

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

**“Análisis de la aptitud agronómica del
compost proveniente de la EDAR
Llocnou d’En Fenollet (Valencia)
mediante ensayos ecotoxicológicos”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a: Merytxell Lahidalga
Mancera

Tutor/a: María Teresa Sebastiá
Frasquet

Cotutor: Sergio Lloret Salinas

GANDIA, 7 de septiembre de 2020

Resumen

La realización de ensayos toxicológicos para evaluar la calidad agronómica del compost, es una herramienta muy utilizada.

En este estudio, se ha llevado a cabo un ensayo toxicológico para evaluar la calidad agronómica de un compost proveniente de una depuradora la cual había sido tratada con un nuevo coagulante de base natural para la eliminación del fósforo. Para los ensayos se utilizaron 3 especies de plantas: *Brassica rappa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*. Además de dos especies de artrópodos y anélidos: *Enchytraeus crypticus* y *Folsomia candida*. Gracias a los resultados de los bioensayos se ha podido demostrar la buena calidad del compost y así poder ser utilizado en el sector de la agricultura.

Palabras clave: Ensayos toxicológicos, calidad agronómica, compost.

Summary

Toxicological tests are a good tool when you want to evaluate the agronomic quality of compost.

In this study, a toxicological test was carried out to evaluate the agronomic quality of a compost from a treatment plant which had been treated with a new natural-based coagulant for the elimination of phosphorus. 3 species of plants were used for the tests: *Brassica rappa*, *lolium perenne* and *trifolium repens*. In addition to, two species of arthropods and annelids: *Enchytraeus crypticus* and *Folsomia candida*. The results of this study show the good quality of the compost and thus be able to be used in the agricultural sector.

Keywords: toxicological test, agronomic quality, compost.

Índice

1. Introducción	6
1.2 Objetivos	9
2. Materiales y métodos	10
2.1 Metodología experimental	14
2.2 Procedimiento de la aplicación del suelo y compost en <i>Enchytraeus crypticus</i>	15
2.3 Procedimiento de la aplicación del suelo y compost en <i>Folsomia candida</i> (Colémbolos)	17
2.4 Procedimiento de la aplicación de compost y suelo en las plantas	19
3. Resultados	21
3.1 Resultados de <i>Enchytraeus crypticus</i>	21
3.2 Resultados de <i>Folsomia candida</i>	23
3.3 Resultados en plantas	25
4. Determinación de la relación concentración - efecto (PNEC)	27
5. Determinación de la dosis de exposición (PEC) y caracterización del riesgo (PEC/PNEC)	29
6. Discusión	30
7. Conclusiones	33
Bibliografía	34

Índice de tablas

Tabla 1. Requisitos de vertido procedentes de EDAR según la normativa europea vigente sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.	7
Tabla 2. Metodología experimental desarrollada	14
Tabla 3. Resultados de ensayos en <i>Enchytraeus</i>	21
Tabla 4. Número de individuos medio en <i>Enchytraeus</i>	21
Tabla 5. Resultados de ensayos en <i>Folsomia</i>	23
Tabla 6. Número de individuos medio en <i>Folsomia</i>	23
Tabla 7. Resultados de ensayos en <i>Brassica rapa</i>	25
Tabla 8. Resultados de ensayos en <i>Trifolium repens</i>	25
Tabla 9. Resultados de ensayos en <i>Lolium perenne</i>	25
Tabla 10. Crecimiento medio de <i>Brassica rapa</i>	26
Tabla 11. Crecimiento medio de <i>Trifolium repens</i>	26
Tabla 12. Crecimiento medio de <i>Lolium perenne</i>	26
Tabla 13. Ec10 en <i>Folsomia</i>	27
Tabla 14. Clasificación de riesgo ambiental según el RQ	29
Tabla 15. Cocientes de riesgo para la EDAR de estudio	29
Tabla 16. Resultados de bioensayos para <i>Enchytraeus crypticus</i> en la EDAR Ibi	31
Tabla 17. Resultados de bioensayos para plantas en la EDAR Ibi	31
Tabla 18. Cociente de riesgo para la EDAR de Ibi	31
Tabla 19: Resultados del estudio para la EDAR Gandía-La Safor.	32
Tabla 20: Cociente de riesgo para la EDAR Gandía-La Safor	32

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Representación gráfica de la media de <i>Enchytraeus crypticus</i> junto con la desviación típica.	22
Gráfica 2. Representación de la media de individuos de <i>Folsomia candida</i> junto con la desviación típica	24

Índice de Imágenes

Imagen 1. <i>Brassica rapa</i>	11
Imagen 2. <i>Lolium perenne</i>	11
Imagen 3. <i>Trifolium repens</i>	11
Imagen 4. <i>Enchytraeus crypticus</i>	12
Imagen 5. <i>Folsomia candida</i>	13
Imagen 6. <i>Enchytraeus crypticus</i> en ensayos	16
Imagen 7. <i>Enchytraeus crypticus</i> en azul de metileno	16
Imagen 8. Huevos de <i>Folsomia</i>	18
Imagen 9. <i>Folsomia</i> en placa madre	18
Imagen 10. <i>Folsomia</i> en azul de metileno	18
Imagen 11. <i>Folsomia</i> después de binarizar la imagen con Fiji©.	18
Imagen 12. <i>Trifolium repens</i> en ensayos	20
Imagen 13. <i>Brassica rapa</i> en ensayos	20
Imagen 14. Distribución de la especie <i>Folsomia</i>	28

1. Introducción

En las aguas residuales el fósforo y el nitrógeno, provienen principalmente de los desechos humanos, actividades industriales y el uso de detergentes, entre otros (Acevedo,2016).

Estos nutrientes provocan, eutrofización en las aguas receptoras, siendo esta una de la principales formas de contaminación del agua, causando un crecimiento exponencial de algas y la proliferación incontrolada de una especie, en relación a las demás (Lifenewest, 2020).

A consecuencia de esto, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), se ven obligadas a reducir o eliminar los nutrientes.

Teniendo en cuenta fundamentalmente el problema de la eutrofización, en aquellos ecosistemas calificados como sensibles, así como: lagos, lagunas, embalses, estuarios y aguas marítimas que sean eutróficos o que podrían llegar a ser eutróficos en un futuro si no se adoptan medidas de protección, son más rigurosos a la hora de la eliminación de los nutrientes. Por lo que en el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto - ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. En donde se especifican los límites de vertido procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales realizadas en zonas sensibles y zonas menos sensibles.

En cuanto a las zonas clasificadas como menos sensible, se podrán catalogar cuando el vertido de aguas residuales no tenga efectos negativos sobre el medio ambiente debido a la morfología, hidrología o condiciones hidráulicas específicas existentes en la zona. Por lo que se tendrán en cuenta los siguientes elementos: bahías abiertas, estuarios y otras aguas marítimas con un intercambio de agua bueno y que no tengan eutrofización o agotamiento del oxígeno, o en las que se considere que es improbable que lleguen a desarrollarse fenómenos de eutrofización o de agotamiento del oxígeno por el vertido de aguas residuales urbanas (RDL 11/1995, de 28 de diciembre).

En la siguiente tabla podemos observar los límites de vertidos en zonas sensibles y zonas menos sensibles según la normativa europea.

