

Universidad Miguel Hernández de Elche



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Estudios de germinación y ensayos de ecotoxicidad con *Daphnia magna* de materiales orgánicos

TFG.GCA.MBACYAPG.EFS.220601

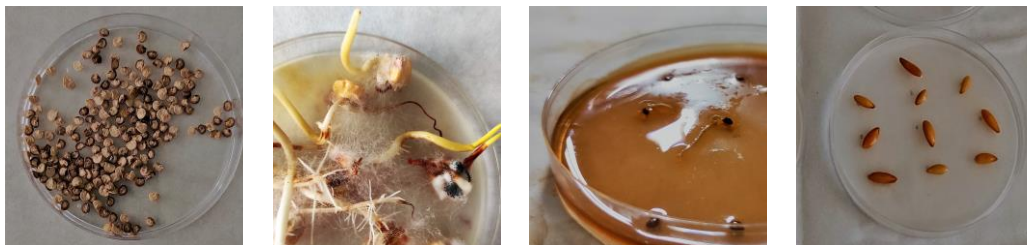


FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Ingeniería Química

Curso 2021-2022



Autor Esteban Flores Santamaría

Tutoras María Belén Almendro Candell
Ana Pérez Gimeno



CIENCIAS AMBIENTALES
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

RESUMEN

El crecimiento socioeconómico genera a su vez un crecimiento en el consumo, y como consecuencia de ello un aumento de los residuos generados, acumulándose la mayoría de estos en vertederos municipales, afectando al medio ambiente y a la salud humana. Parte de los residuos que se eliminan en vertedero son biorresiduos, es decir, materiales orgánicos con el potencial de ser reutilizados, fomentando así un modelo de economía circular. El objetivo del estudio realizado es comprobar la idoneidad de ciertos materiales orgánicos provenientes en su mayor parte de actividades relacionadas con el campo, previa caracterización de los mismos, con la finalidad de ser empleados como sustratos de cultivo. Para ello se diseñan unos ensayos de fitotoxicidad y ecotoxicidad, de manera que se reúnen datos de cómo afectan estos materiales a ciertas semillas de interés agronómico y de cómo pueden afectar cuando alcanzan cuerpos de agua como consecuencia de procesos de escorrentía y lixiviación tras su aplicación en el medio. A partir de los ensayos se obtiene que los materiales que mejores resultados ofrecen en cuanto a ecotoxicidad e índice de germinación (IG, indicador biológico ampliamente utilizado en ensayos con semillas), son el pino, el compost de lodo de depuradora y el compost comercial, siendo los recomendados para su empleo como sustratos de cultivo. Destaca el olivo por su elevada toxicidad tanto para los estudios de germinación como para el medio acuático.

Palabras clave: materiales orgánicos, índice de germinación (IG), fitotoxicidad, ecotoxicidad, *Daphnia magna*.

ABSTRACT

Socioeconomic development generates a growth in consumption and, as a consequence, an increase in waste generated, most of which accumulates in municipal landfills, affecting the environment and human health. Part of the waste disposed in landfills is bio-waste, i.e. organic materials potentially reusable, thus promoting a circular economy model. The objective of the research carried out is to check the suitability of certain organic materials coming mostly from activities related to the field, after characterizing them, in order to be used as growing media for crops. For this purpose, phytotoxicity and ecotoxicity assays are designed to gather data on how these materials could affect certain seeds of agronomic interest and how they can affect them when they reach water bodies as a consequence of runoff and leaching processes after their application in the environment. From the tests it was found that the materials with the best results in terms of ecotoxicity and germination index (GI, a biological indicator widely used in assays with seeds) are pine, sewage sludge compost and commercial compost, which are widely recommended as cultivation substrates. Olive stands out for its high toxicity both for germination studies and for the aquatic environment.

