

## TOXICIDAD CRÓNICA DE LAS AGUAS RECEPTORAS DE EFLUENTES DE INDUSTRIAS DE CELULOSA SOBRE LARVAS DE *Chironomus piger*

Hernán GAETE<sup>1</sup>, Enrique BAY-SCHMITH<sup>2</sup> y Any RIVEROS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Instituto de Ciencias Biológicas y Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Casilla 5030 Valparaíso, Chile

<sup>2</sup>Laboratorio de Bioensayos, Depto. Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Barrio Universitario S/N, Concepción, Chile

(Recibido mayo 2004, aceptado mayo 2005)

Palabras claves: toxicidad, calidad de aguas, bioensayos, celulosa, *Chironomus piger*

### RESUMEN

Se evaluó la toxicidad de las aguas del río Biobío afectadas por las descargas de los efluentes de dos industrias de celulosa (denominadas: industria A e industria B), a través de bioensayos con larvas de *Chironomus piger*. Para ello, se tomaron muestras de las aguas receptoras del efluente final de ambas industrias de celulosa en tres estaciones de muestreo en el río: la primera antes de la descarga (pre-impacto), la segunda en la zona de descarga del efluente (impacto) y la tercera después de la descarga (post-impacto). Los resultados no mostraron efectos tóxicos de las aguas receptoras de los efluentes en ambas industrias sobre *C. piger*. En las aguas receptoras del efluente de la industria A, se observó una estimulación significativa del crecimiento de las larvas de *C. piger*, en tanto que en las aguas receptoras de la industria B, no se observó un efecto sobre el crecimiento de las larvas. Por otro lado no se observó correlación entre el crecimiento y las concentraciones de halógenos orgánicos adsorbibles (HOA) y halógenos orgánicos extractables (HOE).

Keywords: toxicity, water quality, bioassays, cellulose, *Chironomus piger*

### ABSTRACT

The toxicity of the Biobío river waters affected by the discharges of effluents from two pulp mill, was evaluated through bioassays with *Chironomus piger* larvae. To achieve this, several samples from the receiving waters of effluents were taken in three different locations along the river. The first, before the discharge (pre-impact), the second, in an area where the effluents were discharged (impact), and the third, after the discharge (post-impact). No toxic effects were seen on *C. piger* in the receiving waters from both industries. A significant growth stimulation for the *C. piger* larvae was observed in the receiving waters from industry A, whereas in industry B, no effect was observed. In addition, we did not find any relation between growth and adsorbible organic halogens (AOX) and extractables organic halogens (EOX) concentrations.

---

## INTRODUCCIÓN

En la evaluación del riesgo ecológico de un agente químico sobre las comunidades acuáticas se debe considerar tanto la evaluación de la exposición como el efecto. En cuanto a la evaluación de la exposición a través de la determinación de las concentraciones ambientales de los agentes químicos, por sí sólo, no asegura la protección de la vida acuática, ya que no permite predecir sus potenciales efectos tóxicos, cuando ocurren efectos sinérgicos o aditivos entre los elementos químicos en mezcla (Vighi *et al.* 2003). Por otra parte, la toxicidad de agentes químicos es afectada por otras variables como pH, materia orgánica, dureza etc., que determinan su biodisponibilidad y su potencial de toxicidad (Bakers *et al.* 2003). Para evaluar el efecto de los agentes químicos ya sea en su forma individual o en mezclas complejas como son los efluentes industriales, se han desarrollado herramientas biológicas conocidas como pruebas de toxicidad en las que se utilizan organismos que pueden representar los diferentes niveles tróficos de un ecosistema acuático (Sponza 2003). Entre los organismos más utilizados en estas pruebas de toxicidad en agua están los cladóceros como *Daphnia magna*, microalgas como *Selenastrum capricornutum* y peces como *Oncorhynchus mykiss*, entre otros. También se han utilizado otros organismos como estados larvales de quironómidos de la especie *Chironomus piger* (Gaete *et al.* 2000, Silva *et al.* 2001) y efemerópteros como *Deleatidium spp.* y *Beatis tricaudatus* (Hickey y Vickers 1992, Lowell *et al.* 1995).

