

**ANÁLISIS DE FITOTOXICIDAD DE AGUAS
RESIDUALES PROCEDENTES DE ESTACIONES
DEPURADORAS DE LA PROVINCIA DE
ALBACETE**

Por

María Pilar MAÑAS RAMÍREZ

e-mail: pilar.manas.ramirez@gmail.com

Recibido: 30 de julio de 2015
Aprobado: 16 de agosto de 2017

Centro Regional de Estudios del Agua. UCLM.

RESUMEN

El análisis de fitotoxicidad en las aguas residuales procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) no es uno de los parámetros habituales en el control de las mismas. Sin embargo, puesto que uno de los fines del agua residual depurada es el uso agrícola, el análisis de fitotoxicidad en las mismas sería de gran utilidad para un buen manejo de este tipo de recurso hídrico en la agricultura. Este estudio ha pretendido una primera aproximación con relación a la posible existencia de fitotoxicidad en aguas residuales procedentes de algunas Estaciones Depuradoras de la provincia de Albacete. Se ha comprobado que el grado de depuración afecta en la calidad final del agua llegando a ser beneficiosa para los cultivos dado su alto contenido en nutrientes que ejercen sobre las plantas un efecto fertilizante como se ha visto en el bioensayo realizado con semilla de lechuga (*Lactuca sativa*, L.). **Palabras clave:** agua residual, fitotoxicidad, *Lactuca sativa* L., depuradora de aguas residuales.

ABSTRACT

Analysis of phytotoxicity in wastewater from Wastewater Treatment Plants (WWTP) is not one of the usual parameters in controlling them. However, since one of the purposes of the treated wastewater is agricultural use, analysis of phytotoxicity would be useful for good management of this type of water resources in agriculture. This study has attempted a preliminary approach regarding the possible existence of phytotoxicity in wastewater from some WWTP belonging to Albacete province. It has been found that the purification degree affects the final water quality, becoming beneficial for crops due to its high nutrient content that have a fertilizer effect on plants as seen in the bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds.

Key words: wastewater, phytotoxicity, *Lactuca sativa* L., wastewater treatment plant.

0. INTRODUCCIÓN.

0.1. El agua como recurso.

Hasta el siglo XX no se habían planteado problemas importantes de abastecimiento o contaminación del agua, debido entre otros factores a la menor población existente. El aumento demográfico y la mejora en la calidad de vida han dado lugar a una mayor contaminación de los recursos hídricos. Res-

pecto a la provincia de Albacete, el hecho de que hasta ahora haya soportado relativamente bien las consecuencias de la sequía obedece al alto porcentaje de participación de las aguas subterráneas en la satisfacción de las necesidades hídricas provinciales; pero esta situación ha cambiado con la disminución de las reservas almacenadas como consecuencia de la extracción continua por encima de la alimentación procedente de la infiltración, lo que ha dado lugar a la búsqueda de otras fuentes de recursos hídricos, como es la utilización de aguas superficiales para los distintos usos, incluido el abastecimiento a núcleos urbanos como Albacete.

El agua es tanto un derecho como una responsabilidad. No es un bien ilimitado ni gratuito. En el año 2002 se aprobó la Observación General nº15 del Comité Económico y Social de las Naciones Unidas, dedicada al derecho al agua, en la que se establece los criterios para su disfrute y se cuantifican las necesidades básicas, es decir, el volumen mínimo de agua por persona que hay que garantizar de acuerdo con los siguientes cuatro criterios: suficiencia, salubridad, accesibilidad y asequibilidad. Según Unicef (2017), en 2002, el 42% de los hogares carecía de retretes y una de cada seis personas no tenía acceso a agua potable siendo esta la causa principal de enfermedades en el mundo. Por otra parte, se calcula que el número de personas que viven en entornos de alto riesgo por la calidad del agua debido a la excesiva demanda bioquímica de oxígeno (DBO) afectará a 1/5 de la población mundial en el año 2050, mientras que las personas que enfrentan riesgos debidos al exceso de nitrógeno y fósforo se incrementará a 1/3 de la población mundial en el mismo período (Veolia e IFPRI, 2015 en WWDR, 2016).

El agua de calidad para satisfacer las necesidades humanas es un recurso cada vez más escaso, y su posesión constituye un factor esencial de civilización. Existe una necesidad de aprovechar al máximo los recursos hídricos. La reutilización de las aguas residuales urbanas se perfila como una fuente adicional de agua merecedora de ser tenida en cuenta en la gestión global de los recursos hídricos.

0.2. Proceso general de la depuración.

La **DEPURACIÓN DE AGUAS** es el nombre que reciben los distintos procesos implicados en la extracción, tratamiento y controles sanitarios de los productos de desecho arrastrados por el agua y procedentes de viviendas e industrias.

Se puede definir el concepto de **AGUA RESIDUAL** como aquella que procede de haber utilizado un agua natural en un uso determinado, y que como consecuencia de éste ha adquirido una serie de sustancias y elementos

extraños, denominados contaminantes, que han alterado sus características físicas, químicas o biológicas, produciendo su degradación. Las aguas residuales pasan a denominarse vertidos cuando se descargan al medio natural.

El agua que utilizamos se carga, por tanto, de sustancias contaminantes y antes de ser devuelta al medio natural ha de pasar por la Estación Depuradora de Aguas Residuales (E.D.A.R.) para eliminar gran parte de esa contaminación.



Figura 0. Vista panorámica de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Albacete.

Los principales contaminantes del agua son:

- Agentes patógenos: bacterias, virus, protozoarios y parásitos procedentes de los desechos de carácter orgánico.
- Compuestos químicos orgánicos: los desechos orgánicos pueden ser descompuestos por bacterias que usan oxígeno para biodegradarlos. Si el agua se vierte sin depurar, pueden agotar el oxígeno del agua, destruyendo las formas de vida acuáticas.
- Sustancias químicas inorgánicas: ácidos, compuestos de metales tóxicos (mercurio, plomo) que pueden afectar la vida acuática o afectar los usos posteriores del cauce donde vierte el agua.

- Los nutrientes vegetales (nitrógeno y fósforo) que pueden ocasionar el crecimiento excesivo de plantas acuáticas que después mueren y se descomponen, agotando el oxígeno del agua y de este modo causan la muerte de las especies acuáticas (zona muerta).

- Sustancias químicas orgánicas tóxicas: petróleo, plásticos, plaguicidas y detergentes que amenazan la vida.

- Sedimentos o materias suspendidas: partículas insolubles de suelo que enturbian el agua, y dificultan procesos como la fotosíntesis.

- Sustancias radiactivas.

- Calor: ingresos de agua caliente que disminuyen el contenido de oxígeno del agua.

Fases de la depuración de aguas residuales.

1) Pretratamiento:

El objetivo es la eliminación de materia gruesa: arenas, grasas, materias flotantes y elementos minerales. Para ello se utilizan elementos mecánicos: pozo de gruesos, aliviadero, rejas y tamices, desarenado, desengrasadores.

