estos animales, su edad no debe de tener una edad menor de 24 horas y de proceder de una generación distinta a la primera generación de descendientes.

Los individuos de *D. magna* deben de proceder de un cultivo sano que no presente indicios de estrés como podría ser la presencia de efipios, animales descoloridos, machos, una mortalidad superior al 20% o un retraso en la producción de la primera progenie. Cuando se cumplen estas condiciones se aíslan las hembras grávidas se recogen los neonatos nacidos en las últimas 24 horas (UNE-EN ISO 6341, 2013).

Si las condiciones de ensayo difieren notablemente de las condiciones de cultivo, es necesario aclimatar las condiciones de ensayo durante una semana para evitar inducir un estrés innecesario a los individuos que formen parte del ensayo.

4.2. Formación de colonia de *D. magna*

Con el fin de obtener individuos y neonatos suficientes para los ensayos se creó un acuario a partir de 5 hembras las cuales presentaban en el dorso huevos en la cámara incubadora, con el fin de que se reprodujesen de forma partenogenética y así tener una colonia de hembras lo más similar posible.

Para evitar la aparición de efipios y de machos se añadió vitaminas con el fin de provocar la reproducción partenogenética.

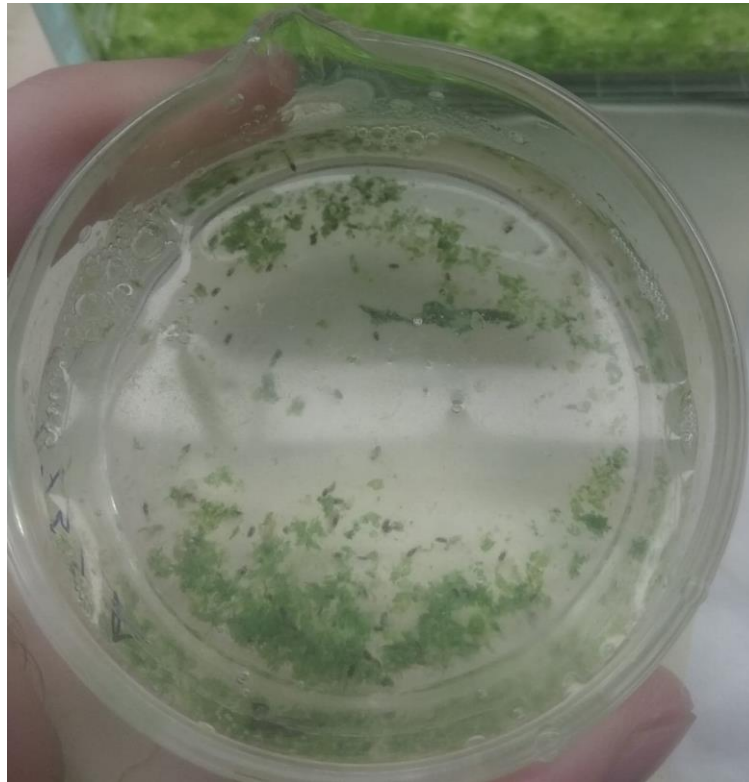


Figura (2): Muestra de los efipios extraídos de la población del acuario.

Las vitaminas que se añadieron son:

- Vitamina B12
- Vitamina B1
- Biotina
- Selenito

Las 5 hembras sin huevos que se seleccionaron inicialmente se depositaron en vaso de precipitado de 250 ml durante 10 días con alimento en exceso.

Tras pasar los 10 días y haber aumentado el número de hembras considerablemente se traspasaron a un acuario de 1 litro con alimento en exceso y cada 14 días se le añadieron las vitaminas para evitar la aparición de efipios.

4.3. Muestreo de alpechín (zona y método de muestreo)

El muestreo de las aguas residuales de las almazaras se realizó en la provincia de Jaén, concretamente a las afueras de la localidad de Torredelcampo. El muestreo se realizó en varios embalses de la cooperativa los cuales iban almacenando el alpechín distribuidos según su antigüedad.

Las muestras que obtuvimos fueron de la campaña de recolecta la cual acababa de concluir (2019/2020).

Se tomaron 3 muestras de 2L las cuales se cogieron de distintas partes del embalse y de una profundidad aproximada de casi 1 metro de profundidad.

Las muestras se congelaron tras el muestreo para conservar el alpechín hasta utilizarlo con los ensayos con daphnias y la cuantificación de polifenoles.



Figura (3): Imagen de la almazara donde se puede observar los tanques de alpechín donde se realizó el muestreo.

4.4. Procedimiento experimental de determinación de polifenoles totales

El efecto contaminante de las aguas residuales de las almazaras (alpechín), está condicionado por la concentración de polifenoles presentes en las mismas, debido a esto realizamos la cuantificación de polifenoles totales presentes en el alpechín que han sido muestreados en una almazara de la localidad de Torredelcampo (Jaén).

La expresión de los resultados de los polifenoles totales se lleva a cabo a partir de ácido gálico por unidad de volumen. Para la cuantificación de polifenoles totales en las muestras de alpechín es necesario realizar una recta patrón de ácido gálico en metanol, como podemos observar en la gráfica (1) de una de las rectas utilizadas en este trabajo.



Figura (4): Recta de calibrado de Gálico para el cálculo de los polifenoles totales.

4.4.1. *Procedimiento experimental*

Para la determinación de los polifenoles totales de las disoluciones se ha utilizado el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se ha utilizado Na_2CO_3 al 7,5% con agua destilada y reactivo Folin diluido (1:10 con agua destilada).

A continuación, se colocaron 300 μL de la muestra, tanto las diluciones correspondientes de cada muestra como de las diluciones de la recta patrón. Posteriormente añadimos 2,5mL de la dilución de Folin y agitamos en Vortex. A continuación, adicionamos 2ml de Na_2CO_3 (7,5%) y volvemos a agitar en Vortex. Se deja incubar una hora a temperatura ambiente y aislada de la luz. Transcurrido ese tiempo de incubación se mide la absorbancia de las muestras a 760nm con un espectofotómetro.

4.5. **Preparación de las diluciones para los ensayos de 48 horas y 21 días con *D.magna***

Para realizar las diluciones previamente se filtró el alpechín para eliminar los sólidos en suspensión que contenía y que se pudiese diferenciar y observar con mayor claridad el estado de las daphnias.

Posteriormente con la ayuda de pipetas, micropipetas, vasos de precipitado de 250ml y de 50ml, probetas y matraces se realizaron las siguientes diluciones: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6%, 4,5%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,75% y 0,5%.

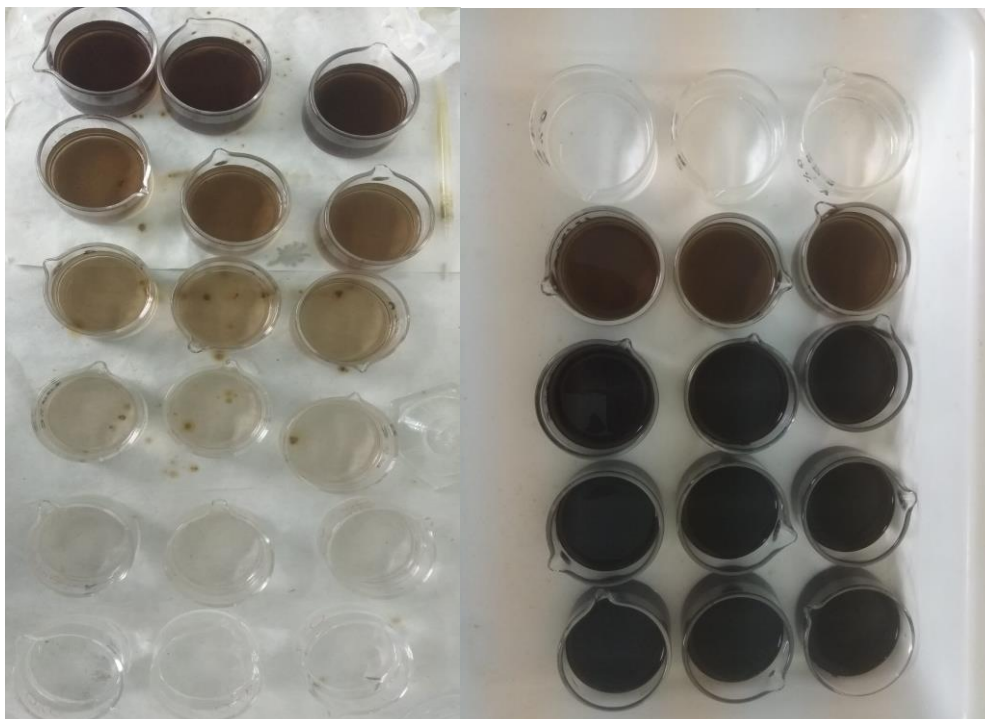


Figura (5): Vasos de 50ml con diferentes diluciones de alpechín para el ensayo de supervivencia de las daphnias.

Estas diluciones se prepararon en varias tandas de 3 o más réplicas por concentración para el experimento de 48 horas de exposición.

En el ensayo de 48 horas se preparaban 150 ml de disolución a las distintas concentraciones de alpechín y se repartía entre los tres vasos de 50 ml.

En cambio, en el ensayo de 21 días se prepararon dos concentraciones de 600 ml para repartirlos en los 4 vasos de precipitado adicionando 150 ml en cada uno de ellos.

4.6. Ensayo de 48 horas de exposición para el cálculo de la dosis letal media (DL50)

Las directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas se revisan periódicamente. La directriz 202 sobre "*Daphnia sp*, Prueba de inmovilización aguda y prueba de reproducción" adoptada en abril de 1984, incluye dos partes:

- Parte I: La prueba de inmovilización aguda EC50 de 24 horas.
- Parte II: La prueba de reproducción (mínimo de 14 días).

Esto dio lugar a la publicación de la directriz de prueba 211 sobre “Prueba de reproducción de *Daphnia magna*” en septiembre de 1998.

Esta directriz detalla una prueba de toxicidad aguda para evaluar los efectos de las sustancias químicas sobre las daphnias. Las principales deferencias con la versión anterior.

Es la extensión de la duración del ensayo a 48 horas de exposición, lo que conlleva a obtener una mayor información sobre los medios de cultivo y de ensayo utilizados en el experimento (OECD, 2004).

4.6.1. Descripción del ensayo

Las daphnias jóvenes, que hayan nacido 24 horas antes del ensayo se exponen a la sustancia problema que queremos comprobar su toxicidad. En un rango de diluciones durante un periodo de 48 horas. En nuestro caso el porcentaje de agua problema fueron: 0/ 0.5/ 0.75 / 1/ 1.5/ 2 / 2.5/ 4.5 / 6/ 12.5 / 25 / 50 / 100.