Tabla 1. Requisitos de vertido procedentes de EDAR según la normativa europea vigente sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.

Parámetro	Zonas normales ^a		Zonas sensibles ^b	
	Concentración mg/ml	Reducción ^b %	Concentración mg/ml	Reducción ^b %
DBO ₅	25	70-90	25	70-90
DQO	125	75	125	75
Sólidos es suspensión	35	90	35	90
Fósforo Total			2 (10000-100000 he) 1(>100000 he)	80
Nitrógeno Total ^c			15 (10000-100000 he) ^d 10 (>100000 he) ^d	70-80

a Los Estados miembros establecen de acuerdo a la Directiva 91/271/CEE las zonas sensibles y menos sensibles.

b Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.

c Nitrógeno total equivale a la suma de nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato y nitrógeno en forma de nitrito.

d Estos valores de concentración constituyen medias anuales. No obstante los requisitos de vertido de nitrógeno pueden comprobarse mediante medias diarias. En este caso, la media diaria no deberá superar los 20 mg N/l de concentración para todas las muestras cuando la temperatura del reactor biológico sea superior o igual a 12°C. En sustitución al requisito de la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuentas las condiciones climáticas regionales.(Acevedo,2016)

La eliminación de estos nutrientes puede llevarse a cabo tanto por procesos fisicoquímicos como por procesos biológicos.

Dentro de estos últimos se encuentra la etapa de fangos activos, en el que se lleva a cabo el proceso de NITRIFICACIÓN - DESNITRIFICACIÓN para la eliminación de

nitrógeno. La eliminación del fósforo se lleva a cabo bien en combinación con la biodegradación aerobia de materia orgánica ó con la eliminación de nitrógeno (Larrea Urcola, 2019).

Dentro de los procesos fisicoquímicos para la eliminación de nutrientes se encuentra la precipitación química. Entre los productos químicos más utilizados en dicho proceso están: el sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14 \text{H}_2\text{O}$), el aluminato de sodio ($\text{Na}_2\text{OAl}_2\text{O}_3$), el cloruro férrico (FeCl_3), el sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), el cloruro ferroso (FeCl_2) o el sulfato ferroso(FeSO_4); y con menor frecuencia se emplea la cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), que aunque es más accesible y de menor coste, exige mantener un pH demasiado elevado y provoca la precipitación de otros compuestos, así como la necesidad de un reajuste posterior (Acevedo, 2016).

Asimismo según el estudio de Acevedo (2016), una de las desventajas que presenta esta forma tradicional de eliminar el fósforo, es el deterioro de la calidad del fango producido, limitando su posible utilización como fertilizante en la agricultura.

Debido a esta desventaja mencionada, la evaluación de la calidad y seguridad del compost resulta una cuestión primordial que permite conocer los riesgos para la salud humana y medioambiental derivados de la utilización del suelo para la agricultura.

En la actualidad, con el fin de optimizar la producción de los suelos agrícolas, la aplicación de fangos procedentes de EDAR en estos suelos, es una práctica habitual. Esta práctica implica un compromiso responsable con el medio ambiente, pues su correcta aplicación favorece no solo el reciclaje de los biosólidos frente a su eliminación, sino también una mejora de los suelos gracias al aporte de nutrientes, pudiendo extenderse a zonas donde existen procesos de desertificación ligados a sequías e incendios (Lloret *et al.*, 2015).

Por ello, la comprobación de la calidad agronómica de los fangos procedentes de EDAR es necesaria, siendo los bioensayos una buena herramienta que permite determinar las posibles integraciones entre los compuestos del suelo y valorar cómo la degradación y/o metabolización de los mismos puede incrementar o disminuir su potencial tóxico.

Este Trabajo Final de Grado (TFG) forma parte del proyecto LIFE NEWEST, en el que trabajan las empresas, Servyeco, EGEVASA, Global Omnium Medioambiente, S,A, y el cual esta cofinanciado por el programa LIFE de la Unión Europea.

Life Newest trabaja por un lado, en un nuevo tratamiento de aguas residuales urbanas basado en coagulantes naturales para evitar la contaminación por fósforo. Y por otro lado, maximizar el reciclaje y la reutilización de los lodos generados al ser utilizados en la agricultura.

La tecnología utilizada como nuevo coagulante se basa en el uso de nuevos productos orgánicos de origen natural que son capaces de mejorar la eficiencia del coagulante y sustituir los productos químicos corrosivos y peligrosos utilizados actualmente, tales como cloruro férrico, sulfato de alúmina, neutralizantes de pH. Además, esta tecnología no aporta contaminantes al agua, tales como sales o metales. Por lo tanto, se minimizan los residuos tóxicos generados, ya que se dejan de utilizar envases que contienen productos nocivos y se evitan posibles vertidos de producto químico peligroso para el medio ambiente.

En concreto, este trabajo se ha desarrollado durante las prácticas de empresa en EGEVASA, y abarcará el estudio de evaluación de la calidad agronómica del compost producido en la depuradora de Llocnou d'En Fenollet (Valencia), en la cual se ha utilizado en el tratamiento de la eliminación del fósforo este nuevo coagulante de base natural.

1.2 Objetivos

- Determinar el efecto toxicológico mediante bioensayos para evaluar la calidad agronómica del compost proveniente de la EDAR Llocnou d'En Fenollet (Valencia)
- Estudiar el efecto de germinación y crecimiento de la aplicación de fango en 3 diferentes especies de plantas *Brassica rapa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens* según la metodología normalizada descrita en la OECD Guideline 208.
- Estudiar el efecto en la reproducción y crecimiento de la aplicación de fango en 2 diferentes especies de artrópodos y anélidos: *Folsomia candida*, *Enchytraeus crypticus*.
- Procesar los resultados obtenidos mediante el software ETX 2.0.
- Determinar la relación concentración - efecto (PNEC), determinar la dosis de exposición (PEC) y caracterizar el riesgo (PEC/PNEC)
- Comparar los resultados obtenidos con otros estudios similares.

2. Materiales y métodos

La calidad agronómica del compost producido se valorará mediante el uso de los siguientes bioensayos: *Brassica rapa* (OECD Guideline 208), *Lolium perenne* (OECD Guideline 208), *Trifolium repens* (OECD Guideline 208), *Folsomia candida* (ISO 11267), *Enchytraeus crypticus* (ISO 16378)

Para valorar el efecto de la aplicación del compost en *Brassica rapa*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens* se ha seguido la metodología normalizada descrita en la OECD Guideline 208 (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2003).

Estas 3 especies de plantas han sido seleccionadas por ser especies accesibles, de manipulación sencilla y fácilmente reproducibles.

A continuación se resumen las características de cada especie:

Brassica rapa: es una hierba anual de la familia de las crucíferas o brasicáceas de flor amarilla. Mide de 30 cm a 100 cm de alto. Sus hojas inferiores son verdes, cubiertas de pelos ásperos, pinnatipartidas y con el lóbulo terminal más grande que los laterales, mientras que las superiores son de color verde azulado, no tiene pelos, y sus entrantes son menos profundos en el margen.

Lolium perenne: se trata de una gramínea perenne de importancia en la creación de céspedes y en la reproducción de forrajes en lugares de clima templado y subtropical. Sus hojas son de color verde oscuro y brillante.