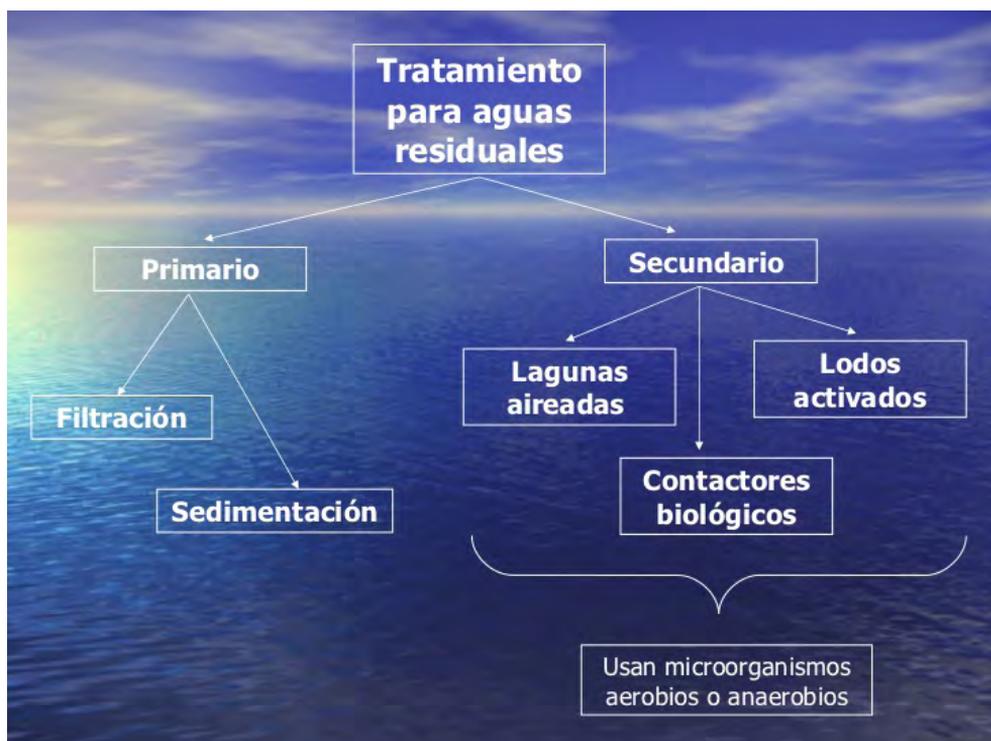


Figura 1: Esquema general del tratamiento de aguas residuales

2) Tratamiento primario:

El objetivo es la reducción de sólidos en suspensión y parte de la DBO_5 . Para conseguirlo se hace uso de sedimentación o decantación primaria, flotación, tratamiento físico-químico mediante coagulación, floculación y sedimentación y neutralización.

3) Tratamiento secundario o biológico:

El objetivo es la eliminación de contaminación orgánica y sólidos coloidales no decantables. Se utilizan procesos de oxidación biológica mediante la actuación de microorganismos que actúan sobre la materia orgánica. Estos procesos pueden ser fundamentalmente de dos tipos:

Fangos activos: la masa activa del sistema se encuentra en suspensión y mediante agitación y aireación actúan las bacterias.



Figura 2: Vista general de una depuradora con fangos activos.

Lechos bacterianos: la masa activa del sistema se encuentra formando una biopelícula sobre un soporte fijo.



Figura 3: A la izquierda: Tanque con lechos bacterianos.
A la derecha: Imagen de los discos utilizados para formar la biopelícula.

4) Tratamiento terciario o avanzado:

El objetivo es la eliminación elementos nocivos (N, P, metales pesados...) y desinfección del agua residual.

Procedimientos habituales:

1. Nitrificación y desnitrificación biológica.
2. Eliminación de N y/o P, absorción sobre carbón activo, resinas, etc. de la contaminación orgánica.
3. Desinfección con cloro, ozono o radiación ultravioleta.

0.3. ¿Qué se analiza en el agua residual?

Como norma habitual los parámetros que se caracterizan en el agua residual son:

- Sólidos en suspensión
- Materia orgánica biodegradable: DBO₅ y DQO.
- Patógenos: Organismos indicadores, coliformes totales y fecales.
- Macronutrientes:
 - Nitrógeno total: Nitrógeno Kjeldhal (N orgánico + amoniacal), Nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺), Nitratos (N-NO₃⁻), y Nitritos (N-NO₂⁻).
 - Fósforo total: Orgánico + inorgánico.
 - Potasio.
- Metales pesados.
- Otros: conductividad eléctrica, sales totales disueltas (aniones y cationes), temperatura, pH, cloro residual, etc.

Con la entrada en vigor de la Directiva 91/271 sobre tratamiento de aguas residuales urbanas (transpuesta a la legislación española a través de la Ley 11/1995), a partir de enero de 2006 se hizo obligatoria la depuración de aguas urbanas de poblaciones de 2.000 habitantes-equivalentes que viertan en aguas continentales. Este término supone en muchas ocasiones errores en su interpretación ya que la definición de habitante-equivalente no es coincidente con los habitantes reales de una localidad o población. Se refiere a una medida de contaminación de modo que 1 h-e (habitante-equivalente) es “la carga orgánica biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de cinco días (DBO₅), de 60 gramos de oxígeno por día” (Ley 11/1995).

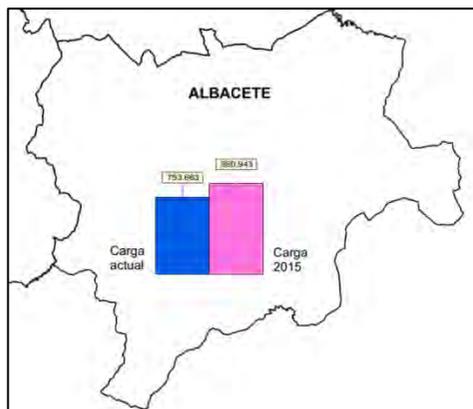


Figura 4: Carga contaminante del agua residual (habitantes-equivalentes) en la provincia de Albacete en 2010 y previsión para 2015 (II Plan Director de Depuración de Aguas Residuales Urbanas de Castilla-La Mancha).

Según el II Plan Director de Depuración de Aguas Residuales Urbanas de Castilla La Mancha, en 2010 la provincia de Albacete en conjunto tiene una carga contaminante de 753.663 h-e, y se tenía previsto que esta cifra llegase a 880.943 en 2015 (Figura 4).