Key words: organic materials, germination index (GI), phytotoxicity, ecotoxicity, *Daphnia magna*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Agricultura y Materiales Orgánicos.....	5
1.3. Fitotoxicidad.....	9
1.4. Ecotoxicidad	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Búsqueda bibliográfica	14
3.2. Materiales Orgánicos.....	14
3.2.1. Caracterización de los materiales de estudio.....	14
3.3. Selección de semillas	15
3.4. Ensayo de fitotoxicidad	16
3.5. Ensayo de ecotoxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	19
3.6. Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Caracterización de materiales.....	21
4.2. Fitotoxicidad.....	23
4.3. Ecotoxicidad	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA	35
6.1. Referencias de internet	39
6.2. Figuras.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El crecimiento exponencial, e incluso vertiginoso cabría decir, tanto a nivel demográfico como económico que actualmente sucede a nivel global, suscita en el modelo económico lineal la generación desbordada de productos de consumo, cuyo final del recorrido suele ser la eliminación en vertedero y, por tanto, la conversión de lo que una vez fue de utilidad en un objeto inútil, considerado como residuo. La gran cantidad de actividades humanas genera, a su vez, una gran cantidad de objetos sin valor, o residuos de diversa índole, lo que conlleva la acumulación incontrolada en vertedero y con ello, la posibilidad de afección al medio ambiente y a la salud humana.

Ya en el año 1989, hablar de residuos significaba referirse a 11 tipos genéricos y a más de 45 subtipos (Valero Yáñez, 1989), mientras que ahora, según la Orden MAM/304/2002 de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos, estos se dividen en un total de 20 categorías, llamados capítulos, cada uno de los cuales se subdivide, a su vez, en una serie de más de 100 subcapítulos, clasificándose un residuo mediante un código de 6 cifras.

En la actualidad, a nivel mundial, la generación total de residuos sólidos municipales en el transcurso de 1 año se estima aproximadamente en 17 mil millones de toneladas, lo cual supone el 16% de los gases de efecto invernadero, emisiones atribuidas al calentamiento global (Awasthi *et al.*, 2022). En España, según el Instituto Nacional de Estadística (INE, 2021), las empresas gestoras recogieron 22,8 millones de toneladas de residuos urbanos en el año 2019, un 0,3% más que en 2018, destacando la recogida de 483,7 kilogramos de residuos urbanos por habitante. La recogida selectiva aumentó un 13,5%, hasta alcanzar los 5 millones de toneladas.

Con el objetivo de acercarnos cada vez más hacia un futuro sostenible, uno de los puntos a tener en cuenta es la recogida por tipos de residuos, es decir, la recogida selectiva, como se mencionaba con anterioridad. Este sistema de recogida incrementa el reciclaje y la reutilización y por consiguiente se disminuye la eliminación en vertedero. Otra alternativa que se puede aplicar como modelo de reutilización, es el empleo como recurso de materiales generados de actividades productivas, siempre y cuando se haya realizado un estudio que demuestre la idoneidad de estos, de manera que su ciclo de vida cambie de un modelo lineal, en el que se produce, se consume y por último se desecha, a un ciclo de vida circular. Como dijo De Burgos (1996), es necesario asimilar el concepto de residuo al de recurso, piedra angular en la que se basa el trabajo realizado.

Por tanto, una sociedad, junto con su marco económico, que adopta este concepto como modelo a seguir, progresa e invierte en su futuro, renovándose y evolucionando hacia un modelo de economía circular y

participando de forma activa en el cumplimiento de ciertos objetivos de desarrollo sostenible (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2015) (figura 1), como son:

- ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.
- ODS 12. Producción y consumo responsables.
- ODS 13. Acción por el clima.



Figura 1. Objetivos de desarrollo sostenible. Fuente: Organización de las Naciones Unidas, ONU (2015)

1.2. Agricultura y Materiales Orgánicos

La superficie agraria útil de España supone más de 23 millones de hectáreas, casi la mitad del territorio español, de las cuales aproximadamente 17 millones de hectáreas son de cultivo (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico [MITECO], s.f. a). Por tanto, una opción que brinda la posibilidad de cumplir con lo que comentaba De Burgos, evolucionando así hacia un modelo socioeconómico más sostenible, es emplear los materiales orgánicos obtenidos de la propia actividad agrícola y aprovecharlos como sustratos de cultivo, como por ejemplo, restos de poda, entre otros.