Trifolium repens: es una especie herbácea perenne. De porte rastrero, alcanza una altura de 10 cm. Su hábito estolonífero hace de ella una leguminosa de excelente adaptación al pastoreo en zonas templadas de todo el mundo. Se propaga por estolones y semillas (Lloret et al., 2013).



Imagen 1. *Brassica Rapa*: Fuente: Herbari Virtual, Departamento de Biología, Universidad de las Islas Baleares.



Imagen 2. *Lolium perenne*. Fuente: Herbari Virtual, Departamento de Biología, Universidad de las Islas Baleares.



Imagen 3. *Trifolium repens*. Fuente: Herbari Virtual, Departamento de Biología, Universidad de las Islas Baleares.

Para valorar el efecto del compost sobre la reproducción se ha elegido una especie de anélido *Enchytraeus crypticus* y una especie de artrópodo *Folsomia candida*. Estas 2 especies fueron cedidas por el CREAM de Barcelona (Centre de Recerca Ecològica y Aplicacions Forestal)

-*Enchytraeus crypticus* pertenece al grupo de oligoquetos de entre 1 mm y 5 cm de longitud, de coloración blanca, con un tiempo estimado de generación de 20 días, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Son de tipo detritívoro, alimentándose de plantas en descomposición y minerales del suelo que son ingeridos en cantidades proporcionales a su disponibilidad (Römke, 2003).



Imagen 4. *Enchytraeus crypticus*. Fuente: Facultad de ciencias de la Universidad de Amsterdam VRIJE.

-*Folsomia candida* (colémbolos) es una especie de artrópodo abundante en los suelos con alto contenido en materia orgánica. Son un grupo de insectos pequeños, con una longitud de entre 1,5 y 3,0 mm en estado maduro de coloración blanca o ligeramente amarillenta. Su población consiste exclusivamente en hembras partenogénicas que necesitan entre 20 y 24 días para alcanzar la madurez sexual y una temperatura óptima de 21°C para la eclosión de los huevos tras 12 días. Su fecundidad puede verse alterada por una sobrepoblación (>1 animal/cm), por la producción de feromonas, por la contaminación del sustrato, etc., existiendo diversas vías de exposición, desde el agua y aire, hasta el alimento y superficies contaminadas por donde se mueven. (Fountain, 2004)



Imagen 5. *Folsomia candida*. Fuente: Artículo científico (Gardi, C, 2008) Evaluation of the environmental impact of agricultural management practices using soil microarthropods.

2.1 Metodología experimental

Los materiales de partida para el desarrollo de los ensayos, así como las concentraciones de estudio, las especies utilizadas y el número de repeticiones, se resumen en la tabla 2.

Para el desarrollo de los bioensayos se han habilitado dos estufas de incubación de 698 L y 180 L de volumen. Con iluminación temporizada en la incubadora de las plantas para el desarrollo de los fotoperíodos según la metodología específica de cada bioensayo.

Tabla 2. Metodología experimental desarrollada

EDAR	Ensayo	Concentración de trabajo (g de compost/ Kg de suelo)	Réplica
Llocnou d'En Fenollet	<i>Trifolium repens</i>	0	5
	<i>Brassica rapa</i>	1	5
		10	
		100	
	<i>Lolium perenne</i>	1000	5
	<i>Folsomia candida</i>	0	3
	<i>Enchytraeus crypticus</i>	2,5	3
		5	
		10	
		25,1	
63,1			
158,4			
398,1			
700			
1000			

2.2 Procedimiento de la aplicación del suelo y compost en *Enchytraeus crypticus*

El cultivo madre se desarrolló en una mezcla de turba y arena que primeramente se debía de autoclavar. Se utilizaron placas Petri de plástico de 150x20 mm y una estufa de incubación a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Dos veces por semana se alimentaba el cultivo con copos de avena que se iban poniendo dentro del sustrato, y a los 2 días posteriores, se retiraba la avena restante para evitar la formación de hongos. Además se regaban con agua destilada cada 3 días dependiendo de las necesidades del cultivo para mantener la humedad. La finalidad de estos cultivos fue obtener suficientes individuos para los ensayos de toxicidad.

Una vez obtenidos suficientes individuos se procedía a su extracción. Para este proceso, se añadió en un punto concreto alimento, acumulando los individuos y recogiendo estos con pinzas entomológicas blandas y colocándose en placas Petri con agua destilada para la eliminación de huevos adheridos y la selección de adultos. Los ensayos se realizaron en placas Petri de 60x15 mm siguiendo las indicaciones del protocolo estandarizado ISO 16387:2004. Para cada una de la réplicas de los ensayos se añadieron una mezcla de 30 g de suelo y compost con dosis crecientes del mismo (Tabla 2).

En cada una de las réplicas se introdujeron 10 de estos anélidos, manteniendo las mismas condiciones de aireación, luminosidad y alimentación que en los cultivos madre.

Pasados 28 días, tiempo suficiente para que los individuos dieran lugar a la primera generación, se procedió al recuento de individuos.

Para esta ocasión se utilizó alcohol al 75% y colorante azul (azul de metileno) para que facilitara el conteo.



Imagen 6. *Enchytraeus crypticus*. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.



Imagen 7. *Enchytraeus crypticus* con azul de metileno. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.

2.3 Procedimiento de la aplicación del suelo y compost en *Folsomia candida* (Colémbolos)

Los cultivos madre de *Folsomia candida* se desarrollaron en una mezcla de sustrato de 1 cm de grosor de carbón vegetal, arena y yeso, en placas Petri 150x20 mm con un volumen suficiente para una total humectación del mismo. El motivo del uso del carbón vegetal, fue para absorber los gases residuales y productos de excreción de los organismos y, al mismo tiempo, su color negro facilitó la observación tanto de los huevos como de los colémbolos dado su coloración blanca.

A estos cultivos se le añadió algunos miligramos de levadura seca granulada y se mantuvieron en condiciones de oscuridad y temperatura constante de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, aireándolos dos veces por semana y añadiendo comida semanalmente.

El sustrato se fue renovando y se transfirieron unos cuantos individuos a nuevos sustratos para reducir la densidad de los mismos y evitar de ese modo el exceso de población que puede ocasionar una disminución de la puesta de huevos. Para la realización de los test de reproducción se utilizaron placas Petri de 10 cm de diámetro siguiendo el protocolo ISO11267:1999 con 30 g de la mezcla suelo - compost para tener aproximadamente 1 cm de grosor en cada placa. Se introdujeron 10 individuos a cada recipiente. Se añadieron 2 mg de levadura en la superficie y se le volvió a añadir 14 días más tarde. Los cultivos se mantuvieron durante 28 días en temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, en condiciones de oscuridad, aireados 2 veces a la semana y quitando la posible aparición de hongos. Durante este tiempo los individuos alcanzaron su madurez sexual y produjeron descendencia.

Transcurridos 28 días se procede al conteo, en esta ocasión se utilizó un método diferente. Con vasos de precipitados llenos de agua, se les añadió el colorante azul. Posteriormente se vuelca el contenido de una placa Petri de *Folsomia* en el vaso, por lo que el sustrato se queda en el fondo y los organismos de *Folsomia* en la superficie, y gracias al color oscuro del agua se pueden observar bien los organismos. Para que fuera más fácil y rápido el conteo, se utilizó el programa Fiji©, una versión del IMAGE J, gracias a esta aplicación de análisis de imagen que permite sacar el número de individuos mediante una foto.