La finalidad de las EDARS no es eliminar toda la contaminación que lleva el agua y obtener un agua completamente limpia, sino disminuir parte de la carga contaminante hasta un punto determinado en el que el medio natural sea capaz de asimilar esa contaminación que aún queda en el agua, dependiendo, en todo caso, de los usos y aprovechamientos del agua en el cauce receptor del efluente de depuración. A este respecto, el 7 de diciembre de 2007 se aprobó el RD 1620/2007 de reutilización de aguas depuradas y se modifica parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico (RDPH) aprobado por Real Decreto 849/1986, de 11 de abril mediante la derogación de los artículos 272 y 273 del RDPH que regulaban la reutilización de las aguas. Este Real Decreto en su Anexo I, establece además la frecuencia y método de análisis de los parámetros. Para valorar el cumplimiento de los requerimientos de calidad establece los criterios de conformidad y las medidas de gestión frente a incumplimientos. Los análisis deberán ser realizados en laboratorios de ensayo que dispongan de un sistema de control de calidad según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

0.4. Utilización del agua residual.

El Anexo I del mencionado RD 1620/2007 fija los valores máximos admisibles de los parámetros en función de los usos a los que está destinada

el agua regenerada distinguiendo cinco grandes tipos de usos: urbano, agrícola, industrial, recreativo y ambiental. Los parámetros a analizar recogidos en esta legislación son nematodos intestinales, *Escherichia coli*, *Legionella* spp., *Taenia saginata*, *Taenia solium*, sólidos en suspensión, turbidez, nitratos, nitrógeno total y fósforo total, fundamentalmente. Como bien es sabido, uno de los usos más extendidos y aceptados del agua residual depurada es el riego agrícola ya que con su aplicación se consiguen efectos beneficiosos al poder considerarse como fuente de abonado por sí misma debido al aporte de nitrógeno, fósforo y materia orgánica, con el consiguiente aumento de cosecha. No obstante, es imprescindible tener en cuenta una serie de precauciones ya que su uso puede suponer un posible aumento de la salinidad del suelo con el riego continuado. Además es necesario llevar un control microbiológico de la misma y en determinadas ocasiones puede suponer un riesgo de aporte de metales pesados en determinados casos.

A pesar de que su utilización agrícola es una práctica muy extendida el **análisis de fitotoxicidad** como prueba biológica con semillas *no se realiza de forma habitual* en este tipo de residuo. La inclusión de este tipo de bioensayo en la analítica de control del agua residual permitiría determinar la existencia o no de toxicidad para material vegetal en laboratorio. El resultado de este análisis puede ayudar a predecir el comportamiento de cultivos en el campo tras la aplicación de este tipo de agua como forma de riego y valorar la idoneidad o no del uso para riego del agua residual analizada antes de usarla.

1. OBJETIVO.

Evaluar la calidad del agua residual procedente de algunas EDARS de la provincia de Albacete desde el punto de vista de la **fitotoxicidad** utilizando el bioensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

2. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.

2.1. Selección de EDARs.

Según el II Plan Director de Depuración de Aguas Residuales Urbanas de Castilla La Mancha (actualmente en revisión), en la provincia de Albacete en 2010 había un total de 114 EDARS censadas.

En la siguiente tabla se muestra un extracto de este censo donde solo aparecen aquellas que estaban en funcionamiento en el momento de publicación del Plan.

No ha sido posible acceder a datos más recientes ya que actualmente toda esta información se encuentra en revisión por parte de la Administración.

	NOMBRE DE LA EDAR	NUCLEO URBANO DEPURADO	TÉRMINO MUNICIPAL	CUENCA VERTIDO	CARGA DISEÑO (h-equ.)	PROCESO
1	Albacete	Albacete	Albacete	Jucar	300.000	Lechos bacterianos
2	Alcadozo	Alcadozo	Alcadozo	Segura	----	Filtro verde
3	Aljube	Aljubé	Tobarra	Segura	----	----
4	Almansa	Almansa	Almansa	Jucar	57.666	Lechos bacterianos
5	Ayna	Ayna	Ayna	Segura	1.158	Aireación prolongada con eliminación de N y P
6	El Balletero	El Balletero	El Balletero	Guadiana	----	-----
7	Bogarra	Bogarra	Bogarra	Segura	1.215	Aireación prolongada con eliminación de N y P
8	Bonete	Bonete	Bonete	Segura	----	Lagunaje
9	El Bonillo	El Bonillo	El Bonillo	Guadiana	6.300	Fangos activos
10	Carcelén	Carcelén	Carcelén	Jucar	1.119	----
11	Casas de Ves	Casas de Ves	Casas de Ves	Jucar	2.600	Decantación-digestión
12	Casas Ibañez	Casas Ibañez	Casas Ibañez	Jucar	13.429	Aireación prolongada con eliminación de N y P
13	Caudete	Caudete	Caudete	Júcar	20.866	Lagunaje anaerobio y biodiscos
14	Cordovilla	Cordovilla	Tobarra	Segura	----	----
15	Elche de la Sierra	Elche de la Sierra	Elche de la Sierra	Segura	7.873	Aireación prolongada con eliminación de N y P
16	Ferez	Ferez	Ferez	Segura	1.466	Lagunaje
17	Fuensanta	Fuensanta	Fuensanta	Júcar	----	Filtro verde
18	La Gineta	La Gineta	La Gineta	Júcar	4.443	Lagunaje
19	Hoya-Gonzalo	Hoya-Gonzalo	Hoya-Gonzalo	Júcar	1.626	Lagunaje
20	Letur	Letur	Letur	Segura	2.225	Aireación prolongada con eliminación de N y P
21	Lietor	Lietor	Lietor	Segura	3.090	Aireación prolongada con eliminación de N y P
22	Madrigueras	Madrigueras	Madrigueras	Júcar	----	----
23	Madrigueras-Motilleja	Madrigueras-Motilleja	Madrigueras	Júcar	8.055	Aireación prolongada con eliminación de N y P
24	Minaya	Minaya	Minaya	Júcar	3.000	Aireación prolongada con eliminación de N y P
25	Molinicos	Molinicos	Molinicos	Segura	2.100	Aireación prolongada con eliminación de N y P
26	Montealegre del Castillo	Montealegre del Castillo	Montealegre del Castillo	Júcar	3.000	Biodiscos
27	Munera	Munera	Munera	Guadiana	7.583	----
28	Nerpio	Nerpio	Nerpio	Segura	2.100	Aireación prolongada con eliminación de N y P
29	Ossa de Montiel	Ossa de Montiel	Ossa de Montiel	Guadiana	5.833	Aireación prolongada con eliminación de N y P
30	Paterna del Madera	Paterna del Madera	Paterna del Madera	Segura	----	Lagunaje y Filtro verde
31	Pedro Andrés	Pedro Andrés	Nerpio	Segura	----	----
32	Pesebre	Pesebre	Peñascosa	Júcar	----	----
33	Pétrola	Pétrola	Pétrola	Júcar	----	----

NOMBRE DE LA EDAR	NUCLEO URBANO DEPURADO	TÉRMINO MUNICIPAL	CUENCA VERTIDO	CARGA DISEÑO (h-equ.)	PROCESO
34 Riopar	Riopar y Arrecife y Cortijo Abdón	Riopar	Segura	1.422	Aireación prolongada con eliminación de N y P
35 La Roda	La Roda	La Roda	Júcar	27.833	Aireación prolongada con eliminación de N y P
36 El Salobral	El Salobral	Albacete	Júcar	----	----
37 Socovos-Tazona	Socovos, Tazona	Socovos	Segura	4.561	Aireación prolongada con eliminación de N y P
38 Tarazona de La Mancha	Tarazona de La Mancha	Tarazona de La Mancha	Júcar	18.149	Orbal
39 Tinajeros	Tinajeros	Albacete	Júcar	----	----
40 Tobarra	Tobarra	Tobarra	Segura	13.281	Lagunaje
41 Valdeñana	Valdeñana	Valdeñana	Júcar	3.000	Aireación prolongada con eliminación de N y P
42 Villalgordo del Júcar	Villalgordo del Júcar	Villalgordo del Júcar	Júcar	3.000	Aireación prolongada con eliminación de N y P
43 Villamalea	Villamalea	Villamalea	Júcar	3.000	Aireación prolongada con eliminación de N y P
44 Villapalacios	Villapalacios	Villapalacios	Guadalquivir	1.325	----
45 Villarrobledo	Villarrobledo	Villarrobledo	Guadiana	55.228	Lechos bacterianos
46 Yeste	Yeste	Yeste	Segura	4.659	Aireación prolongada con eliminación de N y P

Tabla 1: Censo de EDARS en funcionamiento en la provincia de Albacete (año 2010).