A las 24 horas se monitoreaban las muestras y a las 48 horas se registraban el número de muertes que presentaban cada réplica.

Cada una de nuestras diluciones consta como mínimo de 3 réplicas.

En cada vaso (réplica) se colocaban 50ml de cada dilución además de 5 neonatos (individuos con una edad menor a 24 horas).

Finalmente, los resultados se reúnen para poder calcular la DI50, es decir, la cantidad e dosis de una sustancia que provoca la muerte para la mitad de la población en un periodo de tiempo determinado.

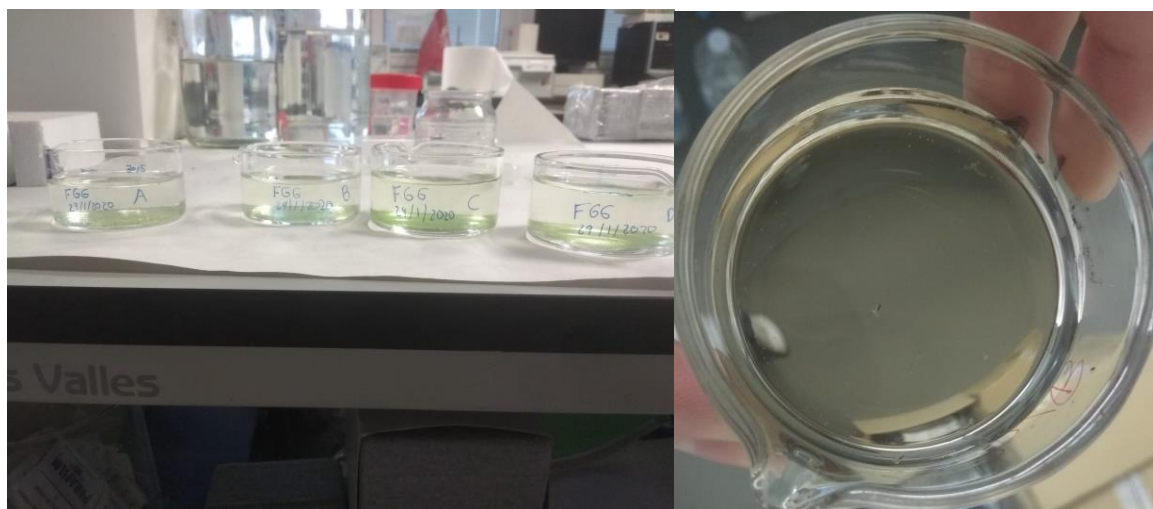


Figura (6): En estas imágenes se muestran los vasos de 50ml con las 5 daphnias para el ensayo de supervivencia.

4.6.2. Validación del test

Para que el ensayo sea válido se deben cumplir los siguientes criterios:

- Los neonatos presentes en el control no tengan una tasa de mortalidad mayor al 10%.
- La concentración de oxígeno al finalizar el ensayo no debe de ser menor a 3 mg/L en el control.
- Los neonatos en el control no deben de presentar signos de enfermedad como pueden ser decoloración, parálisis o comportamiento inusual.

4.7. Test de reproducción 21 días

La finalidad principal de este ensayo es evaluar el efecto de las aguas residuales de las almazaras en la capacidad reproductiva de *D. magna*.

Al inicio del ensayo se utilizan hembras con una edad menor a 24 horas para que puedan sobrevivir a toda la duración del experimento.

El ensayo consiste en la exposición de estas hembras con diluciones de alpechín con una concentración menor a la DL50 que hemos calculado en el ensayo de 48 horas de exposición. Durante todo el transcurso de los 21 días que dura el experimento se realiza dos cambios de medio cada 7 días y a partir de la primera semana se realiza cada 3 días un conteo y extracción de los neonatos producido por las hembras fértiles.

A diferencia de otras pruebas de reproducción de invertebrados de la OCDE OECD (2012), si el animal parental muere accidentalmente durante el periodo de prueba su producción de descendencia puede excluirse de la evaluación de datos, en cambio si la mortalidad de los padres sigue un patrón de concentración respuesta la mortalidad parental debe de asignarse como un efecto de la sustancia (alpechín) de ensayo y los neonatos no deben de excluirse a la hora del análisis. El efecto tóxico de la sustancia sobre el rendimiento reproductivo de las daphnias se expresa como concentración de efecto para un porcentaje de la población x (en inglés EC x) (OECD, 2012).



Figura (7): Vasos de precipitado con las diluciones de alpechín utilizadas en el ensayo de reproducción.

4.7.1. Validación del ensayo

Para comprobar la validez de este ensayo se deben de cumplir los siguientes criterios en los controles:

- La mortalidad en el control no debe de superar el 20% al final de la prueba.
- El número de descendientes vivos producidos por los animales parentales al final de la prueba debe de ser superior al 60%.

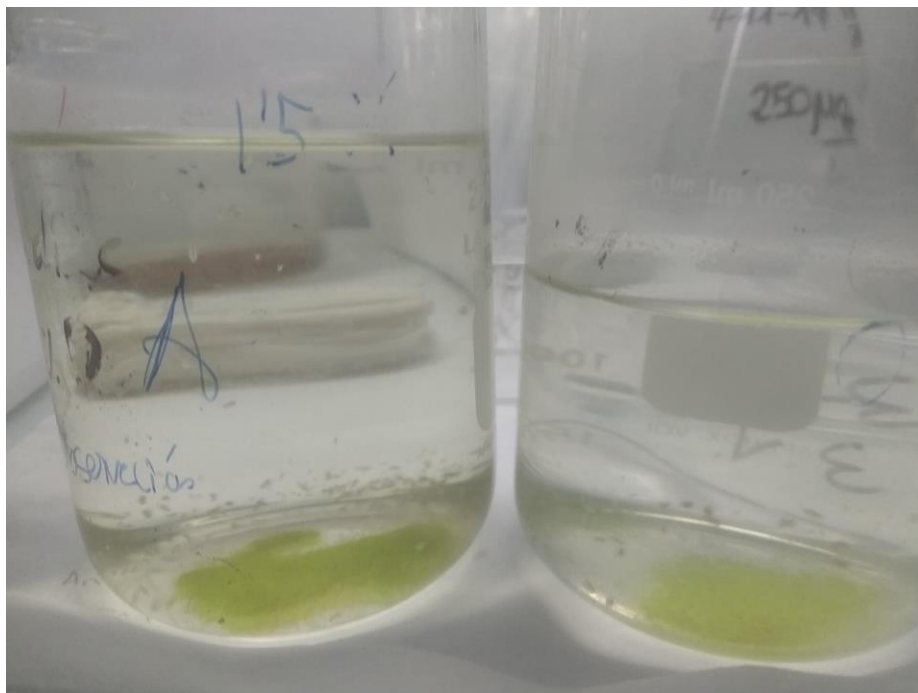


Figura (8): En esta figura se muestran dos vasos de precipitado, en los cuales se depositaron los neonatos que provenían de los controles. Estos neonatos se extrajeron en el monitoreo del ensayo de reproducción para probar la validación del ensayo.

4.8. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados recogidos de los ensayos de supervivencia (exposición de 48 horas) y los ensayos de reproducción (21 días) se utilizó la herramienta de Mosaic (Baudrot et al., 2018), (Forfait-Dubuc, Charles, Billoir & Delignette-Muller, 2012).

La cual permite a los ecotoxicólogos y organismos reguladores un manejo rápido y eficaz de los datos recogidos durante el ensayo. Además de brindar a los usuarios métodos avanzados e innovadores para la evaluación cuantitativa del riesgo ambiental que se haya a evaluar.

En nuestro trabajo se ha utilizado Mosaic en el ensayo de supervivencia debido a que nos proporciona un análisis completo de los datos de supervivencia del bioensayo, incluidos resúmenes descriptivos de los datos y la estimación de los valores de DL_x (x% de concentración letal).

Todos los cálculos generados se basan en el paquete de R llamado MORSE (Baudrot et al., 2018), (Forfait-Dubuc, Charles, Billoir & Delignette-Muller, 2012).

La fórmula de la tasa de supervivencia media la cual utiliza mosaic en el momento final está relacionada con la concentración de contaminante (c) con una relación log-logística de tres parámetros:

$$F(c) = r_e / 1 + (C / m_i)^s$$

Respecto al uso de Mosaic en el análisis completo de los datos de reproducción en el ensayo de exposición de 21 días, se obtuvieron resúmenes descriptivos de los resultados y una estimación de los valores CEx (x% del efecto de la concentración en la tasa de reproducción).

La función de Mosaic repro estima el efecto de un contaminante sobre la mortalidad que se presente en el bioensayo. A esto es debido la presencia de los datos de supervivencia en cada día de muestreo en los cuales los individuos tendrían la capacidad de reproducirse.

Posteriormente se estima la tasa de reproducción en términos de número de crías por días (Charles et al., 2016).

5. RESULTADOS

5.1. Cálculo de polifenoles totales presentes en el alpechín

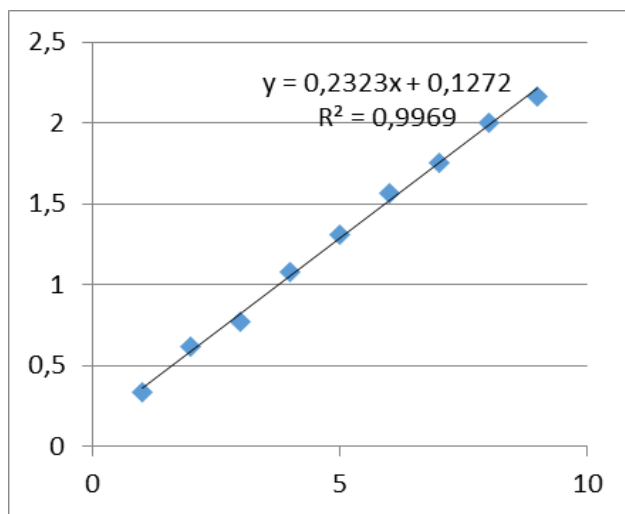
En este ensayo se analizaron tres diluciones de la muestra de alpechín recogida una almazara de Torredelcampo. Cada una de ellas consta de tres réplicas, las cuales se analizaron mediante método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Al comienzo del ensayo se obtuvo una recta de calibrado la cual se muestra en la gráfica (1), la cual nos ha permitido calcular las concentraciones en Gálico equivalente.