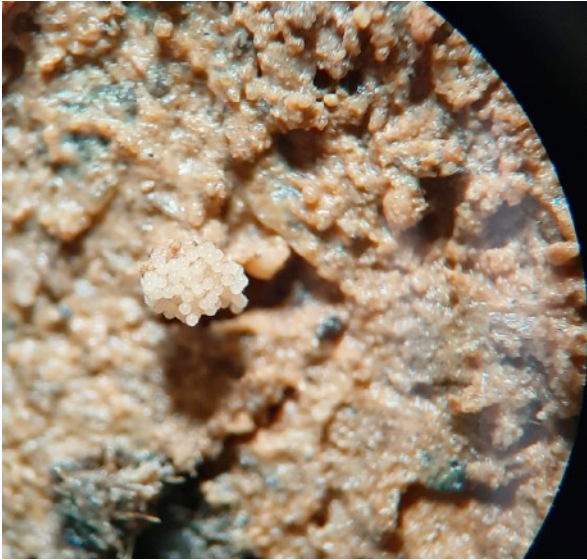


Imagen 8. Huevos de *Folsomia candida*. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.

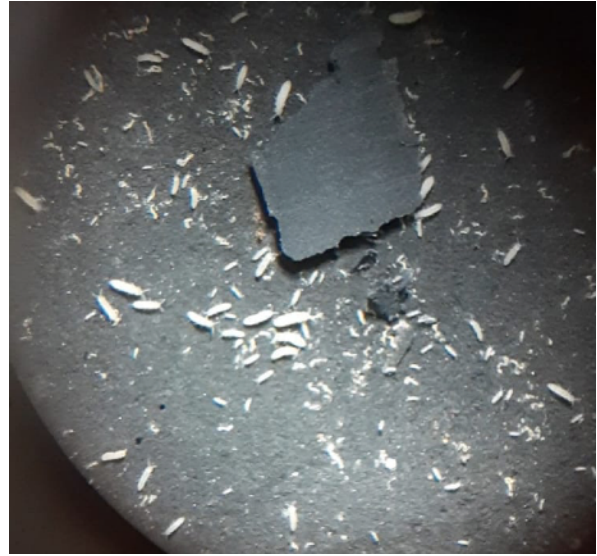


Imagen 9. *Folsomia candida* en placa madre. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.

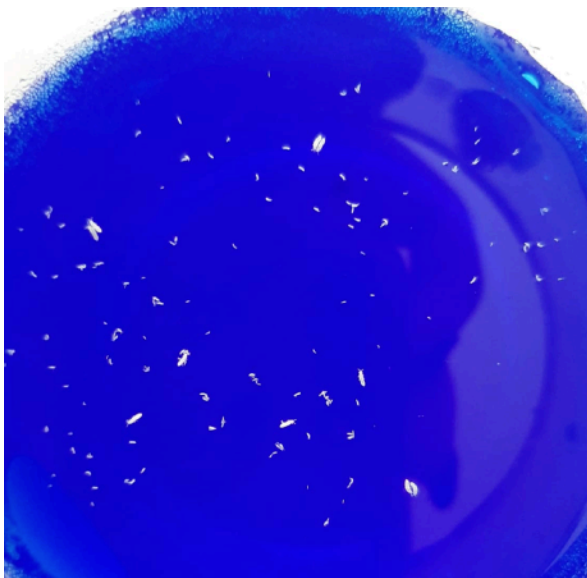


Imagen 10. *Folsomia* en azul de metileno. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.



Imagen 11. *Folsomia* después de binarizar la imagen con Fiji©. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.

2.4 Procedimiento de la aplicación de compost y suelo en las plantas

Cada una de las réplicas se ha desarrollado en una maceta con un volumen de 250 ml con 100 gramos de las diferentes mezclas suelo-compost (Tabla2).

Primeramente, se preparaban las diferentes mezclas utilizando una balanza digital de laboratorio, una vez hechas todas las mezclas se introducen en las macetas correspondientes.

En cada réplica de cada planta se añadieron 10 semillas y se regó por primera vez. Posteriormente se introdujeron en la incubadora, manteniendo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La temperatura de incubación durante los periodos de luz fue de 15°C y durante los periodos de oscuridad de 21°C manteniéndose una humedad relativa de 70%.

Una vez germinaron el 50% de las plantas, que fue a los pocos días se mantuvieron en cada réplica 5 de esas semillas, descartando el resto.

Cada dos días se abría en la incubadora para regar las macetas con 5 ml de agua cada una.

Transcurridos 28 días se procedió a la medida del tallo de las semillas germinadas .



Imagen 12. *Trifolium repens*. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.

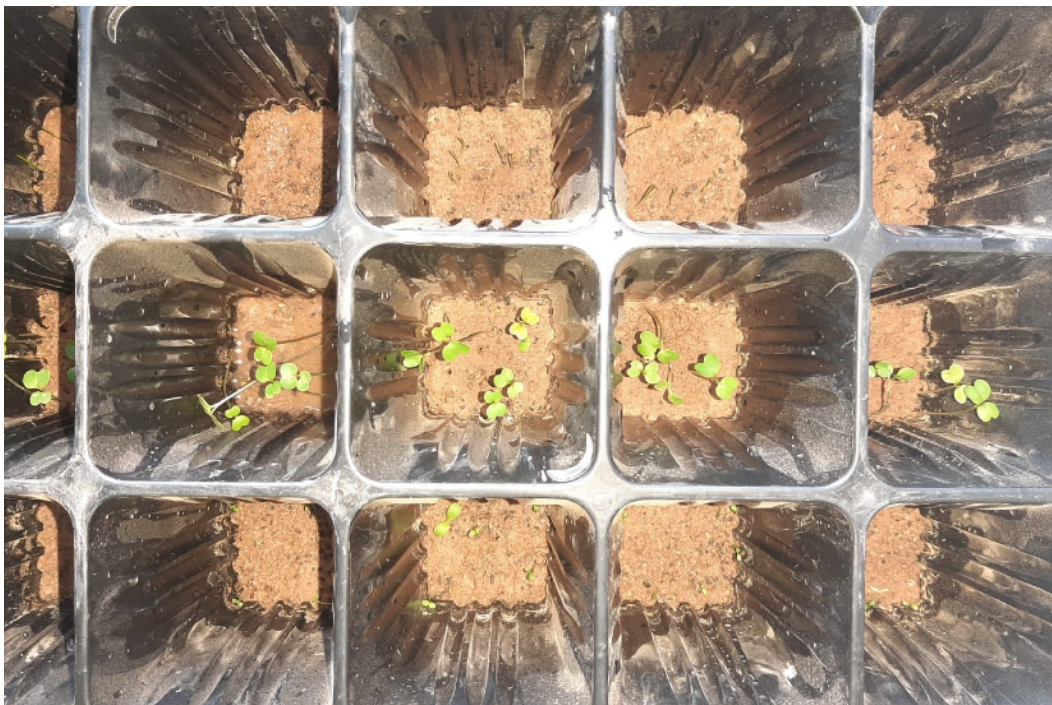


Imagen 13. *Brassica rapa*. Fuente: Fotografía tomada durante los ensayos.