Una de las actividades industriales cuyas descargas causan efectos adversos sobre las comunidades de organismos es la industria de la celulosa. Esta se caracteriza por el uso de cloro y dióxido de cloro en el proceso de blanqueo de la pulpa (Stinchfield y Woods 1995). En este proceso se genera una gran diversidad de compuestos organoclorados descritos como altamente tóxicos (Hansson 1987, Kovacs 1995, Hall *et al.* 1996). En la cuenca del río Biobío ubicada en la VIII Región de Chile (Fig. 1) descargan sus efluentes varias industrias de celulosa. Al respecto, se ha evaluado el impacto de dichas descargas sobre sus aguas receptoras, considerando como criterios parámetros fisicoquímicos (Parra *et al.* 1993) y en casos excepcionales la aplicación de pruebas de toxicidad (Gaete *et al.* 1999, Gaete *et al.* 2000), cuyos resultados indican que la descarga de esta clase de industrias representan un riesgo para las comunidades acuáticas que habitan este ecosistema.

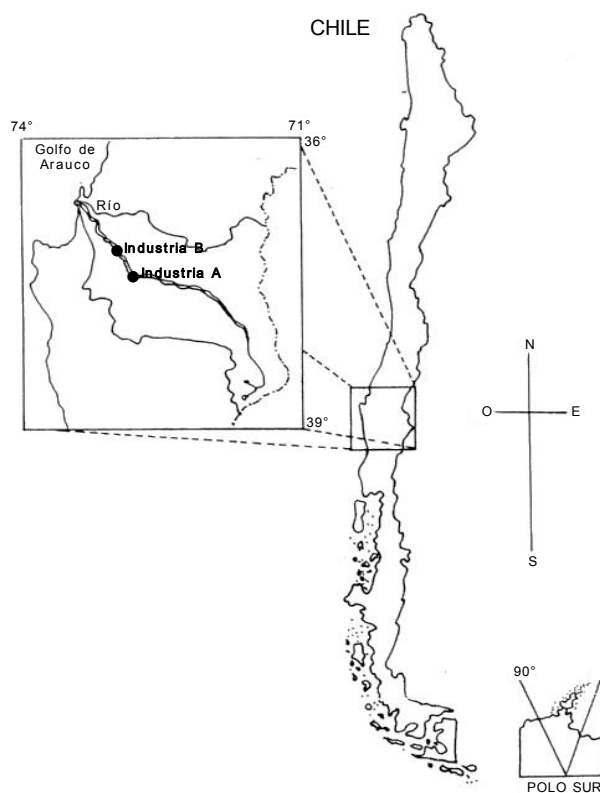


Fig.1. Localización del área de estudio, octava región del Biobío, Chile

Entre los organismos presentes en este ecosistema lótico que pueden ser afectados por las descargas de la industria de la celulosa están los quironómidos, cuyo desarrollo larvario transcurre en contacto con estos residuos.

En el río Biobío, predominan los quironómidos de la especie *Chironomus piger*, la cual es importante para la trama trófica del sistema, especialmente por ser el sustento de las poblaciones de peces que habitan en este ecosistema acuático.

Para verificar los efectos que los efluentes de las industrias de celulosa establecidas en el río Biobío producen en los quironómidos, se evaluó la toxicidad crónica empleando larvas de *Chironomus piger* como organismos de prueba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de aguas del río Biobío en los sitios de descarga de los efluentes de dos industrias de celulosa denominadas industria A e Industria B. La industria A se localiza en la comuna de Laja y la industria B en la comuna de Nacimiento, ambas

en la VIII Región. Las muestras fueron tomadas durante el período de bajo caudal del río Biobío. El muestreo se diseñó considerando tres sitios de recolección para cada descarga, el primero ubicado antes de la descarga (pre-impacto); el segundo en el sitio de descarga al cuerpo receptor (impacto) y el último localizado a 200 m. aproximadamente de distancia, aguas abajo del sitio de descarga (post-impacto). Las muestras fueron refrigeradas y transportadas a los laboratorios de Recursos Renovables y de Bioensayos de la Universidad de Concepción.

Las muestras se destinaron al análisis químico de Halógenos Orgánicos Adsorbibles (HOA), Halógenos Orgánicos Extractables (HOE), con base al método ISO 9562. (1989), así como para el análisis de parámetros como Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) de acuerdo a APHA-AWWA-WPCF (1992), con el empleo de un equipo BSB-Controller Model 1020T y Demanda Química de Oxígeno (DQO) según APHA-AWWA-WPCF (1992), y de análisis de compuestos organoclorados por cromatografía de gases acoplado masas.