Las medidas de absorbancia junto con las concentraciones las cuales se obtuvieron mediante método de Folin-Ciocalteu se muestran en la tabla (1).

Como podemos observar, utilizando la recta de calibrado y los resultados de la medida de absorbancia a 760nm se ha podido obtener el resultado de los polifenoles totales de la muestra al 100%. El valor proyectado al 100% de alpechín, es aproximadamente de 22,674 (g/L).

La cantidad de 22,674 (g/L) es muy elevada como podremos comprobar en los ensayos, en los cuales tendrá un efecto adverso sobre la supervivencia y la reproducción de las daphnias cuando están en contacto con las aguas residuales de las almazaras.



Gráfica (1): Muestra la recta de calibrado que hemos utilizado para calcular la cantidad de polifenoles de Gálico equivalente.

% de dilución	ABS 765	Gálico equivalente
0.5	0.062	-0.280671545
0.5	0.063	-0.276366767
0.5	0.057	-0.302195437
3	0.279	0.653465347
3	0.279	0.653465347
3	0.277	0.64485579
6	0.454	1.40680155
6	0.453	1.402496771
6	0.464	1.449849333

Tabla (1): Esta tabla muestra la concentración, absorbancia y cantidad de Gálico equivalente que hemos utilizado.

5.2. Ensayo de supervivencia

En el experimento de supervivencia cuya duración es de 48 horas se colocaron 5 daphnias en 50 ml de una dilución de la muestra de alpechín, sin administrarle alimento durante todo el transcurso del experimento.

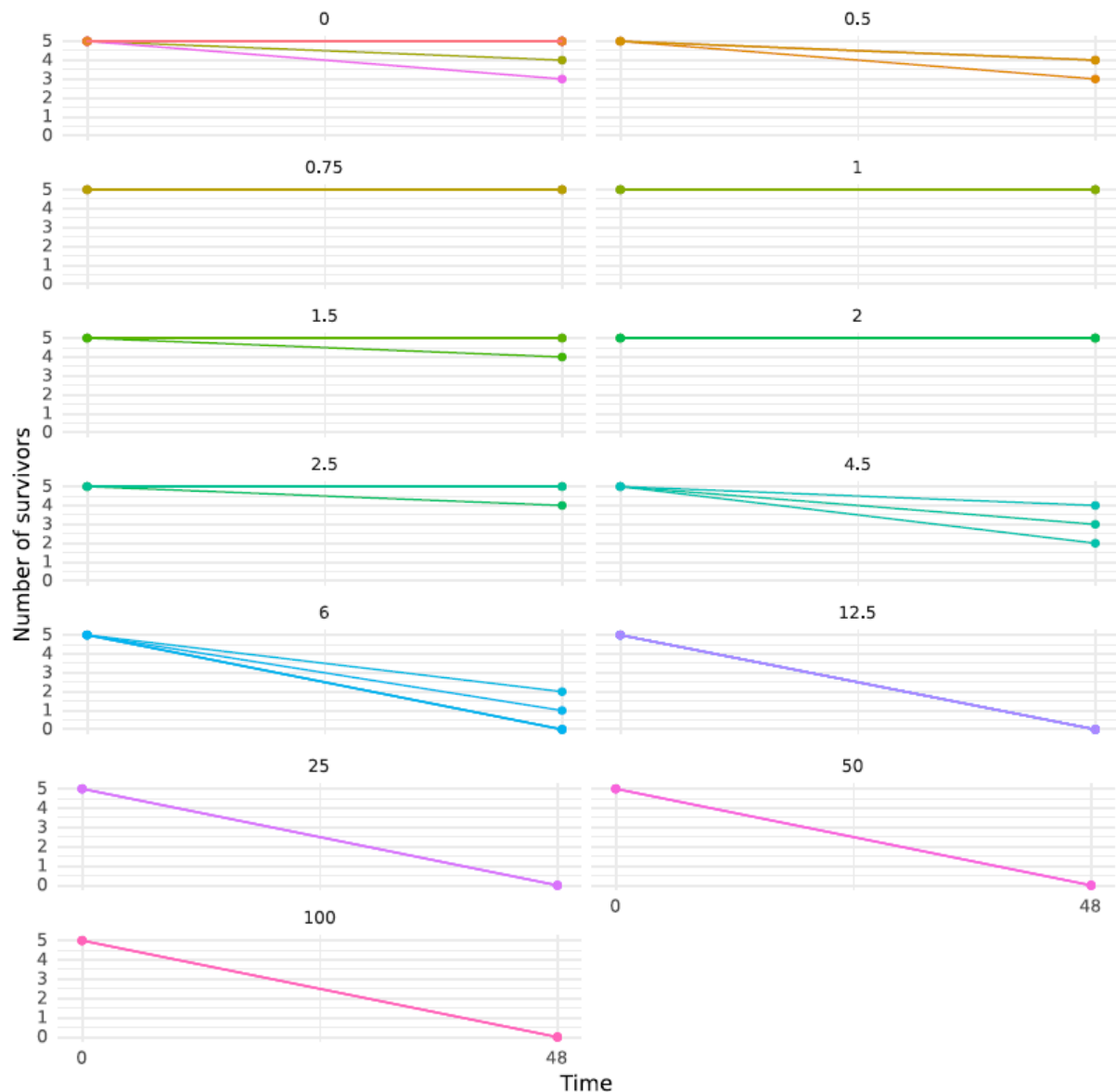
Tanto las concentraciones como los porcentajes de mortalidad se muestran en la tabla (2).

En la cual podemos observar como la supervivencia de los individuos disminuye notoriamente cuando el porcentaje de dilución alcanza o supera el 4,5%. El porcentaje de mortalidad más alto (100%) se obtiene al superar el 6,5% de dilución de alpechín.

Concentración	% de mortalidad	Concentración	% de mortalidad
0	0	2.5	20
0	20	2.5	0
0	0	2.5	0
0	0	4.5	40
0	40	4.5	60
0	0	4.5	20
0	0	6	100
0	0	6	100
0	0	6	100
0	0	6	60
0	0	6	80
0	0	6	100
0.5	40	12.5	100
0.5	20	12.5	100
0.5	20	12.5	100
0.75	0	12.5	100
0.75	0	12.5	100
0.75	0	12.5	100
1	0	25	100
1	0	25	100
1	0	25	100
1.5	0	50	100
1.5	0	50	100
1.5	20	50	100
2	0	100	100
2	0	100	100
2	0	100	100

Tabla (2): En esta tabla se representa las distintas concentraciones de alpechín y su porcentaje de mortalidad sobre la población compuesta por 5 daphnias.

5.2.1. Representación gráfica de la mortalidad respecto a la concentración



Gráfica (2): En este conjunto de gráficas se representa la evolución de la mortalidad de las daphnias debido a las distintas diluciones de alpechín respecto al tiempo de exposición.

En este conjunto de gráficas nos permite apreciar donde se produce un cambio de pendiente el cual nos informa del incremento en la mortalidad de los individuos en función de la concentración.

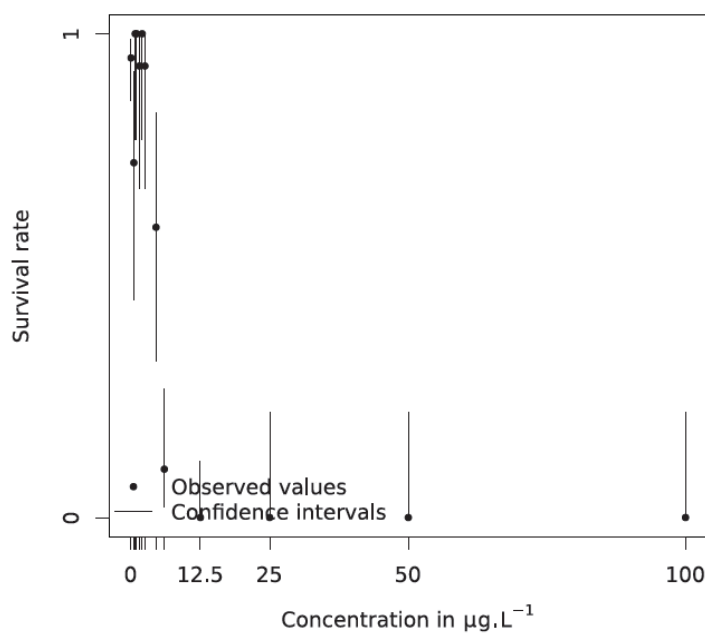
Como podemos observar tanto en la tabla (2) como en la gráfica (2) hasta llegar a la concentración de 2.5% el porcentaje de mortalidad no tiene una relevancia notoria. Entre el

2,5% y el 6% se empieza a observar una mortalidad considerable a la que ya no se le puede atribuir a factores como el estrés.

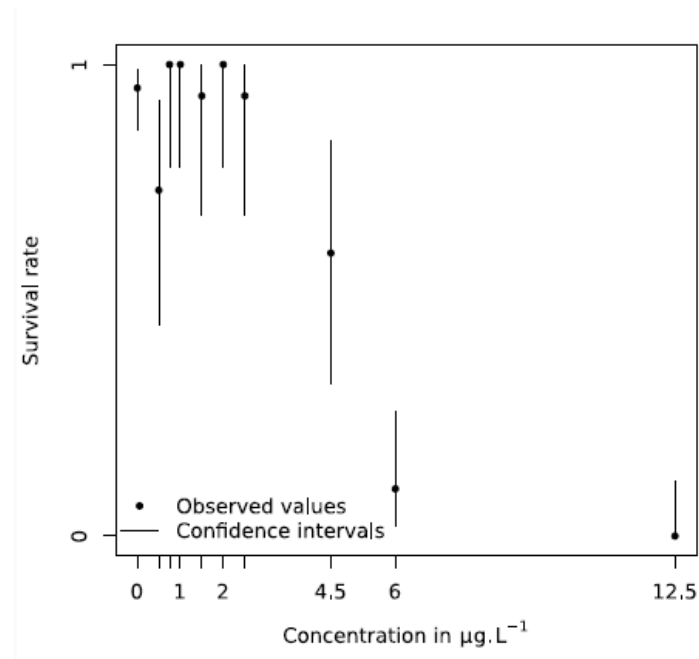
Una vez alcanzamos el 6% o lo superamos la dosis es letal en un periodo de 48 horas.

5.2.2. Gráfico de dosis-respuesta

En las siguientes gráficas (3 y 4) se va a representar la fracción de individuos supervivientes al final del ensayo en función de la concentración del contaminante. Las líneas verticales nos muestran los intervalos de confianza del 95% para cada punto de concentración que hemos obtenido.