De hecho, el principio de todo sistema agrícola, ya sea sostenible o no, es un suelo fértil y saludable, lo cual puede llegar a obtenerse mediante estos materiales orgánicos, logrando así un doble propósito: la fertilidad del suelo y la reutilización de materiales. Esta doble finalidad, que puede suponer la mejora del recurso edafológico, es capaz de hacer frente al reto de mejorar la seguridad alimentaria a nivel global (Román *et al.*, 2013), uno de los objetivos prioritarios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2013).

Según un informe incentivado por dicha organización y realizado por un grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición, “un sistema alimentario sostenible es aquel que garantiza la seguridad alimentaria y la nutrición de todas las personas, de tal forma que no se pongan en riesgo las bases económicas,

sociales y ambientales de éstas para las futuras generaciones” (HLPE, 2014). Esto significa que siempre es rentable, beneficioso para la sociedad y tiene un impacto positivo o neutro en el medio ambiente.

Con la finalidad de alcanzar este sistema, la FAO propone la agricultura climáticamente inteligente, un modelo de agricultura que vela por cumplir con dichos objetivos de sostenibilidad que, mediante prácticas respetuosas con el medio, incrementa la productividad y la resiliencia y a su vez intensifica la disminución de emisiones de gases de efecto invernadero mediante el reciclaje de materiales orgánicos (Román *et al.*, 2013), fomentando, por tanto, un modelo de economía circular.

Así pues, estos materiales, que podrían haber sido residuos, ahora se convierten en recursos y suponen una valiosa fuente de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y otros macronutrientes y micronutrientes (Zubillaga *et al.*, 2008), elementos esenciales que desempeñan un papel decisivo en la nutrición de las plantas y pueden afectar al rendimiento de los cultivos cuando no están presentes en los niveles de concentración adecuados. Por tanto, la determinación de los elementos solubles es necesaria, ya que una vez incorporados al suelo van a ser asimilados por las plantas (Trevizan *et al.*, 2008).

De esta forma, los ahora denominados recursos, debido a sus características y su potencial de ser empleados como sustratos de cultivo, suponen un destino eficiente cuando se aplican al suelo, puesto que pueden proveer de bastantes beneficios, tales como el incremento de la materia orgánica en el mismo, la disminución del depósito en vertederos municipales y con ello, la reducción de metano producido en estos. Además, esta reutilización de materiales permite a su vez la sustitución de turba como sustrato, la absorción de carbono, el control de la temperatura edáfica y el incremento de la porosidad del suelo, siendo esto significativo para reducir el riesgo de erosión y la desertificación (Román *et al.*, 2013) (figura 2).



Figura 2. Procesos de erosión y degradación en la antigua huerta de Alicante, Monte Orgegia (2019). Fuente: elaboración propia.

Los materiales estudiados en este trabajo, que tienen la capacidad de poder ser empleados como sustratos de cultivo, son 7: pino, paja de cereal, sarmiento, olivo, palmera, compost de lodo proveniente de una estación depuradora de aguas residuales urbanas (EDAR) y compost comercial.

Según el anuario del año 2019 de estadística forestal (MITECO, 2021), España cuenta con 27.965.808 hectáreas de superficie forestal, lo que equivale al 55,3% del total del territorio. De todas estas hectáreas, el 36,3% corresponde a superficie forestal arbolada, representando el pino, independientemente de su especie, un 50% de esta superficie. Según Zapata *et al.* (2005), la corteza compostada de esta conífera es uno de los materiales más ampliamente utilizados como sustrato orgánico de aplicación al suelo y los cultivos. Sin embargo, este material por sí solo no reúne todas las condiciones necesarias para el crecimiento vegetal, por lo que es indispensable usarlo en mezcla con otros componentes, entre los cuales Zapata *et al.* (2005) sugieren compost de residuos urbanos, compost de lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y otros materiales de amplia disponibilidad.