El resto de Estaciones Depuradoras hasta completar las 114 registradas no aparecen en la tabla ya que estaban en construcción o tenían un mal funcionamiento.

Del total de 46 EDARs en funcionamiento en la provincia, 18 utilizan la aireación prolongada con eliminación de N y P como proceso de depuración; 4 utilizan lechos bacterianos o biodiscos, 3 filtros verdes y 7 lagunaje. En el resto de las instalaciones no está determinado el tipo de tratamiento.

Inicialmente, se pretendió tomar muestras del agua residual depurada de EDARs cuya carga contaminante fuese superior a 2000 habitantes equivalentes (Real Decreto-Ley 11/1995) correspondiente a algunos de los municipios más representativos de la provincia.

Este plan inicial tuvo que ser modificado posteriormente por otro menos ambicioso dadas las dificultades encontradas. Por una parte, no fue posible disponer de información actualizada por parte de la JCCM sobre el estado (en funcionamiento, en construcción, etc.) de las EDARs de la provincia ya que, como ya se ha comentado, se encuentra en revisión. Además, puesto que la gestión de las EDARs en la mayoría de los casos está derivada entre Administración Pública y concesiones privadas fue complicado obtener el permiso correspondiente para el acceso y la toma de muestras ya que, lamentablemente no se dieron muchas facilidades para ello.

De esta forma, el plan de trabajo definitivo se diseñó de forma que el análisis de fitotoxicidad del agua residual depurada procedente de EDARs estuviera enfocado a plantas con tratamientos de depuración diferenciados. De esta forma sería posible establecer una primera aproximación a la correspondencia entre el grado y tipo de tratamiento con la fitotoxicidad del residuo.

Así, se seleccionaron:

- a) EDAR de Albacete caracterizada por tener un tratamiento secundario de **lechos bacterianos**.
- b) EDAR de El Bonillo caracterizada por tener un tratamiento secundario de **fangos activos**.
- c) EDAR de Hellín caracterizada por tener un tratamiento secundario de fangos activos con tratamiento final **terciario con luz ultravioleta**.

2.2. Toma de muestras.

Previo a la toma de muestras se efectuó la toma de contacto con los responsables de las EDARS con el fin de concertar una visita para la recogida del agua residual.

Las muestras se tomaron en envase estéril de plástico de 500 ml y se llevaron refrigeradas hasta el laboratorio manteniéndose a 4°C hasta el momento de su análisis.

2.3. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga.

No existe consenso respecto de las especies sensibles para utilizar en los bioensayos, como tampoco en los criterios de interpretación de los resultados obtenidos en dichas pruebas.

Diversos autores (Zucconi y cols., 1981; Tiquia, 2000; Emino y Warman, 2004) determinan el índice de germinación (IG), integrando el porcentaje relativo de germinación y el crecimiento relativo de raíces.

Esto permite establecer tres niveles de fitotoxicidad:

1. Severa
2. Moderada
3. Baja o nula

Para el análisis de la fitotoxicidad del agua residual procedente de las diferentes EDARS se siguió un método basado en el propuesto por Sobrero y Ronco, 2004 modificado y adaptado; que mide la toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos,

ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers y cols., 1997; Cheung y cols., 1989; Dutka, 1989). A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba. Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies no blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984; Wang, W. 1987; USEPA, 1989).

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales de evaluación de los efectos tóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

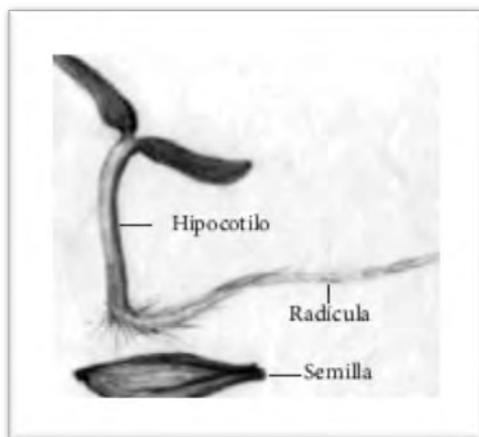


Figura 5: Imagen de radícula, hipocotilo y semilla.

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación.

Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

2.3.1. Procedimiento para el desarrollo de la prueba.

A. Preparación de las muestras

En el caso de que la muestra sin diluir resultase fitotóxica y por tanto se observase una ausencia de germinación o un porcentaje menor al 50%, se tenía previsto realizar una curva dosis-respuesta preparando diluciones con un factor de 0,5 lo que permite abarcar el intervalo de concentraciones 100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5% y obtener gran precisión en los resultados. No fue necesaria esta preparación ya que con la siembra directa en las muestras de agua residual sin diluir se observó un buen porcentaje de germinación. El agua destilada se utilizó para la preparación de cada dilución y para realizar el **control negativo**.

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debía realizarse un **control positivo**, utilizando sulfato de zinc como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la CI_{50} para el lote de semillas (tenemos que saber con qué concentración se produce la muerte del 50% de los individuos o en nuestro caso el 50% de la inhibición de la germinación de las semillas).

B. Reactivos y materiales.

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Trocadero-ribera).
- Agua destilada
- Cápsulas de Petri de 150 mm de diámetro.
- Papel de filtro tipo Whatman núm. 3. El papel de filtro seleccionado como sustrato de germinación cumple las siguientes características imprescindibles para la calidad de la prueba: Trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido, resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie sin atravesarlo, situación que dificultaría la eliminación de las plántulas sin dañarlas, ausencia de residuos tóxicos (ej. blanqueadores), que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas).
- Jeringuilla de 10 ml.
- Regla graduada como instrumento de medición.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Parafilm para sellar las placas.
- Cámara oscura termostatzada (22 ± 2 °C).



Figura 6: Imagen del material utilizado en la prueba.

C. Protocolo de ensayo.

Se utilizaron 3 réplicas por muestra y 13 semillas por réplica.

Los pasos a seguir fueron:

- a) Colocar en cada cápsula de Petri un disco de papel de filtro.

- b) Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- c) Saturar el papel de filtro con 10 ml de la muestra evitando que se formen bolsas de aire.
- d) Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente 13 semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- e) Tapar las cápsulas y precintarlas con parafilm para evitar la pérdida de humedad. Para favorecer la germinación de la semilla de lechuga fue necesaria la oscuridad por lo que las placas de Petri debieron incubarse durante 120 h (cinco días) a una temperatura de 25 ± 2 °C en una cámara de germinación.
- f) Realizar repeticiones para cada dilución ensayada (se hicieron tres repeticiones).
- g) Terminado el periodo de exposición (120 h), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.
- h) Medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a las muestras y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (figura 7).