Gráfica (3): Se muestran los intervalos de confianza del 95% desde los blancos (0%) hasta el 100%.

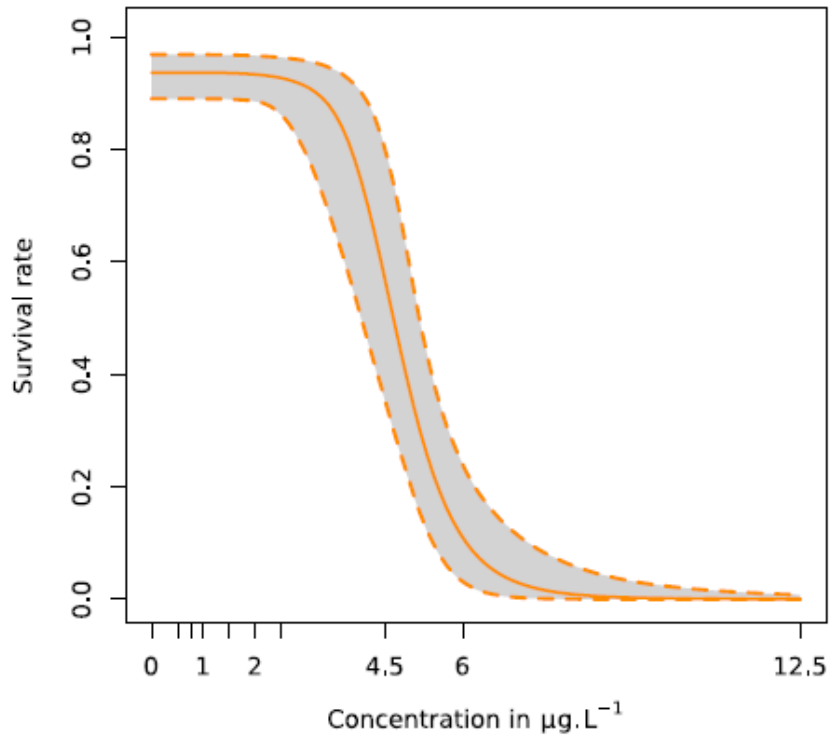


Gráfica (4): También muestra los intervalos de confianza pero con un mayor detalle en las concentraciones de interés, las cuales no llegan a ser de la mortalidad del 100%.

5.2.3. Curva de supervivencia

En la gráfica (5) en la que se observa la curva de supervivencia que nos aporta la herramienta de Mosaic, la cual nos muestra la tasa de supervivencia media en función de la concentración de alpechín obtenido de las almazaras de aceite. El intervalo de confianza del 95% se muestra con el segmento gris que envuelve a la curva.

Cabe destacar que Mosaic al utilizar la tasa de supervivencia media, no es necesario que el 95% de los puntos experimentales se encuentren dentro de los intervalos indicados.



Gráfica 5: La curva de supervivencia nos representa la tasa de supervivencia en función de la concentración de contaminante.

5.2.4. Dosis letal

En la tabla (3) se muestran las dosis letales obtenidas de alpechín para las daphnias en el ensayo de supervivencia de 48 horas. Estos valores se han obtenido a partir de la función de supervivencia de la aplicación estadística Mosaic (Baudrot et al., 2018), (Forfait-Dubuc, Charles, Billoir & Delignette-Muller, 2012).

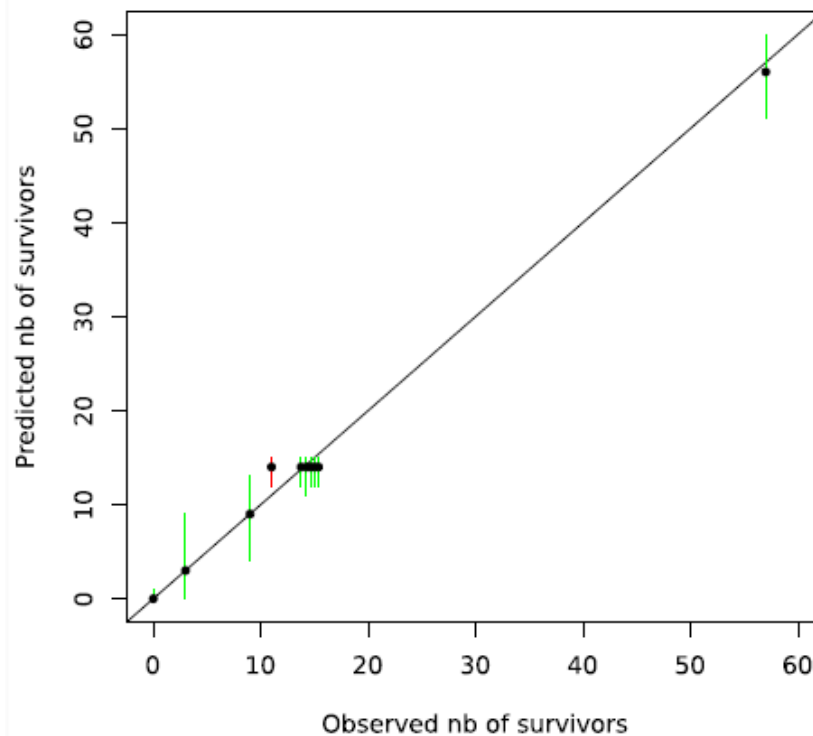
	Valor estimado (intervalo de credibilidad al 95%)
DL1	2.78 [1.62;3.69]
DL5	3.36 [2.3;4.15]
DL 10	3.67 [3.69;4.38]
DL 15	3.87 [2.96;4.54]
DL 20	4.03 [3.17;4.66]
DL 25	4.17[3.36;4.76]
DL 30	4.29 [3.53;4.86]
DL 40	4.52 [3.84;5.04]
DL 50	4.74 [4.14;5.23]
DL 60	4.97 [4.43;5.47]
DL 70	5.23 [4.73;5.8]
DL 80	5.57 [5.05;6.32]

Tabla (3): Concentraciones para cada dosis letal.

5.2.5. Gráfica de verificación predictiva

La idea es comparar cada valor observado con una predicción del modelo ajustado en la concentración correspondiente y el intervalo de confianza del 95.

En la siguiente gráfica, cada punto negro corresponde a una observación del conjunto de datos, y el valor observado correspondiente se puede leer en el eje x, mientras que el eje y se encuentra el valor dado por el modelo ajustado, así como el 95%de confianza. El intervalo se representa en verde si contiene el valor observado y en rojo en caso contrario.



Gráfica (6): Gráfica de verificación predictiva

5.3. Ensayo de reproducción

En el experimento de reproducción el cual tiene una duración de 21 días, en los cuales se han expuesto a 10 daphnias dos concentraciones de 1% y 2% durante todo el transcurso del ensayo. Las dos diluciones se eligieron debido a que previamente habíamos calculado la dosis letal al 50% la cual es de 4,74%. Durante todo el ensayo se ha renovado 2 veces el medio y el alimento. Los recuentos se realizaron con un intervalo de como máximo de 3 días. Los resultados de los recuentos de los neonatos se muestran en la siguiente tabla (4).

Concentración	7 Días	10 Días	13 Días	14 Días
Control A	0	6	15	0
Control B	0	19	100	15
1% A	0	43	112	20
1% B	0	0	26	2
1% C	0	4	43	3
1% D	0	3	41	3
2% A	0	4	0	0
2% B	0	7	0	2
2% C	0	0	2	0
2% D	0	0	0	0
	16 Días	17 Días	20 Días	21 Días
Control A	27	1	31	0
Control B	144	0	104	5
1% A	3	19	35	34
1% B	19	0	14	4
1% C	6	0	1	13
1% D	4	2	13	12
2% A	0	0	0	0
2% B	0	0	0	0
2% C	0	0	0	0
2% D	0	0	0	0

Tabla (4): Tabla de neonatos respecto a la concentración y al tiempo.

Como podemos ver en la tabla (4) y la gráfica (9) la reproducción se vio afectada en la concentración de 1% respecto al control, debido a que tras los primeros 14 días el incremento en el número de neonatos se redujo respecto al nacimiento en la segunda semana del ensayo. Por lo que podemos concluir, que con la concentración del 1% de alpechín ralentiza el incremento en la cría de neonatos respecto a la cría en el patrón.

En cambio, en la concentración de 2% la reproducción se vio gravemente afectada ya que en la segunda semana apenas hubo nuevos neonatos y en la última semana la tasa de reproducción fue 0%. Respecto al patrón podemos afirmar que la concentración de alpechín al 2% casi elimina por completo la reproducción de las daphnias.

Durante el transcurso del ensayo pudimos apreciar como en la réplica de 1% de alpechín al final del ensayo solo quedaron 3 hembras de gran tamaño la cuales como podemos observar en la tabla (4) en los últimos días del ensayo, solo entre ellas tuvieron entre los días 20 y 21 unos 35 y 34 neonatos por días respectivamente. Esto nos indica una fuerte variabilidad genética que nos indica la presencia de individuos que desarrollan o que ya poseen una resistencia a esa concentración que les permite reproducirse, en cambio en las réplicas del 2% no se detectó ningún individuo que presentara algún tipo de resistencia a esa cantidad de concentración.

5.3.1. Tabla de supervivencia en el ensayo de reproducción

En el ensayo de reproducción se obtuvieron resultados de la supervivencia de las 10 daphnias iniciales cada vez que se hacía un recuento/extracción de los neonatos, con el fin de saber cómo influían las diluciones de alpechín en la mortalidad de la daphnias además de en la reproducción. Estos datos se muestran en la tabla (5).