Para la determinación de HOA, Se tomó 1 ml de cada muestra y se llevó a 100 ml con agua destilada, acidificando con  $\text{HNO}_3$  hasta un pH 2, después se le agregó a cada solución 50 mg de carbón activado. Se agitó la muestra por una hora para luego filtrar y lavarla con una solución de  $\text{HNO}_3/\text{NaNO}_3$ . Se recogió el carbón activado y se depositó en un crisol, el cual se calcinó a 1000 °C. En esta calcinación se liberó el cloro orgánico en la forma de HCl, el cual se tituló coulombimétricamente con un electrodo de  $\text{AgCl}/\text{Cl}$ .

Para la determinación de HOE se transfirió 1 L de muestra de agua a un embudo de separación de 2 L. de capacidad. La muestra fue ajustada a pH 2 con  $\text{HNO}_3$ , se agregaron 100 ml de hexano y se agitó vigorosamente por 10 minutos, se recuperó el agua y la fase orgánica. El agua recuperada fue ajustada a pH 9 con NaOH y se realizó una nueva extracción, se recuperó la fase orgánica y desechó el agua. Se mezclaron las fases orgánicas, se extrajo el resto de agua con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente la muestra fue concentrada a un volumen de 1 ml. con una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Finalmente se determinó el haluro por coulombimetría.

### **Análisis de compuestos organoclorados (CG-MS)**

La extracción de los compuestos organoclorados se realizó empleando un volumen de 500 ml de muestra a través de una membrana adsorbente de Octadecil (EMPORE, J.T. Baker). Las membranas

se acondicionaron previamente con un lavado de 10 ml de una mezcla de diclorometano-acetato de etilo (1:1) y posteriormente se activaron con 10 ml de metanol. Una vez adsorbidos los analitos en la membrana estos fueron eluidos con 10 ml de diclorometano. Este volumen fue reducido bajo una corriente de nitrógeno hasta un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . El concentrado se destinó al análisis de Cromatografía de Gases en un equipo Hewlett Packard, modelo 5890 Serie II, empleando un detector selectivo de masa Hewlett Packard, modelo 5972.

Para su operación se empleó una columna HP-1 de 29 metros, 0.11  $\mu\text{m}$  de espesor de capa y un diámetro interno de 0.2 mm. La temperatura del inyector fue de 250°C y 270°C la del detector. El programa de temperatura del horno fue: 70°C por 2 minutos; un gradiente de 10°C por minuto hasta los 135°C; a 135°C por 1 minuto; un gradiente de 5°C por minuto hasta los 259°C; 1 minuto a 250°C; un gradiente de 3°C por minuto hasta los 285°C, donde se mantenía la temperatura por 20 minutos. Inyectando la muestra con un split de 1/5 un flujo de septa de 3 ml usando como gas acarreador y auxiliar argón-metano (5%).

### **Pruebas de toxicidad**

Para realizar las pruebas de toxicidad con *C. piger*, se emplearon organismos mantenidos en cultivo bajo condiciones de temperatura de 20 °C  $\pm$  2 °C y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad de acuerdo a Silva *et al.* (2001) y ASTM (1996). Las larvas fueron alimentadas con microalgas (*Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris* o *Scenedesmus spinosus*) y alimento para peces. Los cultivos fueron mantenidos con agua reconstituida, con una dureza de 250 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ , pH 7  $\pm$  0.2 y aireación hasta saturación. El procedimiento para realizar las pruebas de toxicidad fue de acuerdo a Silva *et al.* (2001) y ASTM (1996). Las pruebas de toxicidad, se llevaron a cabo con estados larvales de doce días, los cuales fueron expuestos a las muestras de aguas superficiales sin dilución de cada estación por un período de cinco días, al final de los cuales se midió la longitud (mm) de cada individuo con lupa estereomicroscópica Zeiss SV8 con un ocular graduado, cada tratamiento consistió de 10 réplicas, cada una conteniendo diez larvas. Los recipientes utilizados para las pruebas fueron envases de vidrio de 500 ml, con 300 ml de muestra y con recambio diario. Para correlacionar la respuesta de los organismos (longitud) los parámetros químicos, se utilizó la correlación de Pearson, en tanto que para comparar la respuesta de los organismos entre las estaciones con su