La figura 8 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación. Para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, se procedió a congelar las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo. De esta manera, las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición.

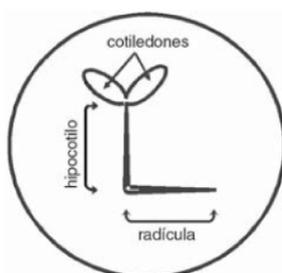


Figura 7: Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición (Sobrero y Ronco, 2004).



Figura 8: Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación (Sobrero y Ronco, 2004).

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etcétera). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

En la figura 9 se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas (Sobrero y Ronco, 2004):

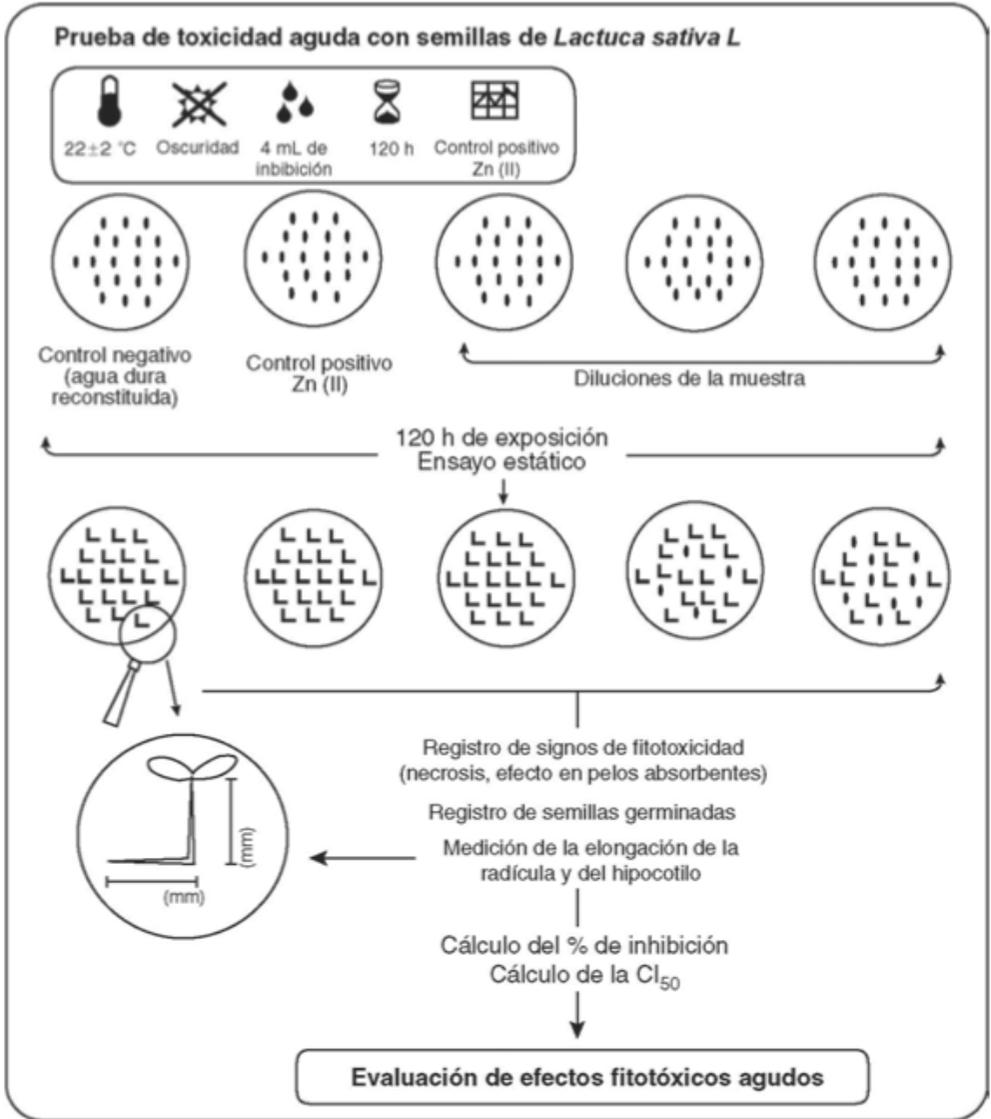


Figura 9: Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas (Sobrero y Ronco, 2004).



Figura 10: Disposición de las semillas en la placa Petri antes de su incubación en oscuridad a 25 ± 2 °C.

De acuerdo con el protocolo detallado anteriormente, con los resultados obtenidos en las semillas germinadas en las muestras de agua residual se realizaron los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición.
- Se calculó el porcentaje de germinación relativo (PGR), el crecimiento de radícula relativo (CRR) y el índice de germinación según la metodología descrita por Tiquia (2000), por tener la ventaja de que permite evaluar la toxicidad baja (que afecta el crecimiento de la raíz) y la toxicidad pesada (que afecta la germinación), a través de las expresiones:

$$PGR = \frac{n^{\circ} \text{ semillas germinadas en la muestra de agua residual}}{n^{\circ} \text{ semillas germinadas en el agua destilada}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Elongación de la radícula en la muestra de agua residual}}{\text{Elongación de la radícula en el agua destilada}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

- Cada uno de estos índices se evaluó estadísticamente mediante análisis de varianza y se elaboraron gráficas para la elongación de la radícula, el hipocotilo y el IG. Además, se ha intentado establecer un modelo de regresión simple que relacione las longitudes de la radícula y el hipocotilo para cada uno de los tratamientos analizados.

3. RESULTADOS

Como era de esperar, en el control positivo (SO_4Zn) se observaron semillas con desarrollo radicular anormal. Una plántula anormal, es aquellas que no presenta capacidad para desarrollarse en una planta normal cuando crece en el suelo bajo condiciones favorables, debido a que tiene una o más de las estructuras esenciales irreparablemente defectuosas (Aguerre y Gabazzon, 2012).

En los ensayos con el tóxico de referencia se presentaron las siguientes anomalías:

-Sistema radicular: raíz primaria defectuosa (atrofiada o ausente), con constricción.

-Sistema apical: hipocótilo defectuoso, por ejemplo, corto y grueso o ausente, curvado o formando un lazo, estrechamente retorcido o formando una espiral, y cotiledones defectuosos, por ejemplo necróticos, dañados o ausentes.

Por el contrario, en el control negativo y en las muestras analizadas no se observaron defectos en la formación de la radícula y el hipocotilo, ni presencia de hongos. Si es destacable que en el caso de las semillas germinadas con el agua procedente de la EDAR de Albacete la radícula resulto de apariencia más delgada y delicada que en el resto de los casos.

En la Tabla 2 se muestran los valores de la longitud de la radícula, del hipocotilo y la relación radícula/hipocotilo. En el caso del control la relación radícula/hipocotilo es 1,08, lo que quiere decir que tanto la raíz como el hipocotilo miden aproximadamente lo mismo. Por el contrario, con cualquiera de las muestras analizadas se ha observado que esta relación se reduce a la mitad lo que quiere decir que el hipocotilo midió aproximadamente el doble que las radículas.