Por otra parte, cuando todavía se trabajaba con animales de tiro, la paja de cereal resultaba un subproducto útil de los cereales. En la actualidad, con la mecanización y el incremento de la productividad, este material se convierte en un estorbo del que hay que deshacerse para poder sembrar, y una gran parte del gremio de agricultores opta por la quema controlada, ya que afirman que esta práctica provee de una serie de beneficios, pues contribuye al control de enfermedades y a eliminar semillas de malas hierbas. Sin embargo, las quemaduras sucesivas en un terreno propician con el tiempo la disminución de la materia orgánica del suelo, disminuyendo la fertilidad del mismo. Una alternativa para evitar que el suelo se vuelva improductivo es enterrar la paja, facilitando su descomposición y el reciclado de nutrientes, lo que contribuye a mantener el contenido de materia orgánica (Fombellida, 2010). Aun así, el hecho de que se mantengan los niveles de materia orgánica en los terrenos de cultivo no indica que se trate de un material beneficioso para la germinación de las semillas, por lo que su análisis fitotóxico es necesario.

Por otro lado, los sarmientos de poda suponen uno de los mayores retos para las regiones productoras de vino en España, dedicándose 966.442 hectáreas al cultivo de la vid (Organización internacional de la Viña y el Vino [OIV], 2019). Los sarmientos de poda constituyen el “residuo” más abundante de la viña y, debido a que su valor económico actual es bajo, normalmente se abandonan en la zona o se queman. Esta práctica implica la aparición de una fuente de contaminación ecológica y medioambiental, junto con una pérdida del valor intrínseco del sarmiento, que en caso de ser reutilizado, puede suponer una mejora en la calidad del vino y podría devolver a la vid los compuestos que sintetizó en su momento y que fueron usurpados al realizar la cosecha y las consecuentes podas (Sánchez, 2017).

Otro material de merecido estudio es el olivo, debido a que su cultivo para la producción de aceite de oliva tiene una gran influencia a nivel nacional, realizándose esta actividad en varias regiones de España, siendo Andalucía la comunidad autónoma con una mayor producción, contando con una superficie de 1,67 millones

de hectáreas dedicadas al olivo (MITECO, s.f. b). Según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2021), los principales países productores de aceite de oliva se encuentran en la Unión Europea (68,1%) representando España el 46,1%. Esta macroproducción genera una serie de desechos, entre los que destacan los restos de poda de los olivos y los alpechines, formados por las aguas residuales de las almazaras, con un elevado potencial contaminante. García (1999) contempla el problema de los alpechines con mayor detalle.

Para finalizar con los materiales de estudio no compostados, tenemos la palmera, destacando su cultivo en la localidad de Elche, sobre todo por su gran reconocido palmeral, declarado patrimonio de la humanidad en el año 2000 por la UNESCO, y que supone un paisaje creado artificialmente para transformar una tierra árida, regada por aguas salobres, en un terreno idóneo para una agricultura de tipo intensivo. Los huertos de palmeras resisten adecuadamente las aguas salobres del Vinalopó e históricamente se empleaban todos los materiales que estas plantas pudieran proporcionar. Los dátiles para alimentar a la población y a los animales, las palmas para la fabricación de capazos, esteras, escobas, y también como elemento de cubrición (techos de los porches) y el tronco se utilizaba como elemento de construcción o como mobiliario (bancos y mesas) (Ajuntament d'Elx, s.f.). Actualmente, las ingentes cantidades de restos de poda de las palmeras, tras ser trituradas o no, se emplean como material para producir compost o como enmienda orgánica para suelos de cultivo.

Los restantes materiales de estudio que quedan por comentar se tratan de dos tipos de compost, uno es comercial y el otro es compost de lodo, ambos, productos que se obtienen mediante el proceso de compostaje. Según el Real Decreto 865/2010, de 2 de julio, sobre sustratos de cultivo, se define el compostaje como el proceso controlado de transformación biológica aeróbica y termófila de materia orgánica con tendencia a biodegradarse, dando lugar a diversos tipos de productos orgánicos según su origen.

El compost de lodo proviene de los lodos de depuración de las aguas residuales urbanas, consistente en una mezcla de agua y sólidos, cuya composición es variable. Los tratamientos llevados a cabo, entre los que se encuentra el compostaje como última etapa, concentran la contaminación presente en el agua, y, por tanto, los lodos contienen amplia diversidad de materias suspendidas o disueltas. Algunas de ellas con valor agronómico (materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio y en menor cantidad calcio, magnesio y otros micronutrientes esenciales para las plantas), pero también elementos contaminantes como son metales pesados (MITECO, s.f. c). Los lodos, una vez obtenido el compost, pueden ser aplicados a los suelos agrícolas conforme a lo que establece el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario.