respectivo control (estación de preimpacto) en cada industria, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico Systat.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que las aguas receptoras asociadas a la descarga de la industria B no producen efectos en el crecimiento de *C. piger*, sin embargo en el caso de la industria A, se detectó una estimulación significativa del crecimiento de las larvas respecto al lote control, para los organismos expuestos a las muestras correspondientes a los sitios de impacto y postimpacto (Fig. 2). En el cuadro I, se entregan los rangos y valores promedios del crecimiento de *C. piger*, se puede indicar que en general en las estaciones de impacto y postimpacto de la industria A se observaron los mayores crecimiento, siendo el crecimiento similar en las estaciones de preimpacto en ambas industrias e impacto y postimpacto de la industria B. Al comparar la respuesta de las larvas de *C. piger* con otros organismos, expuestos a similares condiciones, se observa que *C. piger* no fue afectado de la misma manera por la presencia de compuestos organoclorados que *Vibrio fischeri* (microtox) y la microalga *Scenedesmus spinosus* cuya luminiscencia y tasa de crecimiento respectivamente fueron inhibidos significativamente por la presencia de agentes químicos en efluentes de industrias de celulosa y aguas receptoras (Gaete *et al.*, 1999, Gaete *et al.* 2000). Esto sugiere que *C. piger* es más resistente a este tipo de compuestos. La estimulación del crecimiento y desarrollo de *C. piger* podría estar asociado a hormonas como juvabiona, juvabiol y dehidrojuvabiona presentes en algunos tipos de maderas utilizadas como materias prima en la industria de celulosa como ha sido propuesto por Lowell *et al.* (1995), quienes al exponer estados larvales de *Baetis tricaudatus* a diluciones del 1% y 10 % del

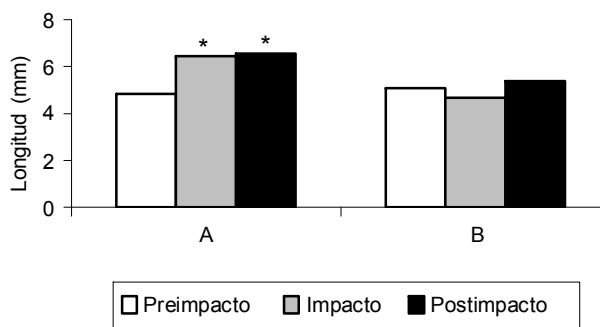


Fig. 2. Comparación (Anova) del crecimiento de *C. piger* después de cinco días de exposición a las muestras de aguas entre las estaciones de muestreo con su respectivo testigo (estación de preimpacto) en ambas industrias; industria A y B  
\*  $p < 0.05$

efluente de una industria de celulosa, observaron una estimulación en el crecimiento larval. Por otra parte, Pellinen y Soimasuo (1993), al evaluar la toxicidad de sedimentos receptores de efluentes de industria de celulosa con *Chironomus riparius*, encontraron un mayor desarrollo larval en estos sedimentos, a diferencia de los sedimentos control. Atribuyendo este mayor desarrollo larval, al proceso eutroficación que provocan los nutrientes presentes en estos efluentes, aumentando la materia orgánica en estos sectores sirviendo de alimentos a los estados larvales de quironómidos. A diferencia de lo observado en las aguas receptoras de la industria A, en las aguas receptoras de la industria B, no se observó estimulación del crecimiento de *C. piger*. Esto podría estar asociado al tipo de materia prima utilizada por la industria B, la cual emplea maderas duras y blandas. En tanto, la industria A sólo utiliza maderas duras.

El comportamiento del crecimiento de *C. piger* observado en las pruebas de toxicidad mostró no tener relación con los diversos parámetros considerados tales como DBO, DQO, HOA y HOE (Cuadro II).

CUADRO I. RANGOS Y VALORES PROMEDIOS DEL CRECIMIENTO DE *C. piger* (MM) EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO EN EL RÍO BIOBÍO

	Industria A			Industria B		
	Preimpacto	Impacto	Postimpacto	Preimpacto	Impacto	Postimpacto
Mínimo	4.3	5.2	4.9	4.2	3.5	4.3
Máximo	5.7	7.8	8.6	6.4	5.7	6.8
Promedio	4.8	6.5	6.6	5.0	4.6	5.2
DE	0.3	0.9	1.1	0.7	0.7	0.9

DE: Desviación estándar

**CUADRO II.** VALORES DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS Y CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES QUÍMICAS Y LA RESPUESTA DE *C. piger*