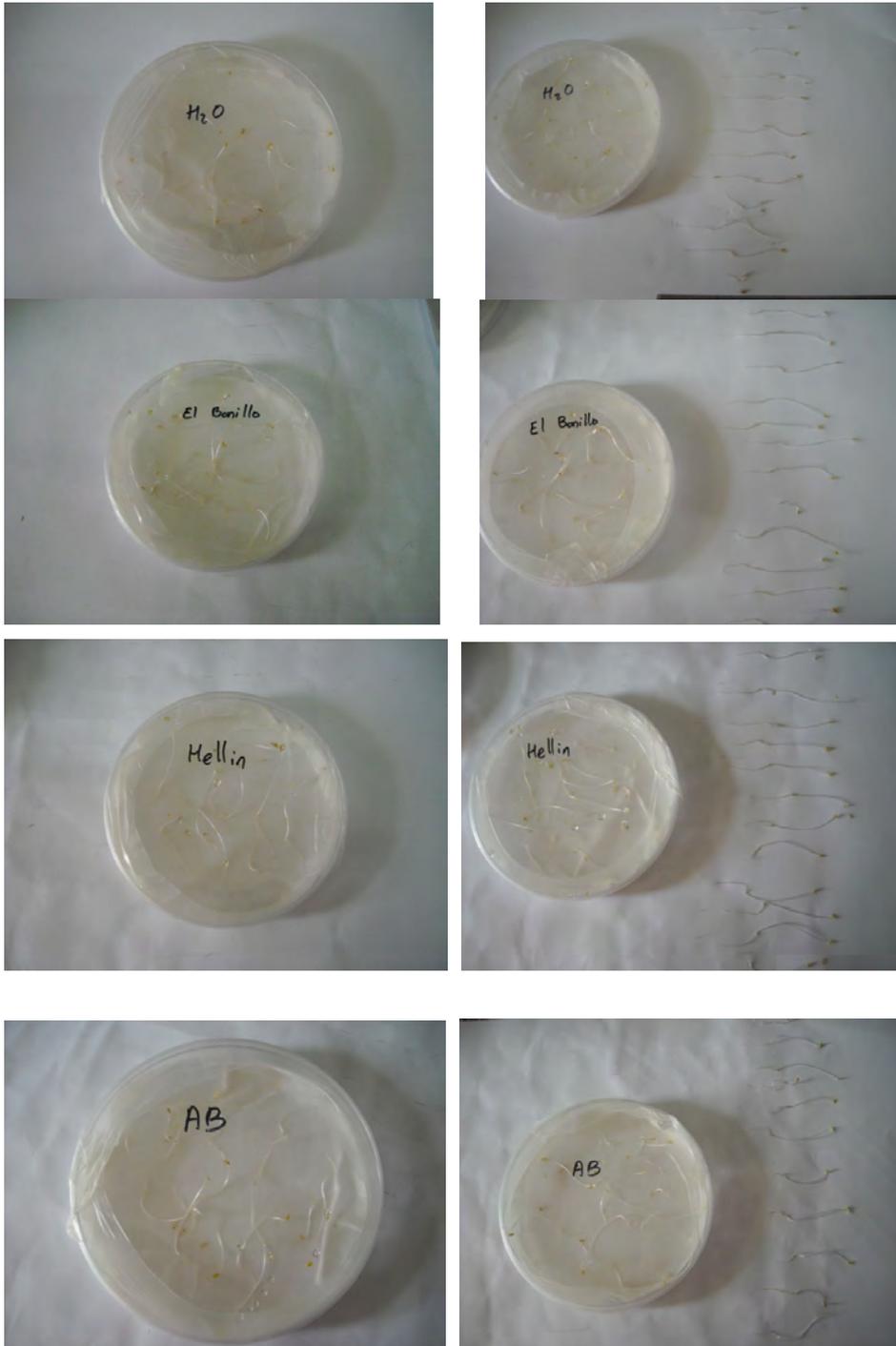


Figura 11: Apariencia de las plantas germinadas finalizadas las 120 horas de incubación antes de medirlas.

	EDAR de El Bonillo	EDAR de Albacete	EDAR de Hellín	Control negativo
Longitud radícula (mm)	26,60	20,60	26,05	32,97
Longitud hipocotilo (mm)	49,48	40,48	46,69	30,31
Radícula/Hipocotilo	0,54	0,51	0,56	1,08

Tabla 2: Valor medio de la longitud de radícula e hipocotilo (mm)

Este hecho es un indicativo de que la composición de cualquier agua residual depurada estudiada afecta positivamente al crecimiento del hipocotilo en la plántula.

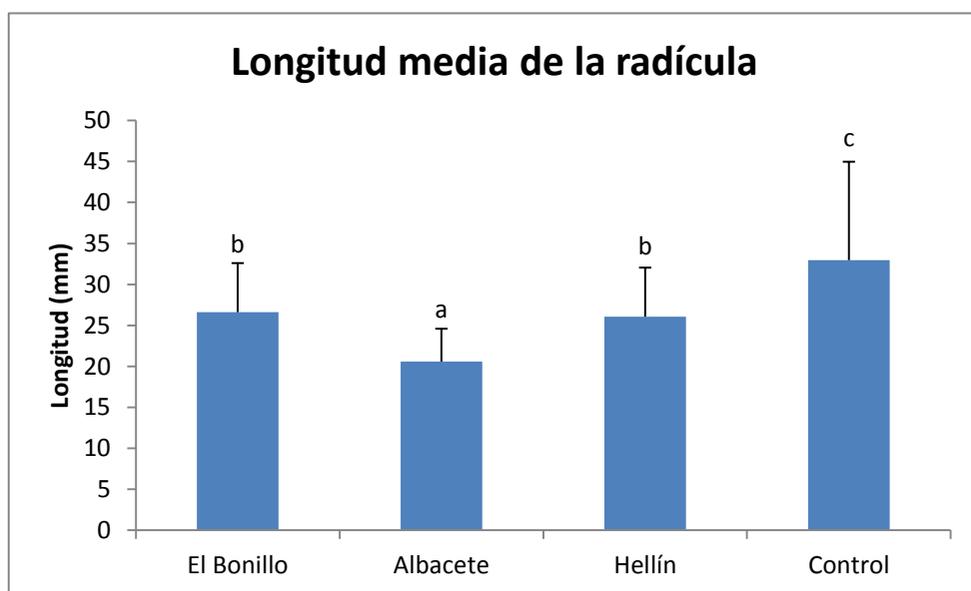


Figura 12: Longitud media de la radícula en semillas germinadas en muestras de agua residual. Letras diferentes indican diferencias significativas entre parámetros.

En el análisis estadístico de la longitud de la radícula (Figuras 12 y 13), vemos que el tamaño obtenido en este parámetro con el agua residual depurada procedente de EDARs con fangos activos (tenga o no tratamiento terciario) es significativamente superior al obtenido con el agua generada en la EDAR con lechos bacterianos. A su vez, con todas las muestras de agua residual, la longitud obtenida fue significativamente inferior al control.