Concentración	7 Días	10 Días	13 Días	14 Días
Control A	10	10	10	10
Control B	10	10	10	10
1% A	10	10	10	9
1% B	10	10	10	10
1% C	10	10	10	9
1% D	10	10	10	10
2% A	9	9	5	5
2% B	10	10	10	5
2% C	9	9	9	4
2% D	7	7	7	5
	16 Días	17 Días	20 Días	21 Días
Control A	10	10	10	10
Control B	10	10	10	10
1% A	4	3	3	3
1% B	5	6	6	6
1% C	5	5	5	5
1% D	10	10	9	9
2% A	3	3	3	2
2% B	5	5	4	2
2% C	2	2	2	2
2% D	1	1	0	0

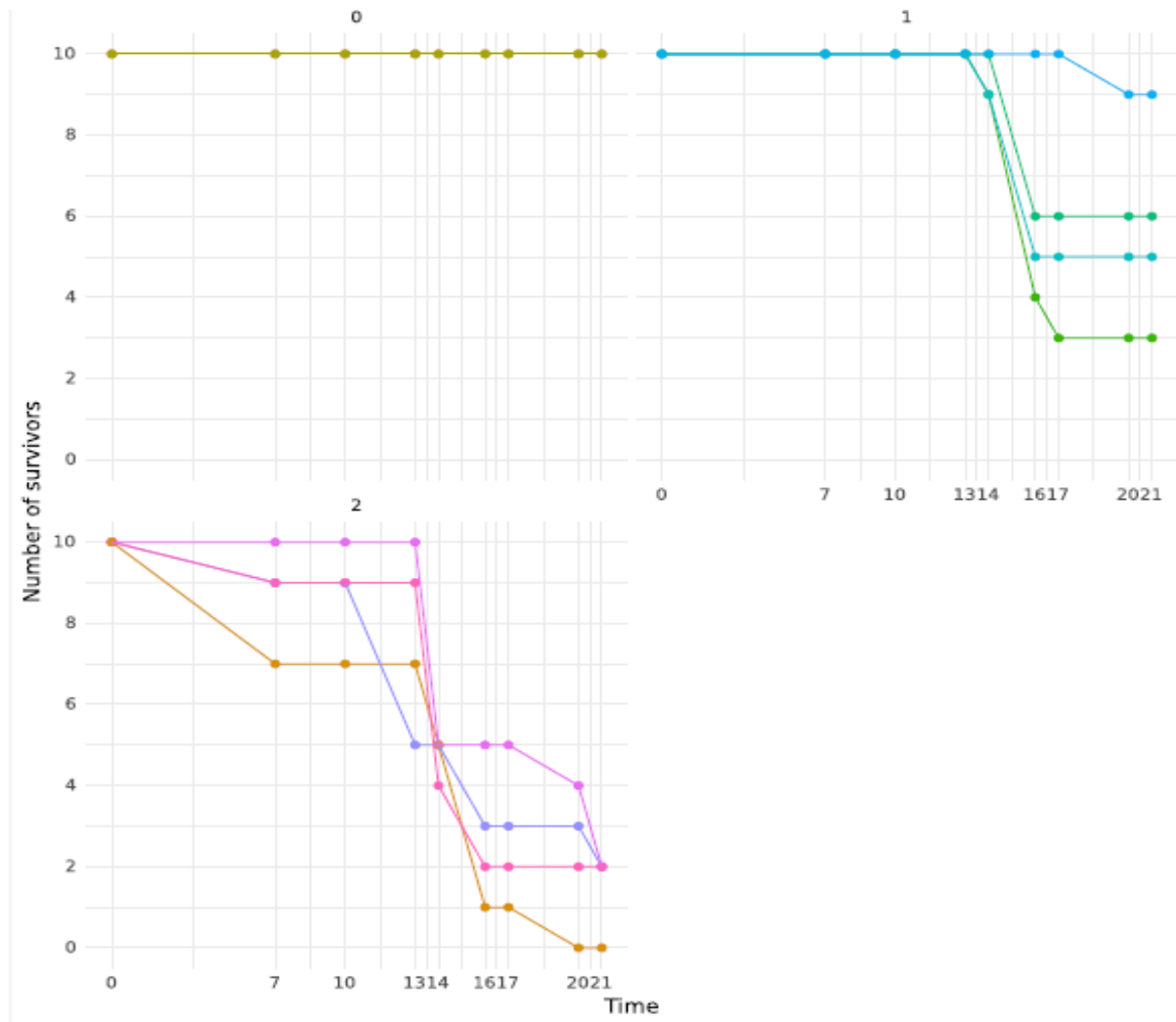
Tabla 5: Supervivencia de las daphnias iniciales en el ensayo de reproducción.

La tabla de supervivencia en el ensayo de reproducción nos muestra como las diluciones de alpechín además de afectar a la reproducción también afecta a la mortalidad de las daphnias reduciendo progresivamente el número de individuos presentes por réplica a medida que aumenta la dosis y el tiempo que dura el ensayo.

El 100% de las daphnias que constituían el control sobrevivieron todo el transcurso del ensayo, en cambio, en las réplicas del 1% la media de supervivencia es de 5,75 individuos y en las réplicas de 2% de concentración de alpechín la media de individuos es de 1,5 individuos por réplica.

5.3.2. Mortalidad en el ensayo de reproducción

En el siguiente conjunto de gráficas (7) se muestra la mortalidad de las daphnias en los diferentes muestreos durante el ensayo de reproducción que tuvo una duración de 21 días. Cada línea representa una réplica, salvo en la gráfica del control que al tener los mismos valores de supervivencia las líneas se solapan.



Gráfica (7): representación de la mortalidad en las distintas réplicas del ensayo de reproducción.

En la primera gráfica está asociada a los dos controles, en los cuales no se produjo ninguna muerte.

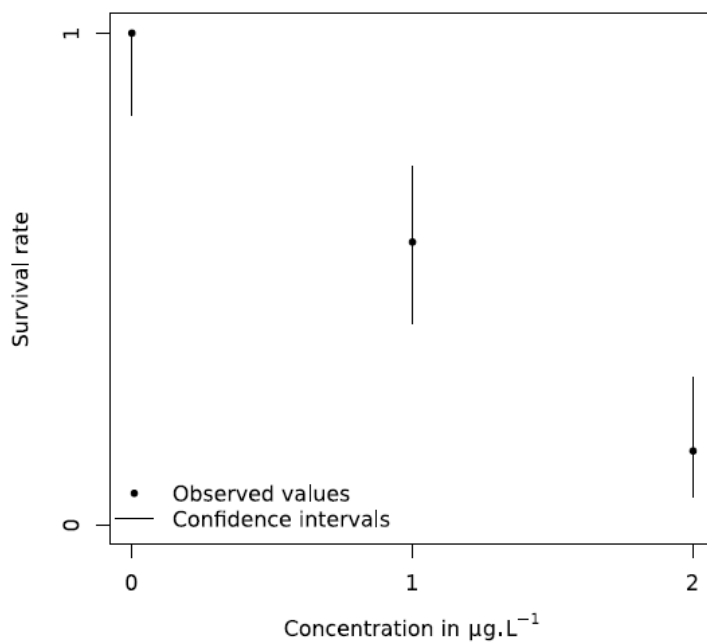
En la segunda gráfica se muestra las cuatro réplicas, las cuales corresponden a las diluciones de 1% de concentración de alpechín. En esta segunda gráfica se puede observar como a partir de la segunda semana comienza a disminuir el número de individuos en tres

de las cuatro réplicas, llegando al final del ensayo con una media de supervivientes de 5,75 individuos.

Respecto a la tercera y última gráfica, correspondiente a las réplicas que tienen una dilución de 2%. Se puede observar como la mortalidad también aparece en el comienzo de la segunda semana, pero la pendiente es mucho más pronunciada que en la dilución del 1%. Esto nos muestra una mortalidad mucho mayor hasta el punto de tener una media al concluir el ensayo de 1,5 individuos por réplica.

5.3.3. Gráfico de dosis-respuesta

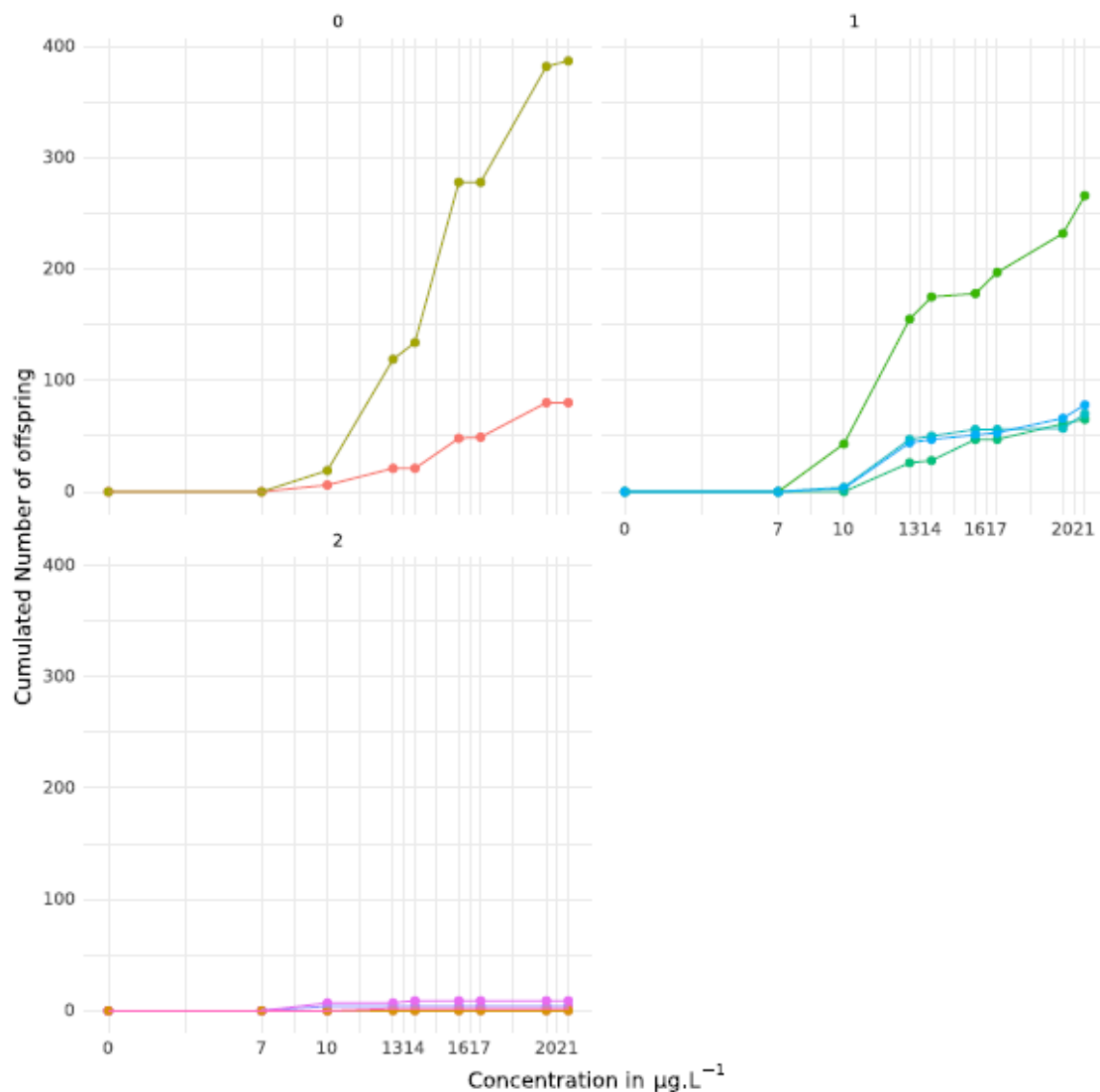
Fracción de individuos supervivientes al final del ensayo en función de la concentración del contaminante. Las líneas verticales representan intervalos de confianza binomiales del 95%.