En lo referente al compost comercial, varía según el proceso industrial de fabricación que adquiere cada casa comercial. En su mayoría están compuestos por turba y restos vegetales.

Independientemente de su origen, todos los compost deben someterse a una evaluación de calidad, estabilidad y madurez, antes de su aplicación al suelo (Yuan *et al.*, 2018).

La estabilidad representa el grado en que un sustrato se descompone como consecuencia de la actividad microbiana, mientras que la madurez es un parámetro agronómico, asociado al efecto del compost en el crecimiento de las plantas (Komilis, 2015). El compost inestable y/o inmaduro puede tener efectos no beneficiosos sobre la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y el entorno del suelo debido a la disminución del suministro de oxígeno y/o nitrógeno disponible o a la presencia de compuestos fitotóxicos (Bernal *et al.*, 2009). Estos compuestos generan una serie de efectos nocivos, los cuales pueden manifestarse de varias maneras, entre las que destacan los contenidos de amonio, que en condiciones de calor y humedad se transforma a amoníaco, resultando tóxico para las plantas (Varnero *et al.*, 2007).

Otro problema generador de fitotoxicidad, independientemente de que se trate de un material compostado o no, es el bloqueo biológico de nitrógeno, conocido también con el nombre de “hambre de nitrógeno”. Esto sucede en el caso de que la materia no haya alcanzado una relación Carbono : Nitrógeno (C:N) adecuada, es decir, contiene una mayor cantidad de carbono que sobrepasa el equilibrio 24:1. Como consecuencia, tras su aplicación en el suelo, los microorganismos se encargan de comenzar el proceso de descomposición, en cuyo caso consumen parte del carbono presente del material, y seguidamente incrementan el consumo de nitrógeno presente en el suelo para poder consumir el carbono restante, lo que agota las reservas de nitrógeno en el suelo (Román *et al.*, 2013).

No conforme con estos inconvenientes que dificultan la germinación y posterior desarrollo de las plantas, la aplicación de un compost inmaduro, aún en fase de descomposición, provoca que la microbiota edáfica emplee el oxígeno presente en el suelo para continuar con el proceso, agotándolo y en cierta manera secuestrándolo, de tal forma que no lo tengan las plantas a su disposición, es decir, reduciendo la disponibilidad de oxígeno radicular (Román *et al.*, 2013).

Por ello, y como se comentaba con anterioridad, se debe aguardar hasta que el compost alcance la madurez, lo cual se estima en torno a los 6 meses (Román *et al.*, 2013). Pueden utilizarse métodos físicos, químicos y biológicos para caracterizar el cambio en la madurez del compost (Komilis, 2015; Chen *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2019).

1.3. Fitotoxicidad

Un método biológico efectivo para establecer si el compost ha alcanzado la madurez y es seguro para emplearlo con fines agrícolas, en invernadero o vivero, es evaluar la posible fitotoxicidad que pueda presentar. Este método de evaluación no se realiza necesariamente solo para materiales compostados. Todo material

orgánico es susceptible de desarrollar propiedades no beneficiosas que pueden afectar al medio en el que se aplique, por lo que este método de evaluación es necesario.

Así pues, se procede a realizar los convenientes ensayos de fitotoxicidad para cada material que desee emplearse como sustrato de cultivo. Estos experimentos parten de la base de que cada material de estudio, con sus características propias, ya sea su concentración de elementos solubles, su pH o su conductividad eléctrica (CE), afecta de manera diferente a la germinación de una serie de semillas, pudiendo inhibirla o, por el contrario, estimularla. Con este método, en el que se realiza un extracto acuoso del material orgánico (Tiquia & Tam, 1988; Komilis & Tziouvaras, 2009; Tiquia, 2010; Selim *et al.*, 2012 y Martínez *et al.*, 2020), se calcula el índice de germinación (IG) de cada planta según el material empleado, indicador biológico ampliamente utilizado para la finalidad que nos atañe, el cual nos indica la presencia o ausencia de compuestos fitotóxicos en dicho material. Diversos autores (Zucconi *et al.*, 1981; Tiquia, 2000; Emino & Warman, 2004 y Varnero *et al.*, 2006) sostienen que el IG es uno de los indicadores más completos para describir el potencial fitotóxico de un material orgánico, ya que integra el porcentaje de germinación relativo y el crecimiento relativo de raíces.