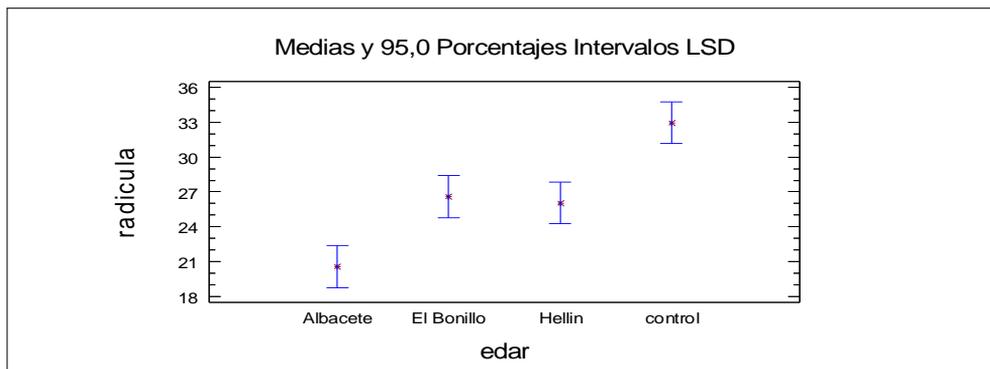


Figura 13: Gráfico de medias para radícula (mm) según el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

En el análisis estadístico de la longitud del hipocotilo (Figuras 14 y 15) vemos que el tamaño obtenido en este parámetro con el agua residual depurada procedente de EDARs con fangos activos es significativamente superior al obtenido con el agua generada en la EDAR con lechos bacterianos. A su vez, con todas las muestras la longitud obtenida fue significativamente superior al control.

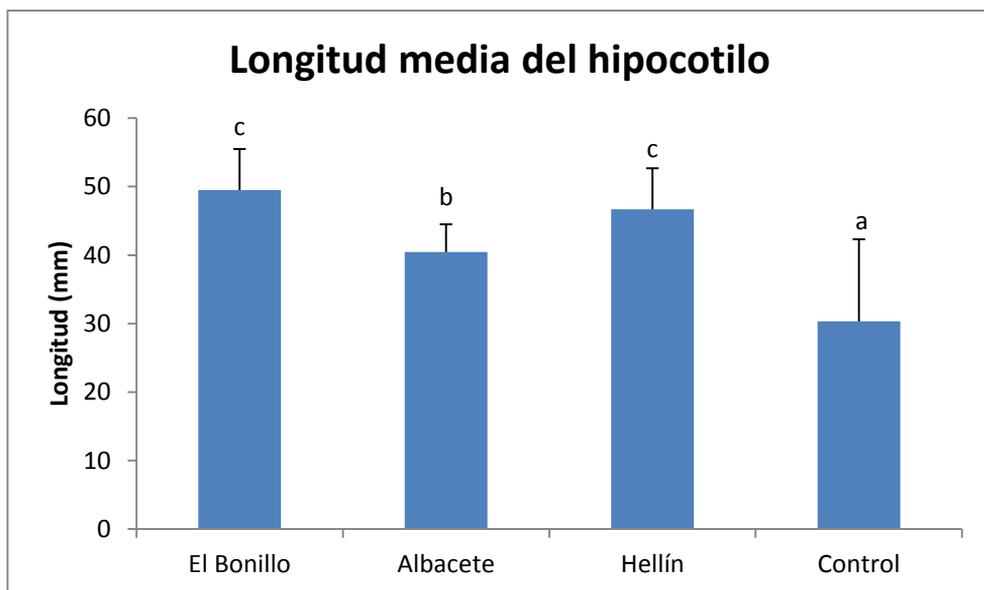


Figura 14: Longitud media del hipocotilo en semillas germinadas en muestras de agua residual. Letras diferentes indican diferencias significativas entre parámetros.

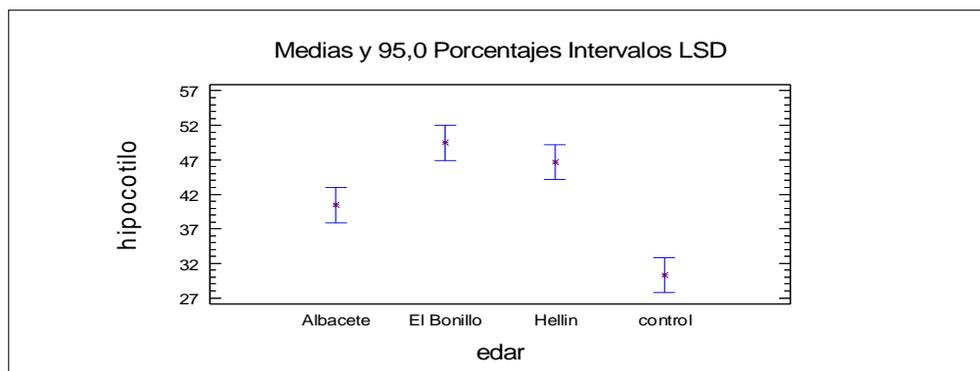


Figura 15: Gráfico de medias según el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

Puesto que parece existir una relación entre longitud de radícula e hipocotilo diferente en función de la muestra se han planteado una serie de modelos de regresión simple para determinar estos parámetros en función del agua utilizada (Tabla 3). La proporción existente entre radícula e hipocotilo parece ser una constante de acuerdo con la muestra utilizada. Estos modelos pueden servir de base para estudios posteriores para realizar estudios comparativos con agua residual procedente de otras depuradoras y establecer nuevos parámetros indicativos en el análisis de fitotoxicidad.

MODELOS DE REGRESIÓN LÍNEAL ENTRE HIPOCOTILO Y RADÍCULA		
EDAR	MODELO	R²
Control	Hipocotilo = -6,23 + 6,57sq(radícula)	80,81
Albacete	Hipocotilo = 66 - (494,27/radícula)	24,82
Hellín	Hipocotilo = 1/(0,011 + 0,294/radícula)	43,84
El Bonillo	Hipocotilo = 1,79 radícula ^{0,65}	76,64

Tabla 3: Modelos de regresión lineal.

De las muestras analizadas, el modelo planteado en el caso de la EDAR de El Bonillo es la que mejor se aproxima después del control con un R² superior al 75%.

Tanto PGR como CRR son parámetros comparativos respecto al control negativo con agua destilada. Como puede verse en la Tabla 4 el porcentaje de germinación relativo con el agua residual procedente de Hellín es similar al control y muy alto en los otros casos lo que indica que no se dieron problemas de germinación con ninguna de las muestras sin diluir.

AGUA RESIDUAL PROCEDENTE DE EDARS			
	PGR (%)	CRR (%)	IG (%)
Control negativo (agua destilada)	100	100	100
Control positivo SO₄Zn			
1 M	0	0	0
0,1 M	0	0	0
0,01 M	29,78	0,84	0,25
0,001 M	36,17	1,02	0,36
0,0001 M	82,98	49,85	40,95
EDARS			
EDAR de Albacete	94,87	62	59
EDAR de El Bonillo	94,87	81	77
EDAR de Hellín	100	79	79

Tabla 4: Valor del Porcentaje de Germinación Relativa (PGR), Crecimiento Radicular Relativo (CRR) e Índice de Germinación (IG) en las muestras analizadas y en los controles positivo y negativo.