3. Resultados

3.1 Resultados de *Enchytraeus crypticus*

Los resultados obtenidos en los bioensayos con *Enchytraeus* se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Resultados de ensayos en *Enchytraeus*

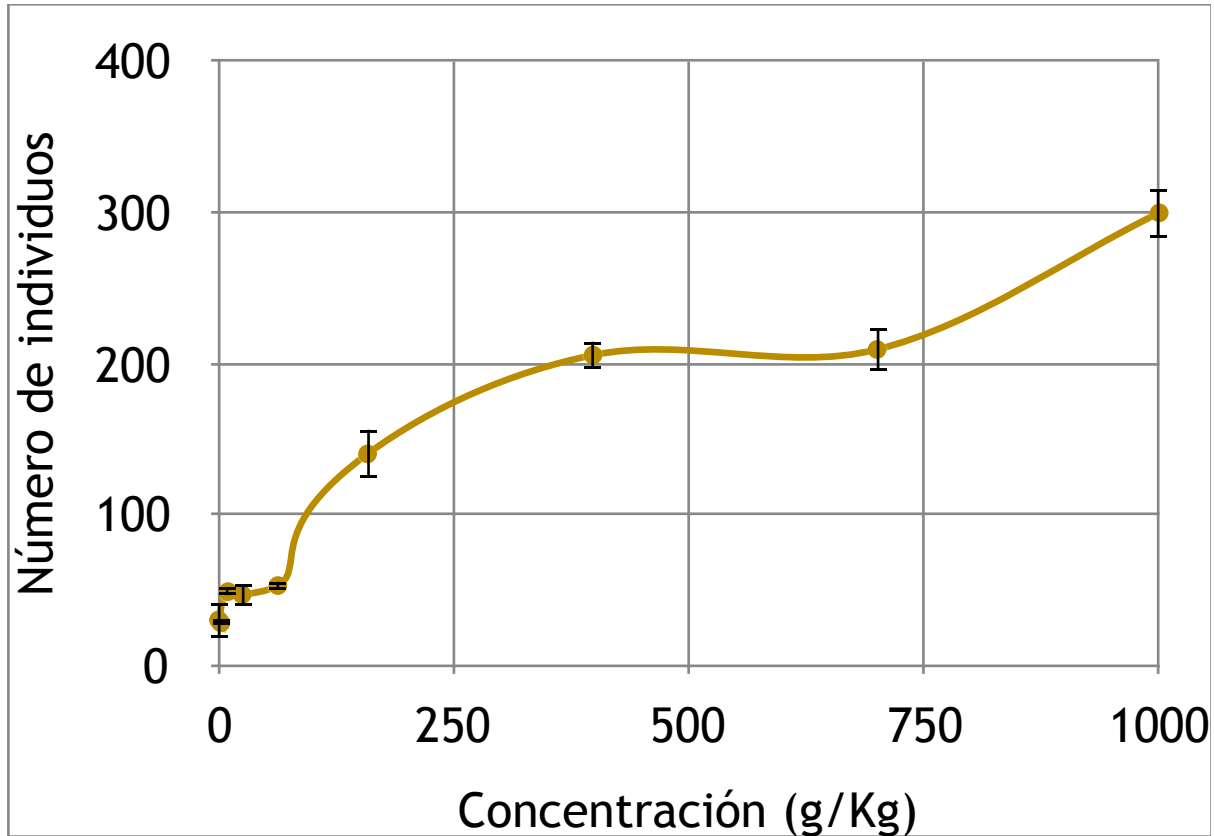
Concentración(g/kg)	Número de individuos de <i>Enchytraeus</i> en Réplicas		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	20	26	46
2,5	28	31	27
10,0	45	52	51
25,1	40	45	57
63,1	56	58	52
158,4	121	160	140
398,1	197	218	202
700,0	228	193	207
1000	320	297	282

Tabla 4. Número de individuos medio en *Enchytraeus*

Concentración (g/Kg)	Especie <i>Enchytraeus cripticus</i>	
	Nº de individuos medio	Desviación típica
0	31	11
2,5	29	2
10,0	49	3
25,1	47	7
63,1	55	2
158,4	140	16
398,1	206	9
700,0	209	14
1000,0	300	16

Cómo se puede observar en las tablas, hay un aumento del crecimiento y de la reproducción en las especies expuestas a las dosis mayores de concentración compost/suelo, hasta el punto de tener 10 veces más individuos con la concentración máxima de 1000 (g/Kg) que a la concentración 0 (g/Kg).

A continuación se muestran los resultados de las diferentes réplicas en la representación de gráficas, reproducción de individuos de *Enchytraeus* en el eje de las abscisas y la concentración del compost de estudio en el eje de las ordenadas.



Gráfica 1. Representación gráfica de la media de *Enchytraeus crypticus* junto con la desviación típica.

Como se observa claramente en la gráfica, hay una tendencia creciente. A mayor concentración mayor número de individuos. Siendo los valores más bajos hasta la concentración 63,1 (g/Kg) y viendo cómo a partir de ahí empieza a subir el número de individuos. Coincidiendo con una pequeña bajada con la concentración 700 (g/Kg).

3.2 Resultados de *Folsomia candida*

A continuación se muestran los resultados obtenidos en *Folsomia* en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados de ensayos en *Folsomia*

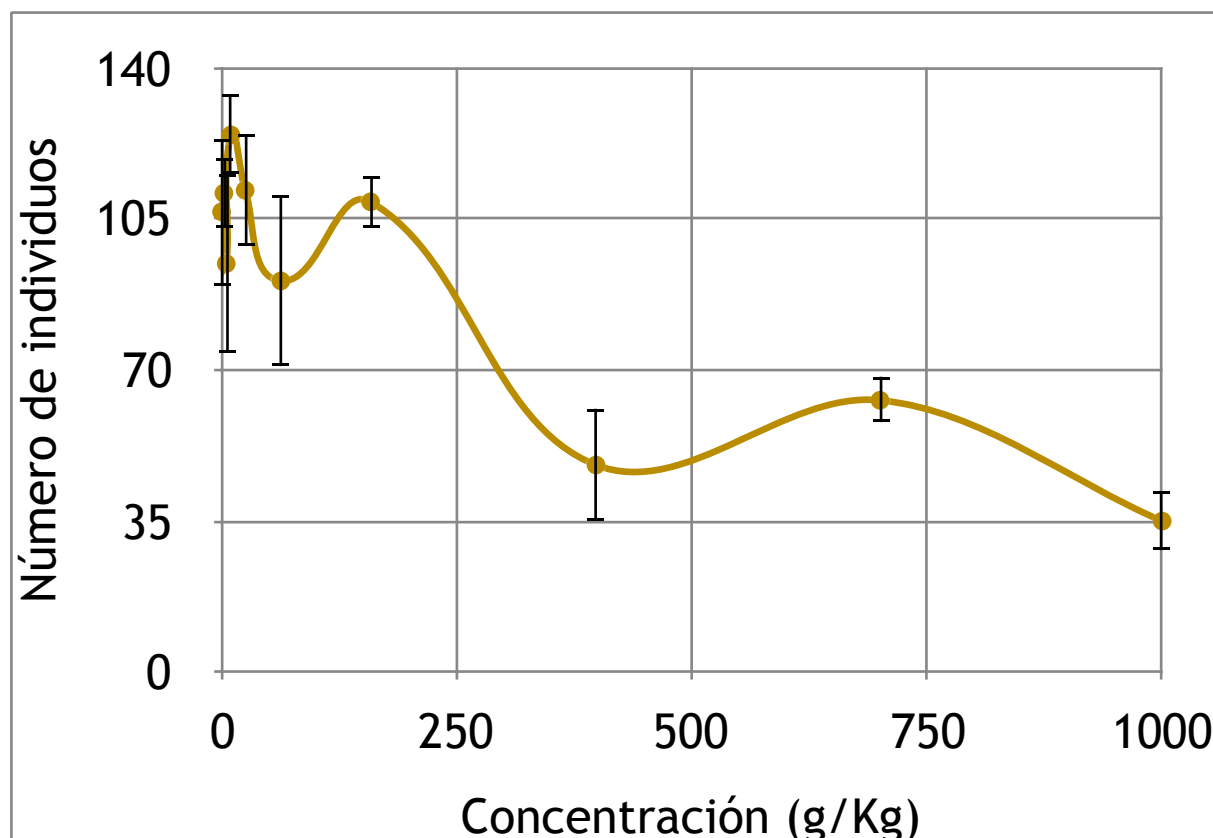
Concentración(g/kg)	Número de individuos de <i>Folsomia</i>		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	92	100	90
2,5	120	114	100
5,0	121	93	70
10,0	127	120	113
25,1	100	130	105
63,1	77	120	75
158,4	117	101	110
398,1	32	48	66
700,0	57	62	70
1000,0	42	37	26