Gráfica (8): intervalos de confianza del 95% en los individuos supervivientes respecto a la concentración.

5.3.4. Descendencia acumulada

En el siguiente conjunto de gráficas (9) se muestra la descendencia acumulada de cada réplica en el ensayo de reproducción, en el que expusimos a 10 daphnias a las diluciones de 1% y 2% de alpechín, para conocer su efecto a la hora de tener nueva descendencia.



Gráfica (9): Descendencia acumulada en un periodo de 21 días.

Como se puede observar tanto en la gráfica (9) como en la tabla (4) el control A tiene un incremento en el número de individuos más lento pero constante en cambio en el control B el aumento de neonatos es mucho más rápida y constante.

Por otro lado, en la segunda gráfica se encuentran las 4 réplicas las cuales corresponden a las de 1% de alpechín. En el conjunto de ellas se percibe una disminución del número de descendencia, pero donde podemos observar el verdadero efecto tóxico del

alpechín sobre la reproducción es a partir de la segunda semana donde se produce una ralentización del incremento de los nuevos neonatos.

Si analizamos en conjunto las gráficas del control y la de 1% de alpechín podemos observar que la descendencia en el control crece constantemente de una semana a otra. En cambio, en las réplicas del 1% la pendiente se suaviza lo que nos indica que la mayor parte de la descendencia se originó al comienzo del ensayo y posteriormente el alpechín afectó en la reproducción y en la mortalidad de las daphnias.

Por último, en la tercera gráfica correspondiente a las diluciones de 2% de alpechín, los efectos sobre la descendencia de nuevos neonatos afectó desde el inicio del ensayo. Donde tanto en la gráfica (9) como en la tabla (4) se observa con claridad que las daphnias que componían estas réplicas apenas tuvieron descendencia y tuvieron una mortalidad mucho mayor y en estadios más tempranos que en otras réplicas con un valor de concentración más bajo.

5.3.5. Cálculo estadístico

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de neonatos por hembra al final del ensayo, entre los 14 días donde hubo nueva descendencia de neonatos.

	Control	1%	2%
A	0.5	6.3	0.1
B	2.8	0.8	0.3
C		1	0.1
D		0.6	0

Tabla (6): Neonatos por hembras entre 14 días de puesta.

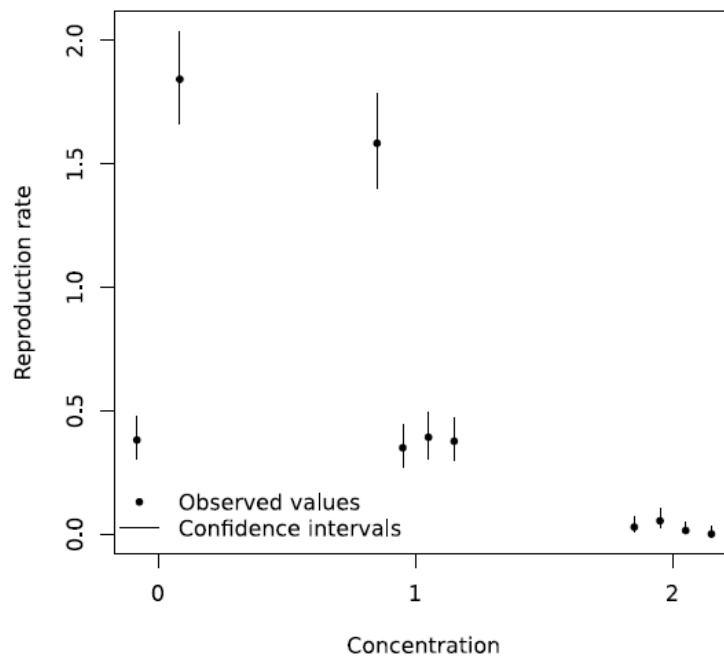
Estos resultados al no tener una distribución normal se realizó un análisis de Kruskal-Wallis donde nos da un $p = 0,03638$. Al tener una p con un valor muy pequeño nos indica que existen diferencias significativas, por tanto, para conocer donde se encuentran estas diferencias se realizó el test de MANN-Whitney que nos proporcionó la siguiente tabla (7). Donde podemos apreciar que el grupo c el cual corresponde al 2% difiere de los grupos de los datos del control(A) y de B (1%).

	A	B	C
A		0,817	0,1052
B	0,817		0,03038
C	0,1052	0,03038	

Tabla (7): Modelo de MANN-Whitney

5.3.6. Gráfico de respuesta a la dosis

Tasa de reproducción (en crías por día) al final del ensayo en función de la concentración del contaminante. Las líneas verticales representan intervalos de confianza del 95% para la tasa estimada.



Gráfica (10): intervalos de confianza del 95% en los puntos de muestreo de la reproducción respecto a la concentración.

6. DISCUSIÓN

Las aguas residuales de las almazaras representan una seria amenaza sobre la salud de las aguas continentales de muchos países del Mediterráneo.

La hipótesis inicial de un efecto tóxico de las aguas residuales de las almazaras de aceite (alpechín), la hemos corroborado con los resultados obtenidos tanto en el estudio de supervivencia como en el de reproducción.

En primer lugar, respecto al ensayo de supervivencia, nuestro cálculo de la DL50 (dosis letal al 50% tras 48 horas de exposición) es de una dilución de alpechín al 4.74% con un intervalo de confianza del 95%. Esto quiere decir que en un periodo de 48 horas a una concentración de 4,74% y con escasez o ausencia de alimento, el 50% de los individuos de una población morirá.

En estudios como el de Justino et al. (2012), el cual realizó un ensayo de supervivencia sobre *D. logispina*, una especie distinta a la *D. magna* que nosotros hemos utilizado, pero con unas características ecotoxicológicas muy similares, obtiene un resultado de un DL50 del 3% de dilución para un tiempo de exposición de 48 horas.

En otros estudios como el de Paixao et al. (1999) también se estudió la letalidad de las aguas residuales de almazaras y en su caso utilizó dos especies bioindicadoras, *Thamnocephalus platyurus* y *D. magna*.

Otro ejemplo de estudio sobre la letalidad de aguas residuales de almazara, es el que redactaron Haouache y Bouchaleta (2016), en el que aplican diferentes diluciones del agua problema al bioindicador *Gammarus gauthieri* para probar el efecto de diferentes concentraciones que iban desde 1 a 16 ml de agua problema / 250ml de agua de lago. Obteniendo unos resultados de TL99 en un rango de 0,99 a 1,71 días.

Los resultados de estos estudios se asemejan a los que nosotros hemos obtenido debido a que presentó un rango de valores de dilución similar para la DL50. En el caso de *Thamnocephalus platyurus* su rango es de 0,16 a 1,24% y en el caso de la *D. magna* el rango que atribuye a esta especie es de 1,08 a 6,03% de alpechín.

Según el estudio de Smeti et al. (2019), se demuestra que la contaminación por aguas residuales de almazara provoca cambios significativos en macroinvertebrados y diatomeas, siendo estos efectos más pronunciados cuanto menor es la dilución del contaminante proveniente de las almazaras. Smeti et al. (2019) indica una tasa mayor de teratologías de diatomeas cuando el agua problema no tiene un alto grado de dilución. Estos efectos subletales coinciden con nuestros resultados en el ensayo de reproducción donde observamos una disminución o retraso en la puesta.

Continuando con los resultados y estudios del ensayo de reproducción es conveniente indicar que las diferentes sustancias químicas, como pueden ser las aguas residuales dealmazaras o residuos de la vida cotidiana como los detergentes, pueden inducir estrés en los organismos acuáticos, según exponen en su estudio Newman y Unger (2003). Estas condiciones anómalas ejercen diversos efectos adversos sobre la biota acuática, como las daphnias, provocándoles cambios en el crecimiento como se indica en el trabajo de Hosmer, Warren y Ward (1998) además de una alteración en el comportamiento reproductivo y la cantidad de progenie que generen como se indica en el estudio de Fava y Crotti (1979).

En el estudio de Haouache y Bouchaleta (2016), además de un estudio de supervivencia como ya he mencionado anteriormente, también realizó un ensayo para conocer los efectos de las aguas residuales de almazara sobre la reproducción de *G.gauthieri*, aplicándoles una concentración de 0,25ml / 250 ml de agua de lago, obteniendo como resultado un efecto estimulante sobre la reproducción de individuos de *G.gauthieri* durante los dos primeros días, pero en los días posteriores, la tasa de reproducción empezó a disminuir hasta llegar a cero, al igual que ocurrió en nuestro ensayo de reproducción con la dilución del 2% que redujo la tasa de natalidad a 0%.

En el ensayo de reproducción, los efectos adversos de las aguas residuales dealmazaras sobre *D.magna* se reflejaron en una disminución en la generación de neonatos respecto al control. Esta disminución fue casi una pérdida total en el caso de las réplicas del 2% y en las réplicas del 1%, la disminución de neonatos no fue tan brusca, pero si se pudo observar una ralentización en la generación de individuos en las 2 últimas semanas del ensayo, representándose gráficamente con una menor pendiente en la gráfica de neonatos acumulados. La excepción presente en la primera réplica de 1%, creemos que es debido a una mayor resistencia, que podría estar relacionada con la variabilidad genética que hacía que las tres supervivientes del ensayo de la réplica 1%A tuviesen en los últimos dos días 35 y 34 neonatos, esto nos indica que estos tres individuos presentaban una resistencia a esa dilución que les permitía seguir generando neonatos. Esta variabilidad genética presente en el zooplankton ha sido estudiada en multitud de ensayos como el de Barata, Markich, Baird, Taylor y Soares (2002) en el cual se muestra los diferentes tipos de interacciones de las *D.magna* cuando entran en contacto con los elementos del zinc y el cadmio, presentado variabilidad de respuesta e interacciones dependiendo del genotipo.

Los posibles errores en el procedimiento experimental presentes en esta réplica fueron descartados debido a que a que las concentraciones de las 4 réplicas se hacían conjuntamente y se realizaron tres cambios de medio durante los 21 días que duraba el ensayo.