Con respecto al crecimiento radicular sí que se aprecian mayores diferencias entre las aguas residuales muestreadas. Así vemos que con respecto al control negativo, el resultado obtenido en CRR con el agua de la EDAR de El Bonillo es el más similar, seguido de Hellín y finalmente a mayor distancia con el agua de la depuradora de Albacete. Esto coincide con el hecho de la mayor debilidad encontrada en las raíces de las semillas germinadas en esta agua.

Respecto al Índice de Germinación (IG), la mayoría de los autores consideran que la germinación como componente del IG es menos sensible que el crecimiento radicular (Aguerre y Gavazzo, 2012). La combinación de estos dos factores en el cálculo de IG da una mejor aproximación del comportamiento fitotóxico de un residuo que cada uno de estos por separado. Puede ocurrir que exista una buena germinación pero el crecimiento radicular posterior sea defectuoso lo que indicaría que existen compuestos con cierto nivel de fitotoxicidad que impidan el correcto desarrollo del vegetal. Podría darse el caso de que IG de una muestra fuese superior al control negativo lo que in-

dicaría que ese compuesto estudiado tiene ciertos componentes que favorecen el crecimiento y desarrollo de la plántula por encima de valores superiores a los determinados en el control.

En este estudio se ha visto que con el agua residual depurada procedente de una EDAR con tratamiento terciario con luz ultravioleta se ha conseguido el mejor IG (79%), seguido de la EDAR con tratamiento secundario de fangos activos (IG = 77%). Más alejado de estos resultados se encuentra el caso de la muestra procedente de una EDAR de lechos bacterianos (IG = 59%).

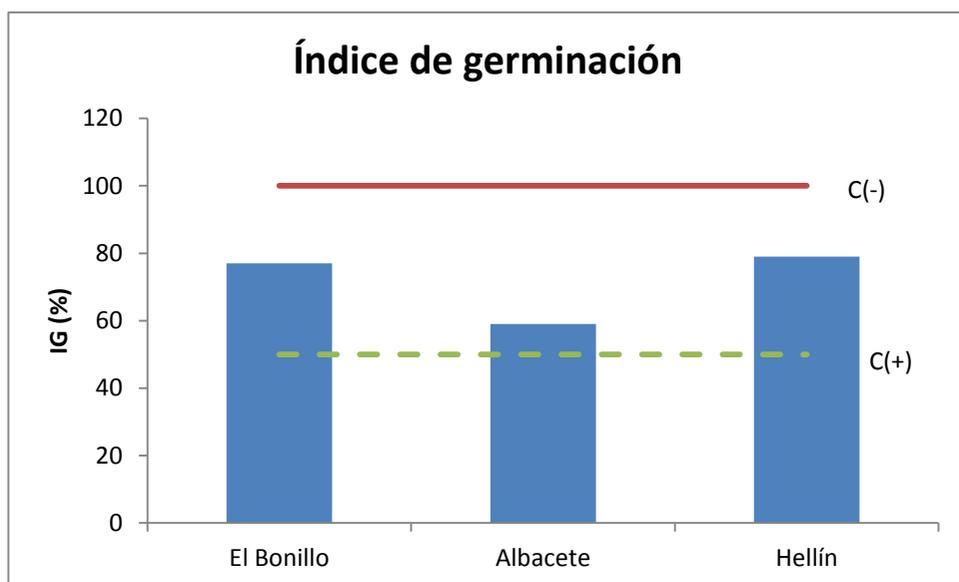


Figura 16: Índice de germinación para el agua residual de las EDARs estudiadas. Las líneas indican el valor IG para el control negativo C (-) y para el control positivo C(+).

No existen acotaciones claras y oficiales pero según Aguerre y Gava-zzo, 2012; puede adoptarse el criterio que valores de $IG \geq 80\%$ indican que no hay sustancias fitotóxicas o que estas están en muy baja concentración; que valores de $IG \leq 50\%$ indican que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas y que valores entre 50% y 80% podrían indicar presencia moderada de estas sustancias. En general puede afirmarse que IG menor del 50% implica fitotoxicidad del residuo.

En nuestro caso, puede afirmarse que las muestras estudiadas no posee sustancias fitotóxicas que impidan su utilización en agricultura ya que en todos los caso IG es superior al 50%.

No obstante, la ausencia de antecedentes impide comparar estos resultados con otros trabajos, siendo necesario experiencias adicionales para corroborar los resultados obtenidos.

4. CONCLUSIONES

Se ha visto que existen diferencias significativas en el valor del Índice de Germinación respecto al nivel de depuración utilizado. El mayor IG y por tanto mejor indicativo de ausencia de problemas por fitotoxicidad se ha dado en las EDARs con tratamiento secundario por fangos activos y sobre todo en las que tienen tratamiento terciario con luz ultravioleta. Puede afirmarse, por tanto que a mayor nivel de depuración, menor problema de fitotoxicidad.

Puesto que está suficientemente documentada la aptitud agronómica del agua residual depurada cuando se cumplen los requisitos mínimos de calidad establecidos en la legislación vigente, resultaría interesante incluir este sencillo análisis en aguas residuales para determinar con mayor grado de precisión el nivel de fitotoxicidad para el cultivo cuando el uso del agua residual vaya enfocado a la agricultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguerre, Y.S. y Gavazzo, G.B. 2012. Fitotoxicidad de papel reciclado. Ensayos preliminares. *Proceedings of the ABTCP 2012 + VII CIADICYP. The 45th ABTCP International Pulp and Paper Congress and VII Ibero American Congress on Pulp and Paper Research.*
- Bowers, N., Pratt, J.R., Beeson D., Lewis M., 1997. “Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates”. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (2), 207-213.
- Cheung, Y.H., Wong, M.H., Tam, N.F.Y., 1989. “Root and Shoot Elongation as an Assessment of Heavy Metal Toxicity” and “Zn Equivalent Value’ of Edible Crops”. *Hydrobiologia* 188/189, 377-383.
- Dutka, B., 1989. Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. *Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments, National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.*
- Emino, E., Warman, P., 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Science & Utilization* 12 (4): 342-348.
- II Plan Director de Depuración de Aguas Residuales Urbanas de Castilla-La Mancha. <http://pagina.jccm.es/agenciadelagua/index.php?id=44&p=44>
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1984. Terrestrial Plants: Growth Test. *Guideline for Testing of Chemicals N °208, OECD Publications Service, Paris.*

- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
- Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- Sobrero, M.C. y Ronco, A., 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). p: 71-79. En: *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*, G. Castillo, Ed., Ottawa, Canadá.
- Tiquia, S.M., 2000. Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig on litter system. p: 625-647. In: *Proceedings of the International Composting Symposium*, P.R. Warman and B.R. Taylor, Ed., CBA Press Inc., Truro, NS.
- UNICEF, 2017. https://www.unicef.org/spanish/wash/index_31600.html
- USEPA, 1989. *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.
- Veolia e IFPRI (Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias). 2015. The Murky Future of Global Water Quality. Libro blanco a cargo de Veolia & IFPRI. https://www.veolianorthamerica.com/sites/g/files/dvc596/f/assets/documents/2015/04/IFPRI_Veolia_H2OQual_WP.pdf
- Wang, W., 1987. "Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic an Inorganic Pollutants". *Environmental Toxicology & Chemistry* 6, 409-414.
- WWDR, 2016. Agua y empleo. Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22:54-57.