Tabla 6. Número de individuos medio en *Folsomia*

Concentración (g/Kg)	Especie <i>Folsomia</i>	
	Nº de individuos medio	Desviación típica
0	107	17
2,5	111	27
5,0	95	21
10,0	125	9
25,1	112	13
63,1	91	21
158,4	109	28
398,1	48	16
700,0	63	5
1000,0	35	7

Por otra parte, se puede ver que los resultados obtenidos de *Folsomia* contrastan con respecto al *Enchytraeus crypcitus*, en donde se muestra una disminución del número de individuos con el aumento de la concentración del compost en el suelo.

A continuación para una mejor visualización, se muestran los resultados de la media de individuos junto con las barras de la desviación típica en la representación de gráficas, número de individuos de *Folsomia* en el eje de las abscisas y la concentración del compost de estudio en el eje de las ordenadas.



Gráfica 2. Representación de la media de individuos de *Folsomia candida* junto con la desviación típica

Como se puede observar en la gráfica 2 en general hay una clara disminución del número de individuos a medida que aumenta la concentración. Teniendo un pico de subida coincidiendo con la concentración 158,4 (g/Kg), y en la concentración 700 (g/Kg) también vuelve a ver otro pico de subida, pero claramente el valor más bajo de número de individuos coincide con la concentración más alta 1000 (g/Kg).

Como también se puede observar gracias a la gráfica, los valores de la desviación típica en la especie *Folsomia*, son mayores que en el *Enquitreus*, esto se puede deber a pequeños fallos en el conteo con el programa.

3.3 Resultados en plantas

Por su parte los resultados obtenidos en plantas se muestran en las tablas 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tabla 7. Resultados de ensayos en *Brassica rapa*

Concentración (g/kg)	Crecimiento de plantas (cm)				
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5
0	4,7	4,7	4,7	4,9	4,7
1	3,7	3,6	3,5	3,8	3,6
10	4,9	4,7	4,8	4,7	4,6
100	8,1	8,2	8,1	7,8	7,8
1000	12,8	12,5	12,9	14,0	14,1

Tabla 8. Resultados de ensayos en *Trifolium repens*

Concentración(g/kg)	Crecimiento de plantas (cm)				
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5
0	0	0	0	0	0
1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
10	1,5	1,7	1,5	1,6	1,7
100	2,4	2,8	2,6	2,7	2,7
1000	5,2	5,4	5,3	5,3	5,8

Tabla 9. Resultados de ensayos en *Lolium perenne*

Concentración(g/kg)	Crecimiento de plantas (cm)				
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5
0	11,5	11,9	11,7	11,7	11,7
1	17,8	17,8	17,8	17,8	17,9
10	23,8	23,5	24,2	24,2	24,7
100	21,8	21,5	21,1	21,1	21,8
1000	29,7	29,6	29,9	30,3	30,4

Tabla 10. Crecimiento medio de *Brassica rapa*

Concentración(g/kg)	Crecimiento medio (cm)	Desviación típica
0	4,7	0,10
1	3,6	0,13
10	4,2	0,10
100	8,0	0,15
1000	13,3	0,64

Tabla 11. Crecimiento medio de *Trifolium repens*

Concentración(g/kg)	Crecimiento medio (cm)	Desviación típica
0	0	0
1	0,2	0,03
10	1,6	0,09
100	2,6	0,11
1000	5,4	0,19

Tabla 12. Crecimiento medio de *Lolium perenne*

Concentración(g/kg)	Crecimiento medio (cm)	Desviación típica
0	11,7	0,12
1	17,8	0,06
10	24,1	0,42
100	21,5	0,30
1000	29,9	0,32

Como se puede observar en la mayoría de las concentraciones de compost/suelo hay un aumento del crecimiento de las especies con las dosis mayores aplicadas, llegando a tener un crecimiento nulo en el caso de *Trifolium* para la concentración 0.

4.Determinación de la relación concentración - efecto (PNEC)

PNEC (Predicted no-effect concentración) es la concentración por debajo de la cual no se espera que un ecosistema sufra un daño inaceptable, de acuerdo con un nivel de efecto aceptable predefinido (LCx, NOEC, ECx) en diferentes organismos (Domene, X, 2007).

En este estudio se han utilizado los valores de EC₁₀ (concentración efectiva que inhibe un 10% el parámetro de estudio) para el cálculo del PNEC (Tabla 12).

Los valores de EC₁₀ se obtuvieron a partir de la representación gráfica de los valores del parámetro de estudio, reproducción de individuos para la fauna, en el eje de las abscisas y la concentración del compost de estudio en el eje de las ordenadas y mediante la ecuación de la línea de tendencia.

Como se puede observar en las tablas 4, 6, 10, 11 y 12 los únicos organismos que se vieron afectados en la reproducción fue *Folsomia candida*. Por lo que no se calcularon los valores EC₁₀ para los Enquitreidos ni para las plantas ya que ni la reproducción ni el crecimiento se vieron efectos adversos.

Tabla 13. Ec₁₀ en *Folsomia*

Réplica	<i>Folsomia candida</i> Ec ₁₀ (g/Kg)
Réplica 1	309,98
Réplica 2	267,32
Réplica 3	261,18

Una vez realizados los cálculos para la obtención de los valores de EC₁₀ para los ensayos de *Folsomia*, estos se procesaron mediante el software ETX 2.0 para obtener la curva de distribución de *Folsomia* y la concentración del compost que no tiene efecto perjudicial para el 95% de la especie, siendo este valor el PNEC.

En la imagen 14 se muestra la curva de distribución obtenida, donde se puede observar la fracción de la población afectada en función de su concentración.