Respecto a los resultados de la cantidad de polifenoles totales presentes en las aguas residuales de las almazaras, en nuestro experimento realizado a partir del método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), obtuvimos una cantidad de polifenoles totales medido en Gálico equivalente de 22,674 (g/L), lo que supone un elevado contenido en polifenoles totales pero coincide en el rango de valores como se muestran en estudios como son el de Babic et al. (2019) en el cual miden entre otros parámetros físico-químicos la cantidad de polifenoles totales medidos de la misma forma que en nuestro ensayo a partir de gálico equivalente. En este estudio el valor del alpechín es de 9.22 ± 0.17 (g/L). En artículos como el de Fiorentino et al. (2003), la cantidad de polifenoles presentes en el alpechín baja hasta un 1,2 g/L, la cual se puede deber al método utilizado de análisis o bien como indica Durán et al. (1991) en su estudio, que afirma que la cantidad de polifenoles en las aguas residuales depende en gran medida en el tipo de sistema que se utilice en la extracción de aceite debido a que en el sistema continuo se le añade agua que va directa al alpechín produciendo una variación en la concentración de los polifenoles en el alpechín.

Para concluir, en el ensayo de Haouache y Bouchaleta (2016) detallan que las técnicas para el tratamiento de las aguas residuales que provienen de la fabricación del aceite no eliminan el poder contaminante de las aguas mientras que otras técnicas tienen un elevado coste o generan efectos secundarios además de procesos posteriores. En este artículo se propone como solución el aprovechamiento de estas aguas para la producción de biocombustible y compost. En cambio, en el estudio de Aggelis et al. (2003) se propone un tratamiento a través de *Pleurotus ostreatus* cultivados en biorreactores, el cual provoca una eliminación significativa de fenoles. Los resultados de este ensayo demostraron una significativa disminución de la toxicidad de las aguas sobre las semillas de *Lepidium sativum* después del biotratamiento. Por el contrario, la toxicidad de las aguas residuales de almazara sobre la *D.magna* de agua dulce no se vio afectada por el tratamiento, llegando a la conclusión de que el tratamiento a partir de *Pleurotus ostreatus* es capaz de reducir el contenido fenólico pero se debe de usar fuertes diluciones para poder usarlas en el medio ambiente.

En la actualidad se siguen produciendo vertidos de alpechín en los ecosistemas acuáticos de nuestra comunidad, lo que constituye un riesgo para la biota acuática, tal y como han demostrado los resultados de este estudio, por lo que mejores medidas de control de la legislación vigente y un incremento de las sanciones por delito ambiental sería deseable para reducir los episodios que cada año se suceden. A modo de ejemplo, recopilamos algunas de las noticias emitidas por los medios de comunicación.

Nuevos vertidos de alpechín en el río Guadaira

Coincidiendo con las lluvias, se repiten estos incidentes por segunda vez en menos de un mes

EL CORREO / ALCALÁ DE GUADAIRA / 21 DIC 2019 / 14:30 H - ACTUALIZADO: 21 DIC 2019 / 14:37 H.



Nuevos vertidos de alpechín han vuelto a aparecer en el río Guadaira este sábado, que **coincidiendo con las lluvias se repiten estos incidentes por segunda vez en menos de un mes.**

TAGS:

Desde el grupo municipal Andalucía Por Sí han denunciado los hechos en redes sociales. **El alpechín es un líquido oscuro, de color negro, que se compone de una mezcla del agua que es usada para lavar las aceitunas y del agua que las propias aceitunas tienen.** Aprovechando las lluvias de los últimos días, alguna persona ha vertido este tipo de líquido contaminante para el río. Además del mal olor que desprende, el alpechín también genera una gran cantidad de espuma tal y como se aprecia en el vídeo.

Noticia emitida el día 21 de diciembre de 2019 por el Diario El correo.
(<https://elcorreoweb.es/provincia/nuevos-vertidos-de-alpechin-en-el-rio-guadaira-LA6156836>).



Denuncian vertidos industriales y de alpechín en el río Genil



22 enero 2019



Las aguas del río Genil bajan estos días de **color negro, con espuma y con mal olor**. Son los efectos de los vertidos **industriales y de alpechín** que tantos municipios sufren en cada campaña de la aceituna. El Ayuntamiento de Puente Genil ha emitido una queja a la Confederación hidrográfica del Guadalquivir pidiendo mayor control y desembalses para aumentar el caudal y minimizar la contaminación de las aguas. Además, responsabiliza a empresas oleícolas de Sevilla de verter parte de sus residuos al río Yeguas, que acaba desembocando en el Genil.

Noticia emitida el día 22 de enero de 2019 por Canal Sur
(<https://www.canalsur.es/noticias/andaluc%C3%ADa/cordoba/denuncian-vertidos-industriales-y-de-alpechin-en-el-rio-genil/1382852.html>).

MEDIO AMBIENTE

Investigan un vertido incontrolado en el Guadalquivir a su paso por Palma del Río

El Ayuntamiento ha trasladado denuncia a la Confederación Hidrográfica, y esta a la Guardia Civil



Aspecto del Guadalquivir a su paso por Palma del Río, donde ayer se detectó un vertido en las aguas del río. - PEPE CASTILLEJO



Elisa Manzano
30/11/2020



La delegación de Medio Ambiente del **Ayuntamiento** palmeño ha comunicado a la Confederación Hidrográfica del Guadalquivir y a la Guardia Civil, a su vez al **Seprona** (Servicio de Protección de la Naturaleza del instituto armado), **el paso de un vertido incontrolado** en el cauce del río Guadalquivir.

La mancha que flotaba sobre la lámina de agua apareció ayer domingo, algunos vecinos lo notificaron a lo largo de la tarde, y a primera hora de la mañana de hoy, quedaban algunos restos, según ha informado el Ayuntamiento a este periódico.

El concejal de Medio Ambiente, **Fran Corral**, indica que se está investigando de qué se trata, que desde la delegación se ha notificado a Confederación y que se han puesto en contacto con la Guardia Civil. Precisa que **no conocen de que vertido se trata**, aunque algunas fuentes vecinales apuntan que **“parece alpechín”**. En cualquier caso, de momento no hay confirmación oficial.

Noticia emitida el día 30 de noviembre de 2020 por el Diario de Córdoba (https://www.diariocordoba.com/noticias/cordobaprovincia/investiga-vertido-incontrolado-guadalquivir_1399773.html).

7. CONCLUSIONES

- La hipótesis inicial la cual afirmaba que la presencia de alpechín en el medio natural afectaría de forma letal y sub-letal a las daphnias, se ha podido confirmar debido a los resultados de los ensayos de supervivencia y reproducción.
- El porcentaje de dilución que se atribuye a la DL50 es de 4.74 con un intervalo de confianza entre el rango de valores [4.14; 5.23].
- La reproducción se vio muy afectada a una dilución al 2% de alpechín llegando a casi inhibirla por completo.
- La reproducción a la dilución de 1% de alpechín se vio afectada, pero, en menor medida, también se observó una disminución de las puestas a partir de la segunda semana.
- Con los datos registrados podemos intuir que dentro de la población experimental de *D. Magna* utilizada, existen algunos individuos que presentan una mayor resistencia cuando son expuestos a la dilución de 1% y mantenían su capacidad de puesta durante todo el ensayo.
- Los tratamientos a partir de *Pleurotus ostreatus* son capaces de reducir la cantidad de fenoles, pero para el uso de las aguas residuales de almazaras en el medio ambiente necesita una fuerte dilución, lo que conlleva un elevado gasto de agua.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., ... & Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, 37(16), 3897-3904.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00313-0)

Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Sayadi, S., & Hamdi, M. (2009). Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(4), 407-413.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.005>

Babić, S., Malev, O., Pflieger, M., Lebedev, A. T., Mazur, D. M., Kužić, A., ... & Trebše, P. (2019). Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays. *Science of the total environment*, 686, 903-914.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.046>

Barata, C., Markich, S. J., Baird, D. J., Taylor, G., & Soares, A. M. (2002). Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 60(1-2), 85-99.
[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00275-2)

Baudrot, V., Charles, S., Delignette-Muller, M. L., Duchemin, W., Kon-Kam-king, G., Lopes, C., ... & Veber, P. (2018). Morse: Modelling tools for reproduction and survival data in ecotoxicology. *R package version*, 3(0).

Benites Vílchez, J., Díaz García, R., López Vivar, J., Gajardo, S., Kusch Fuschlocher, F., & Rojas Arredondo, M. (2011). Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *Biofarbo*, 19 (1), 1-7.

Castiglioni, M. & Collins, P. (2010). Efecto de un detergente biodegradable en agua en la reproducción de *Daphnia magna*. *The Biologist*, 8(1), 43-53.
<http://dx.doi.org/10.24039/rtb201081500>

Charles, S., Ducrot, V., Azam, D., Benstead, R., Brettschneider, D., De Schamphelaere, K., ... & Lagadic, L. (2016). Optimizing the design of a reproduction toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 47-56.

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.07.012>

Delignette-Muller, M. L., Lopes, C., Veber, P., & Charles, S. (2014). Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. *Environmental science & technology*, 48(13), 7544-7551.

<https://doi.org/10.1021/es502009r>

Ducrot, V., Askem, C., Azam, D., Brettschneider, D., Brown, R., Charles, S., ... & Lagadic, L. (2014). Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(3), 605-614.

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.09.004>

Durán, R. M., Padilla, R. B., Martín, A. M., de Ursinos, J. F., & Mendoza, J. A. (1991). Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Grasas y aceites*, 42(4), 271-276.

Ebert, D. (2005) *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National Library of Medicine (US); National Center for Biotechnology Information.

Fava, G., & Crotti, E. (1979). Effetto di un detersivo commerciale e di uno dei suoi componenti, LAS, sulla produzione di nauplii in *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida) in condizioni di alto e basso affollamento. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali*, 66(3), 223-231.

Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., & Temussi, F. (2003). Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 1005-1009.

<https://doi.org/10.1021/jf020887d>

Forfait-Dubuc, C., Charles, S., Billoir, E., & Delignette-Muller, M. L. (2012). Survival data analyses in ecotoxicology: critical effect concentrations, methods and models. What should we use?. *Ecotoxicology*, 21(4), 1072-1083.

<https://doi.org/10.1007/s10646-012-0860-0>

González Gómez, H. B., & Gutiérrez Álvarez, S. D. (1995). Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la Sabana de Bogotá. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/lic_quimica_biologia/113

Haouache, N., & Bouchaleta, A. (2016). Olive mill wastewater: Effect on the survival and reproduction of the ecological indicator "Gammarus gauthieri". *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(7), 2288-2294.