Este indicador fue propuesto por primera vez por Zucconi *et al.* (1981) e incluye el efecto de las sustancias fitotóxicas tanto en la tasa de germinación como en la elongación de la radícula de las plántulas. Zucconi *et al.* (1981) establecen un criterio de interpretación en el cual, valores de $IG \geq 80\%$ indican que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración, mientras que, por el contrario, si el $IG \leq 50\%$ indica que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas. Por otra parte, si los valores de IG se sitúan entre el 50% y el 80%, se interpreta como la presencia moderada de estas sustancias (tabla 1).

Tabla 1. IG y contenido en sustancias fitotóxicas

IG (%)	Contenido sustancias fitotóxicas
≤ 50	Alto
50 - 80	Moderado
≥ 80	Mínimo

Cabe destacar que cada especie de semilla responde de modo diferente a cada extracto de material, es decir, su sensibilidad varía notablemente según la toxicidad biológica del material orgánico utilizado, pudiendo dar lugar a dos supuestos, uno en el que germine y se desarrolle adecuadamente y otro en el que su germinación y crecimiento se vea dificultada. Por lo tanto, la selección adecuada de las semillas es esencial para la evaluación de la toxicidad del material de estudio mediante el IG, ya que éste depende de que las semillas germinen con rapidez, especialmente en agua destilada, de su porcentaje de germinación (%G) y de la longitud de la raíz en el experimento control, parámetros cruciales para la precisión a la hora de determinar el IG (Yan *et al.*, 2021). Sin embargo, no se ha establecido un consenso sobre las especies sensibles a utilizar en

estos bioensayos, como tampoco existe un acuerdo sobre los criterios de interpretación de los resultados obtenidos en dichas pruebas (Varnero *et al.*, 2007). A pesar de esto, según la bibliografía consultada, una de las especies más utilizadas para los ensayos de germinación con extractos acuosos de materiales orgánicos es el berro de jardín (*Lepidium sativum*) (Zucconi *et al.*, 1981; Iglesias & Pérez, 1989; Komilis & Tziouvaras, 2009; Tiquia, 2010; Nolan *et al.*, 2011; Selim *et al.*, 2012)

1.4. Ecotoxicidad

Otro propósito que se tiene en cuenta al realizar este estudio es la posible contaminación de aguas dulceacuícolas provocada por la aplicación de estos materiales en el medio. Una posible fuente de contaminación es la aplicación de esos materiales en grandes extensiones agrícolas, pudiendo lixiviar los elementos solubles hasta alcanzar aguas subterráneas. Además, los procesos de escorrentía, ocasionados como consecuencia de eventos meteorológicos extremos, como por ejemplo, lluvias torrenciales, pueden facilitar que los materiales aplicados a terrenos de cultivo alcancen cuerpos de agua cercanos, lo que supone otra posible fuente de contaminación.

Por este motivo, se propone realizar estudios de ecotoxicidad, que emplean sistemas biológicos para la determinación preliminar de la toxicidad de extractos de carácter natural, los cuales ofrecen varias ventajas al reducir el costo, tiempo y espacio requerido para la experimentación, a la vez que permite realizar una correlación entre las pruebas toxicológicas en invertebrados y mamíferos (Martínez *et al.*, 2010). Los ensayos realizados en este trabajo se llevan a cabo mediante el empleo de *Daphnia magna*, organismos de alta sensibilidad mediante los cuales puede describirse la toxicidad de un compuesto (figura 3).



Figura 3. Hembra de *Daphnia magna* con huevos en su interior.