Industria	Estación	DBO(mg/l)	DQO(mg/l)	HOA(mg/l)	HOE(µg/l)
A	preimpacto	3.3	11.39	0.006	1.02
	impacto	17.9	26.58	0.229	1.43
	postimpacto	19.7	22.5	0.282	1.99
B	preimpacto	1.1	19	0.015	1.26
	impacto	320	350	12	10.74
	postimpacto	26	59	1.04	3.19
R		-0.45	-0.48	-0.48	-0.45

Esto es similar a lo encontrado para *Daphnia pulex* por Gaete *et al.* (1999) quienes no encontraron correlación entre el número de neonatos nacidos a los 21 días de exposición y los HOA, sin embargo, estos mismos autores encontraron una correlación significativa e inversa entre la tasa de crecimiento de *Selenastrum capricornutum* y HOA, observándose una inhibición de la tasa de crecimiento poblacional en aguas receptoras de efluentes de industria de celulosa. Esto sugiere que la medida de halógenos orgánicos adsorbibles podría ser indicativa de toxicidad sólo para los productores primarios, los cuales serían más sensibles.

El análisis cromatográfico de los compuestos organoclorados, mostró que los compuestos detectados en las descargas y en las aguas del cuerpo receptor correspondieron a productos de bajo peso molecular (Cuadro III, IV y V). Sin embargo no todos los compuestos desplegados por cromatografía pudieron ser identificados por problemas como la cantidad de fragmentos o la falta de información en la biblioteca del equipo. La no detección de compuestos en las aguas receptoras de la industria A, sugiere que esta técnica

**CUADRO III.** COMPUESTOS DETECTADOS EN EL EFLUENTE DE LA INDUSTRIA A

Compuestos	Calidad identificación %	Peso molecular
1,2,3-trimetoxibenceno	90	168
4,5 dicloroguaiacol	98	170
3,5-bis (1,1-dimetiletil)fenol	88	206
1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-etanona	94	250
Acido, 1,2- benzenodicarboxílico, butil, 2-metil propil éster	90	278
Benzofuranona	91	180
Triclorosiringol	95	258
4,5-dicloro-2-metoxifenol	96	215

de análisis sería más adecuada para caracterizar efluentes de celulosa que sus aguas receptoras, ya que por efecto de dilución las concentraciones de los elementos químicos estarían bajo los límites de detección. Además, la detección se dificulta debido a que esta industria descarga su efluente a través de difusores, lo que aumenta la capacidad de dilución de las aguas receptoras, alcanzando concentraciones aún más bajas que en el caso de la industria B. No obstante esta limitación, se detectaron los compuestos presentados en los cuadros III, IV y V.

Finalmente los resultados indican que la descarga de los efluentes de ambas industrias de celulosa en las aguas receptoras del río Biobío no provocó toxicidad sobre las larvas de *C. piger*.

**CUADRO IV.** COMPUESTOS DETECTADOS EN EL EFLUENTE DE LA INDUSTRIA B

Compuestos	Calidad identificación %	Peso molecular
Borneol	90	201
Exo-2-hidroxicineole	90	170
4,5-dicloroguaiacol	95	192
3,4,5-tricloroguaiacol	99	226
4-etil-2-metoxifenol	80	160
1,3,3-trimetil-biciclo-(2,2,1)-hetan-2-ol (15-endo)-biciclo	91	154
2,3,5,6- tetracloro-4-metoxifenol	93	262
4-etil-2-metoxifenol	87	152
alfa-terpineal	90	
4,5-dicloro-2-metoxifenol	96	192
Eugenol	96	
4-etil-2-metoxifenol	86	160
Tetracloroguaiacol	98	262
Linalyl propanoato	90	170
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanona	90	
3,4,5-tricloroguaiacol	99	226
4,5,6-tricloroguaiacol	83	
Ácido hexadecanoico	98	
2-metoxifenol	90	
2,6-dimetoxifenol	78	154

**CUADRO V.** COMPUESTOS DETECTADOS EN LA ESTACIÓN DE IMPACTO DE LA INDUSTRIA B

Compuestos	Calidad identificación %	Peso molecular
Exo-2-hidroxicineole	91	170
4-etil-2-metoxifenol	86	160
1,3,3-trimetil-biciclo heptan-2-ol borneol	90	
Borneol	87	201
alfa-terpineal	90	
Eugenol	96	
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanona	90	
3,4,5-tricloroguaiacol	99	226
4,5,6-tricloroguaiacol	83	
Tetracloroguaiacol	99	
Ácido hexadecanoico	98	
2-metoxifenol	90	
2,6-dimetoxifenol	78	154
4,5-dicloro-2-metoxifenol	95	215

## AGRADECIMIENTOS

A la Prof. Mag. Karina Paredes Bel por sus comentarios y sugerencias. Al Laboratorio de Recursos Renovables de la Universidad de Concepción.