SSD graph

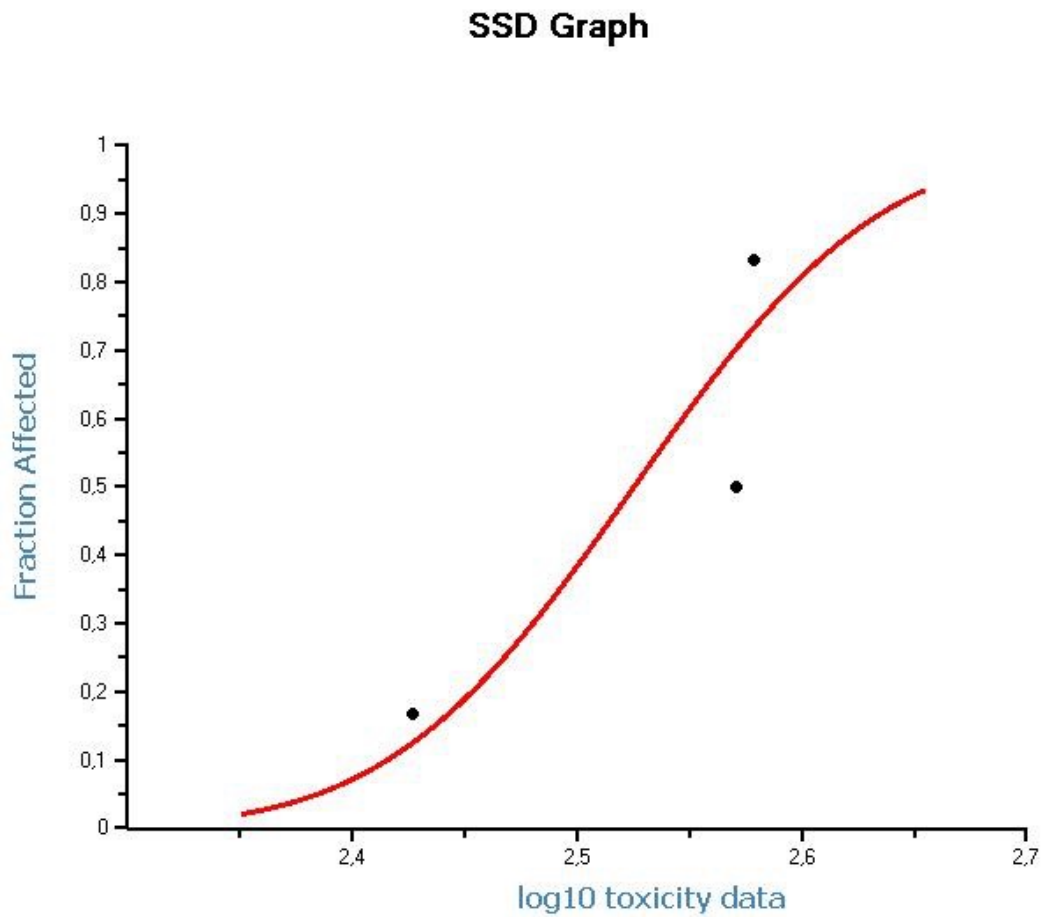


Imagen 14. Distribución de la especie *Folsomia*. Fuente: Programa ETX2.0.

5. Determinación de la dosis de exposición (PEC) y caracterización del riesgo (PEC/PNEC)

Para la estimación del valor de PEC (Predicted Environmental concentrations) se consideró un suelo con una capa arable de 25 cm y una densidad de 2500 kg/m³. La dosis compost de EDAR es de 45 Tn de compost /Ha de suelo, siendo este el valor estimado para PEC

La determinación del riesgo (RQ) se determina mediante la comparación de los valores PEC frente a los valores PNEC (Tabla 14). Si el cociente de riesgo es menor que 1 se asume que el riesgo del compuesto para el medio ambiente es bajo. Si por el contrario, RQ es mayor que 1 es probable que el uso de la sustancia tenga asociado un riesgo ambiental y, por lo tanto se requieren más ensayos.

Tabla 14. Clasificación de riesgo ambiental según el RQ

Riesgo	RQ (PEC/PNEC)
Alto	>10
Moderado	1-10
Bajo	<1

A partir de los resultados experimentales se obtuvieron las PNEC y los cocientes de riesgo que se recogen en la tabla 15.

Tabla 15. Cocientes de riesgo para la EDAR de estudio

HC ₅ (log ₁₀)	2,3
HC ₅ (g/Kg)	199,5
PNEC (Tn/Ha)	1246,8
PEC (Tn/Ha)	45
RQ= PEC/PNEC	0,03
Aplicable en agricultura	Sí

6. Discusión

Los valores obtenidos en los bioensayos muestran cómo el compost de estudio de la EDAR de Llocnou es apto para el uso agrícola. Según los resultados obtenidos, se podrían agrupar en dos grupos diferentes.

Por un lado, los resultados obtenidos para la especie *Enchytraeus crypticus* y las plantas, en donde no se ha observado ningún efecto negativo en las especies, ni para la reproducción ni para el crecimiento del tallo en el caso de las plantas, con estos resultados se interpreta que la calidad del compost es muy buena por lo que no resulta perjudicial ni para la especie *Enchytraeus* ni para las plantas de estudio.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la especie *Folsomia*, en donde se observó según los bioensayos que sí se producía un efecto negativo en la especie, ya que disminuía el número de individuos a medida que aumentaba la concentración del compost. Por lo que, en esta especie se ha calculado la Ec_{10} y procesado mediante el software ETX 2.0. En donde el valor PNEC ha dado muy alto con el cociente de riesgo muy por debajo de 1, descartando la posible afección del compost sobre las especies, por lo que el compost obtenido puede ser utilizado en la agricultura incluso a concentraciones muy superiores a las actuales. Este resultado en *Folsomia* está de acuerdo con los anteriores obtenidos para *Enchytraeus* y las plantas.

A partir del análisis y discusión de los resultados obtenidos en este estudio y en comparación con otros estudios similares como por ejemplo:

Lloret *et al.*, (2013) en donde se estudió la ecotoxicidad de fangos deshidratados de EDAR mediante bioensayos para determinar su aplicación agrícola, en donde se utilizaron para los ensayos las especies de *Enchytraeus* y las mismas especies de plantas que en este estudio. En este caso se estudió el fango de 3 EDAR valencianas, Fontanars del Alforins, L'Alcudia- Benimodo e Ibi en L'Alcoià. Los fangos de Ibi y L'Alcudia - Benimodo se seleccionaron debido a las altas concentraciones de metales pesados que presentaban. Por el contrario, el fango de la EDAR de Fontanars del Alforins cumple con las exigencias para las concentraciones de metales pesados y fue utilizado como control positivo (Lloret *et al.*, 2013).

Los resultados de este estudio sí que tuvieron efectos negativos en todas las especies, hasta el punto que la EDAR de Ibi, de acuerdo a los bioensayos realizados en el fango no sería apto para la agricultura. Por otro lado las EDAR de

Fontanars del Alforins y L'Alcudia - Benimodo, tuvieron resultados positivos, como la cantidad de fango que podría aplicarse sin que hubiera riesgo para el suelo sería mucho mayor que la que recoge la legislación, es decir, estos dos fangos si que son aptos para la agricultura.