Hosmer, A. J., Warren, L. W., & Ward, T. J. (1998). Chronic toxicity of pulse-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna* exposed to environmentally realistic concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(9), 1860-1866.

International Olive Oil Council (2010). World and EU olive oil figures.
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>

Justino, C.I.L., Pereira, R., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T. A., Panteleitchouk, T. S. & Duarte, A. C. (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, 21, 615-629.
<https://doi.org/10.1007/s10646-011-0806-y>

Newman, M. C. & Unger. M. A. (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.
<https://doi.org/10.1021/jf048569x>

OECD (2004), *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,
<https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.

OECD (2012), *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,
<https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>.

Paixao, S. M., Mendonça, E., Picado, A., & Anselmo, A. M. (1999). Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters: a comparative study of three aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, 14(2), 263-269.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199905\)14:2<263::AID-TOX7>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199905)14:2<263::AID-TOX7>3.0.CO;2-D)

Patiño Farfán, N. D. R. (2016). *Biorremediación del efluente de la producción de aceite de oliva, mediante tratamiento con Scenedesmus Obliquus (Turpin) Kützing 1833 en un*

sistema de Fotobioreactor tipo panel (Tesis doctoral). Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de Ciencias Biológicas, Perú.

Sánchez-Bain, A., Forget, G., Feola, G., & Ronco, A. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*.

Singleton y Rossi (1965). Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. In: *Biofarbo*, 19 (1).

Smeti, E., Kalogianni, E., Karaouzas, I., Laschou, S., Tornés, E., De Castro-Català, N., ... & Muñoz, I. (2019). Effects of olive mill wastewater discharge on benthic biota in Mediterranean streams. *Environmental Pollution*, 254, 113057.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113057>

Stefanakis, A. I., & Thullner, M. (2016). Fate of phenolic compounds in Constructed Wetlands treating contaminated water. *Phytoremediation*, Springer Publishing Switzerland, 311-325.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7>

TEAM-R, R. C. (2018). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at:< [http. www. R-project. org](http://www.R-project.org)>.

Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(11), 636-644.
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00229-2)

UNE-EN ISO 6341 (2013). Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Acute toxicity test (ISO 6341:2012).

9. RESUMEN DE LAS ASIGNATURAS CURSADAS EN EL MÁSTER

Técnicas geomáticas aplicadas al medio natural (GIS, teledetección y cartografía geoambiental)

Aprendizaje y uso de los Sistemas de Información Geográfica (SIG) relacionados con la gestión de recursos naturales. Incluye estudio sobre:

Técnicas geomáticas de captura de datos; georreferenciación; análisis de imágenes; desarrollo de modelos digitales del terreno y de superficies. Además de utilizar los SIGs para las cartografías geoambientales, destacando en importancia el uso de programas informáticos como son QGIS y ArcGIS.

Recursos hídricos y ecosistemas acuáticos

Los conocimientos principales que hemos adquirido con esta asignatura han sido cómo realizar un balance hídrico, características de aguas, técnicas para su análisis, la problemática que se puede provocar en estos sistemas, planes de restauración. Gestión hidrogeológica de acuíferos kársticos, detríticos y humedales, en base a un manejo sostenible. Uso de indicadores físico-químicos de la calidad de las aguas subterráneas; principios generales de sostenibilidad en los ecosistemas acuáticos, y su problemática ambiental y alteraciones, en general la gestión de ecosistemas acuáticos. Se han trabajado términos como puede ser la dinámica, estructura, gestión, problemática y sostenibilidad de los recursos hídricos y ecosistemas acuáticos son los puntos a tratar.

Métodos avanzados de análisis de datos ambientales

En esta asignatura consiste en el análisis estadístico avanzado de datos ambientales utilizando varias herramientas como Rstudio, Spss, Past, RapidMiner y Surfer, con la finalidad de interpretar y manejar resultados de este tipo. Se analizan aspectos fundamentales para desarrollar un buen diseño experimental, además de una introducción a la estadística multivariante.

Caracterización de los componentes físicos del hábitat

Esta asignatura aporta una introducción de las diferentes técnicas, el material y la interpretación de resultados de técnicas espectroscópicas, análisis geoquímico de muestreo total, la caracterización de la materia orgánica y técnicas de microscopía electrónica.

Conservación y restauración de sistemas terrestres

En esta asignatura, se estudia diferentes estrategias y medidas existentes para reducir los principales impactos, así como en el conocimiento de la explotación sostenible de los distintos recursos de carácter geológico. Por otra parte, se han estudiado las distintas morfologías y procesos que presenta el terreno; tipos de erosión, generación de cárcavas, métodos para estabilización de taludes, estudio de la conservación de laderas, y posible restauración de las mismas, así como, en las medidas para evitar la desertificación y pérdidas de suelo.

Caracterización de elementos bióticos del hábitat

Esta asignatura, contiene un análisis de las formas de muestreo, medida y estimación de poblaciones, desde el punto de vista vegetal como el punto de vista animal. Aporta información básica de los ecosistemas terrestres, como la clasificación de la vegetación, algunas técnicas de gestión, cartografía y leyes (RED NATURA 2000 y Directiva Hábitat).

Modelización de la distribución potencial de especies y hábitats

Se abordaron conocimientos teóricos y prácticos básicos sobre conocimientos de dinámica de las especies y la creación e interpretación de modelos geográficos de distribución de las especies a partir de programas informáticos de tipo estadístico (Rstudio) en combinación con programas de tipo SIG (ArcGIS). Se utilizaron distintos softwares (GBIF y R Studio), a través de los cuales se generaron distintos modelos de distribución; DOMAIN, GLM, Mahalanobis, Bioclim, CART y MaxEnt), que se utilizaron para presentar nuestro trabajo de forma cartográfica.

Explotación sostenible de suelos y agroecosistemas

En esta materia se trabajó para saber identificar un agrosistema y los síntomas que tienen debido a la sobreexplotación y formas de mejorar sosteniblemente los agrosistemas, analizar los suelos que permiten identificar el mejor tipo de cultivo en ese suelo e identificar las necesidades o problemas presentes en la zona.

Geomorfología fluvial y análisis de inundaciones

Mediante la docencia de esta asignatura, se estudió la dinámica fluvial en su conjunto. El estudio consistió en el aprendizaje de: la morfodinámica, la sedimentología y la

geomorfología fluvial, además de los diferentes fundamentos y procesos relacionados con los cauces e inundaciones.

Durante las clases prácticas y con la utilización del software Iber, trabajamos con diferentes modelos, elaborando análisis estadísticos de inundaciones y simulaciones para la prevención de inundaciones con el objetivo de establecer medidas preventivas contra la catástrofe natural.

Invasiones biológicas

En esta asignatura se estudia a las especies exóticas invasoras, una de las amenazas de la biodiversidad. Se estudiaron las especies invasoras que alberga el Catálogo Nacional de Especies Invasoras, situación actual, problemática y medidas de control y erradicación. En el apartado de flora, se hace enfoca en las causas, control y el catálogo de especies amenazadas.

Técnicas de conservación de flora amenazada

En esta asignatura se trabaja la familiarización con las especies vegetales de los principales ecosistemas además de sus principales riesgos y con aquellas especies consideradas como amenazadas o en riesgo, incluye conocimientos sobre la gestión sostenible de estas especies y la mejor forma de conservación dependiendo del tipo de especie.

Técnicas de conservación de fauna amenazada

El objetivo de esta asignatura es conocer las amenazas reales y potenciales que pueden afectar a los diferentes grupos de animales que se encuentren en peligro de extinción, así como las amenazas específicas de cada especie, saber cómo erradicar o resolver las consecuencias de las amenazas, con el fin de proteger o aumentar el número de individuos de la especie la cual se encuentre en peligro de extinción.

10. CURRICULUM VITAE

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CULTURA Y DEPORTE

DIRECCIÓN GENERAL DE UNIVERSIDADES

COMISIÓN NACIONAL EVALUADORA DE LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA

Currículum vitae Impreso normalizado

Número de hojas que contiene: 3

Nombre: FRANCISCO GARRIDO GODINO

Fecha: 10 de junio de 2020



Firma:

El arriba firmante declara que son ciertos los datos que figuran en este currículum, asumiendo en caso contrario las responsabilidades que pudieran derivarse de las inexactitudes que consten en el mismo.

APELLIDOS: GARRIDO GODINO

NOMBRE: FRANCISCO

SEXO: HOMBRE

DNI: 77380504v

FECHA DE NACIMIENTO: 31-07-1996

DIRECCION PARTICULAR: C/ Pintor Zabaleta nº 13-2º

CIUDAD: Torredelcampo

CODIGO POSTAL: 23640

PROVINCIA: Jaén

TELEFONO: 953410709

TELEFONO MÓVIL: 609164177

CORREO ELECTRÓNICO: fgg00034@ujaen.es

FORMACIÓN ACADÉMICA

GRADO: Ciencias Ambientales

CENTRO: Facultad de Ciencias Experimentales-Universidad de Jaén

FECHA OBTENCIÓN: 27-11-2019

NOTA MEDIA EXPEDIENTE: 6,11

ACTIVIDADES ANTERIORES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL

- Posición: Becas Ícaro
Institución: Laboratorio DJ Torredonjimeno
Curso: 2018/2019

CONGRESOS

- Conferências de Outono dos Cursos de Arquitetura paisagista e Ecologia e Ambiente de 2017. En la universidad de Évora.
2/11/17

ESTANCIAS EN OTROS CENTROS DE FORMACIÓN

- Estancia de 6 meses de duración en la universidad de Évora (Portugal)

BECAS

- Beca del ministerio en el curso 2016/2017, 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020
- Beca Ícaro en 2018/2019
- Beca Erasmus

FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

- CURSO EN SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA: ANÁLISIS TERRITORIAL CON QGIS

Organizado por la Spin-Off de la UGR GIS4tech, con una duración de 50 horas (12 horas presenciales, 12 horas online y 26 horas de trabajo autónomo) y realizado en Granada entre Marzo y Mayo de 2020

- CURSO EN CONSTRUCCIÓN Y FABRICACIÓN SOSTENIBLE. ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA
- ACREDITACIÓN DE NIVEL DE INGLES: A través de Aptis nivel B2
- PROGRAMA DE SMALL WORLD INITIATIVE
Para el descubrimiento de nuevas cepas microbianas productoras de antibióticos y la difusión del uso racional de antimicrobianos.