## REFERENCIAS

- APHA-AWWA-WPCF. (1992). American public health association–Water protection control federation–American water works association. Métodos normalizados para el análisis de agua potables residuales Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid, España.
- Baker S., Herrchen M., Hund-Rinke K., Klein W., Kordel W., Peijnenburg W. y Rensing C. (2003). Underlying issues including approaches and informatio needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 6-19.
- Folke J., Edde H. y Lehtinen K.J. (1991). The scientific foundation of adsorbable organohalogenes (AOX) as a regulatory parameter for control of organochlorine compounds. *Environmental Conference. Tappi J.* 517-527.
- Gaete H., Larrain A., Bay-Schmith E., Cifuentes A., Rodríguez J. y Baeza J. (1999). Toxicidad crónica y características fisicoquímicas de aguas receptoras de efluentes de celulosa localizadas en la cuenca del río Biobío (Chile, central) *Ecotoxicology and Environmental Protection* 2, 15-18.
- Gaete H., Larrain A., Bay-Schmith E., Baeza J. y Rodríguez J. (2000). Ecotoxicological assessment of two pulp mills effluents, locate in the Biobío river basin (Chile, Central). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 183-189.
- Hall T.J., Haley R., Borton D. y Bousquet T. (1996). The use of chronic bioassays in characterizing effluent quality changes for two bleached kraft mills undergoing process changes to increased chlorine dioxide substitution and oxygen delignification. En: *Environmental fate and effects of pulp and paper: Mill effluents* (M.R. Servos, K.R. Munkittrick, J.H. Carey, y G.J. Van Der Kraak, Eds.), St. Lucie Press, Delray Beach, FL. EUA, pp. 53-68.
- Hansson S. (1987). Effects of Pulp and paper mill effluents on Coastal fish Communities in the gulf of Bothnia, Baltic Sea. *Ambio* 6, 344-348.
- Hickey Ch. y Vickers M. (1992). Comparison of the sensitivity to heavy metals an pentachlorophenol of the mayflies *Deleatidium* spp. And the cladoceran *Daphnia magna*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 26, 87-93.
- Kovacs T.G., Gibbons G.J.S., Tremblay B.I., O'Connor P.H. y Voss R.H. (1995). The effects of secondary-treated bleached Kraft mill effluent on quatic organisms as assessed by short-term and long-term tests. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 31, 7-22.
- Lowell R., Culp J. y Wrona F. (1995). Stimulation of increased short-term growth and development of mayflies by pulp mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1529-1541.
- McUbbin N. y Folke J. (1995). Significance of AOX vs Unchlorinated Organics. OAX is not a suitable parameter for regulating effluent. *Pulp & Paper Canada* 96, 43-48.
- Parra O., Chuecas L., Campos H., Vighi M. y Vismara R. (1993). Caracterización física y química y evaluación de la calidad para uso multiple del agua del río Biobío (Chile Central). En: *Evaluación de la calidad del agua y ecológica del sistema limnético y fluvial del río Biobío* (F. Faranda y O. Parra, Eds.). Serie Monografías Científicas, vol. 2, Centro EULA, Universidad de Concepción, Chile.
- Pellinen J. y Soimasuo R. (1993). Toxicity of sediments polluted by the pulp and paper industry to a midge (*Chironomus riparius* Meigen). *Sci. Total Environ. Vol. Suppl. Pts. 1-2*, pp. 1247-1256.
- Silva J., Iannacone J., Cifuentes A., Troncoso L., Bay-Schmith E. y Larraín A. (2001). Assessment of sensituvity to pentachlorpphenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 4, 10-17.
- Sponza D. (2003). Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 74-86.
- Stinchfield A.E. y Woods M.G. (1995). Reducing chlorinated organics compunds from bleached kraft

mills through first stage substitution of chlorine dioxide for chlorine. *Tappi J.* 78, 117-125.

Vighi M., Altenburger R., Arrhenius A., Backhaus T., Bødeker W., Blanck H., Consolaro F., Faust M. y Finizio A. (2003). Water quality objectives for mixtures

of toxic chemicals: problems and perspectives. *Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 139-150.