A continuación se muestra los resultados del estudio de los bioensayos en la EDAR de Ibi, en donde se puede ver el gran efecto negativo que tuvo el fango sobre las especies.

Tabla 16. Resultados de bioensayos para *Enchytraeus crypticus* en la EDAR Ibi

Concentración de fango (g/Kg)	Número de individuos medio	Desviación típica
0	178,33	1,53
25	22	2,65
398	0	0
700	0	0
1000	0	0

Tabla 17. Resultados de bioensayos para plantas en la EDAR Ibi

Concentración de fango (g/Kg)	<i>Brassica rapa</i>		<i>Lolium perenne</i>		<i>Trifolium repens</i>	
	Crecimiento medio (cm)	Desviación típica	Crecimiento medio (cm)	Desviación típica	Crecimiento medio (cm)	Desviación típica
0	10,6	0,34	14,96	0,1	10,04	0,53
100	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0

En la tabla 18 se muestra el cociente de riesgo de la depuradora de Ibi.

Tabla 18. Cociente de riesgo para la EDAR de Ibi

RQ= PEC/PNEC	Aplicable en agricultura
2,30	No

En el estudio previamente mencionado también se utilizó el programa ETX 2.0 para la obtención de datos.

Otro estudio parecido, (Lloret *et al.*, 2015) y en el que se utilizó parte de los resultados del mencionado anteriormente, se llevaron a cabo bioensayos para evaluar la calidad agronómica del digestivo deshidratado procedente del proceso de codigestión. Se realizaron los bioensayos para varias EDAR: Ontinyent, Quart - Benàger, Utiel y Gandía - La Safor, estas 4 EDAR se compararon con la EDAR Fontanars del Alforins siendo esta empleada como blanco, ya que esta instalación no es objeto de procesos de codigestión.

Los resultados obtenidos en los bioensayos si que mostraron efectos adversos tanto en la reproducción de individuos como en el crecimiento de las plantas, a pesar de esto, los resultados para la caracterización del riego fueron todos inferiores a 1, por lo que el digestato de todas las EDAR era apto para su uso agrícola.

A continuación se muestra los resultados del estudio de los bioensayos de las especies de *Enchytraeus* y *Folsomia* en la EDAR de Gandía-La Safor, en donde se puede ver el efecto negativo que tuvo el digestato sobre las especies.

Tabla 19: Resultados del estudio para la EDAR Gandía-La Safor.

Concentración digestato (g/kg)	<i>Enchytraeus crypticus</i>		<i>Folsomia candida</i>	
	Número de individuos medio	Desviación típica	Número de individuos medio	Desviación típica
0	84,00	2,00	109,00	1,00
2,5	83,33	11,72	115,33	5,03
5,0	98,00	10,00	122,67	6,11
25,1	88,67	3,06	124,00	7,55
63,1	83,33	1,15	117,33	10,26
158,4	77,33	6,43	96,33	5,51
398,1	73,67	4,04	88,67	7,57
700,0	67,00	3,61	79,67	4,04
1000,0	29,33	25,58	59,67	8,50

En la tabla 20 se muestra el cociente de riesgo de la EDAR de Gandía-La Safor.

Tabla 20: Cociente de riesgo para la EDAR Gandía-La Safor

RQ= PEC/PNEC	Aplicable en agricultura
0,1	Si

7. Conclusiones

Gracias a los bioensayos realizados, y a los resultados obtenidos, una de las conclusiones de este estudio, es que la calidad del compost es tan buena que no hay efecto negativo en las especies, en el caso de *Encytraeus crypticus*, *Brassica rapa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*. Las diferencias podrían venir por la granulometría del suelo o por la concentración de nitrógeno, ya que a una cantidad muy grande de compost aumentaría la concentración de nitrógeno, hasta llegar a un nivel que desde un punto de vista agronómico esto no es bueno, dado que el nivel máximo de nitrógeno en un suelo franco, en los primeros 45 cm del perfil explorado por las raíces, no debería pasar de 58,5 kilos por hectárea (Lahoz *et al.*, 2006).

Y en el caso de la *Folsomia* en donde sí se apreció un efecto negativo, se ha obtenido la dosis de aplicación que no presentaría efectos negativos para un 95% de los organismos, tomando este valor como la dosis de compost que no tiene efectos negativos para el suelo (PNEC), siendo este valor elevado y mucho mayor del que se utiliza normalmente (Lloret *et al.*, 2015). Este valor del (PNEC) se ha comparado con la dosificación real (PEC), determinando a partir de ambas el cociente de riesgo.

Por lo que se ha llegado a la conclusión que, con el cociente de riesgo inferior a 1 como se muestra en la tabla 15, el compost extraído de la EDAR de Llocnou d'En Fenollet en la cual se había trabajado con un nuevo coagulante de base natural para la eliminación del fósforo y así poder sustituir el cloruro férrico que tenía efectos negativos a la larga en las aguas a las que se vertía, sí que es apto para llevar al sector agrícola.

Se observa así que los bioensayos son una herramienta muy útil para evaluar el impacto de la adición de los compost al suelo. Para que la reutilización de estos cumpla con la normativa de calidad y así poder llevarlos al sector agrícola.

Bibliografía

(2020). *Newest, Eliminación del Fósforo*. Recuperado el 20 de abril de 2020, de Seryeco website: <https://www.lifenewest.eu>

Acevedo Juárez, B. (2016). Estudio y modelación matemática del cambio metabólico de las bacterias responsables de la eliminación biológica de fósforo en el tratamiento de aguas residuales (Doctoral dissertation).

Andreu Lahoz, J., Betrán Aso, J., Delgado Enguita, I., Espada Carbó, J. L., Gil Martínez, M., Gutiérrez López, M., ... & Pérez Berges, M. (2006). Fertilización nitrogenada: guía de actualización.

Domene, X. (2007). Methodologies using soil organisms for the ecotoxicological assessment of organic wastes. Universitat Autònoma de Barcelona,.

del Estado, J. (1995). Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. *BOE de*, 30.

Fountain, M. T., & Hopkin, S. P. (2004). Biodiversity of Collembola in urban soils and the use of *Folsomia candida* to assess soil 'quality'. *Ecotoxicology*, 13(6), 555-572

International Organization for Standardization. (1999). Soil quality: Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. International Organization for Standardization.

ISO. (2004). Soil Quality Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) Determination of Effects on Reproduction and Survival. *Guideline*, 16387.

Lloret,S., Sanchis Pla, J., Fajardo,V., Zorrilla, F., Andrés, F., Cañigral,C., y Bernácer,I.(2013).Estudio de la ecotoxicidad de fangos deshidratados de EDAR mediante bioensayos normalizados para determinar su aplicación agrícola

Lloret,S., Sanchis Pla, J., Rojo,P., Fajardo,V., Zorrilla, F., Garcia Lopez,I., Cañigral,C., Roca,V y María Santos,J.(2015).Valoración de la calidad agronómica del digestivo deshidratado procedente del proceso de codigestión mediante bioensayos.

OECD. (2006). Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. *OECD-Organization for Economic Cooperation and Development*.

Urcola, L. L. (2012). Pasado, presente y futuro de tecnologías para la eliminación de nutrientes en EDAR.

Rombke, J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: a review. *Pedobiologia*, 47(5/6), 607.