Fuente: Marek Mis (2019)

Las *Daphnias* son crustáceos planctónicos que pertenecen a los filópodos, que se caracterizan por tener patas aplanadas en forma de hoja que sirven para producir una corriente de agua para el aparato filtrador. Dentro de los filópodos, las *Daphnias* pertenecen a los cladóceros, cuyos cuerpos están encerrados por un caparazón no calcificado. Se denominan comúnmente “pulgas de agua” debido a su cierta similitud tanto en forma como en movimiento, presentando un cuerpo ovalado, achatado por los costados y sin segmentación externa. Son exclusivos de aguas dulces, habitando lagos, lagunas, charcas permanentes o de carácter temporal (Ebert, 2005).

Como consecuencia de la facilidad de su cultivo en laboratorio, su reproducción partenogénica, que permite trabajar con poblaciones genéticamente uniformes, y su ciclo de vida corto (3-5 semanas) que da lugar a un número elevado de crías en poco tiempo (Núñez & Hurtado, 2005), hace que estos microcrustáceos, en concreto, sus neonatos, con un periodo de vida inferior a las 24h, se empleen con frecuencia en estudios de toxicidad de aguas dulces, lo cual se debe a su mayor vulnerabilidad a compuestos de carácter tóxico (UNE-EN ISO 6341:2012).



2. OBJETIVOS

Ante la problemática planteada y la necesidad de buscar alternativas a esos materiales orgánicos generados irremediablemente, e intentando incentivar, dentro del marco de la economía circular, el uso como recurso de estos materiales, se plantea como objetivo general de este trabajo:

“Conocer los posibles efectos, adversos o no, del empleo de distintos materiales de carácter orgánico sobre las plantas, sobre su germinación y desarrollo, cuando estos son aplicados como sustratos de cultivo, mejoradores del suelo o restauración y rehabilitación de estos, entre otras aplicaciones, incluyendo también el estudio sobre su potencial de contaminación de medios acuáticos, en caso de que estos materiales o sus elementos solubles alcancen cuerpos de agua como consecuencia de procesos de escorrentía y lixiviación”.

Para alcanzar este objetivo se requieren de otros más específicos:

- Determinar el porcentaje de germinación de una selección inicial de semillas de cultivo.
- Determinar las propiedades físico-químicas de diversos materiales orgánicos abundantes en la zona del sureste español, resultantes en su mayoría de diversas actividades procedentes del campo y tratados en algunos casos como residuos.
- Determinar la fitotoxicidad de los materiales objeto de estudio. Para ello será necesario conocer cómo afecta sobre la germinación de una selección de semillas la aplicación de los materiales y residuos caracterizados previamente. Así se podrá determinar el índice de germinación de las semillas seleccionadas según el material empleado.
- Determinar la ecotoxicidad de los materiales mediante ensayos de toxicidad con *Daphnia magna*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Búsqueda bibliográfica

Con la finalidad de cumplir con los objetivos planteados previamente, se realiza una búsqueda bibliográfica para conocer la situación actual. Mediante esta investigación de información científica se pretende también obtener una referencia sobre los métodos empleados para realizar los correspondientes ensayos de germinación y de ecotoxicidad, siendo las principales bases de datos exploradas Scopus y ScienceDirect. En dichas bases de datos se buscó la información atendiendo a palabras clave como son germinación, toxicidad, fitotoxicidad, *Daphnia magna*, ecotoxicidad, materiales orgánicos, extracto, compost e índice de germinación (IG).

Asimismo, intentando establecer una uniformidad en cuanto a los métodos de ensayo utilizados por la comunidad científica, se procede a buscar las normas UNE en la base de datos de la UMH.

3.2. Materiales Orgánicos

Siguiendo con los objetivos del trabajo, se seleccionan 7 materiales de carácter orgánico para realizar los ensayos de fitotoxicidad y ecotoxicidad:

- Pino, restos de pinocha procedentes de pinares del término municipal de Sax.
- Paja de cereal (trigo), restos de poda.
- Sarmiento, restos de poda procedentes de cultivos vitivinícolas del término municipal de Sax.
- Olivo, restos de poda de ramas y hojas del término municipal de Sax.
- Palmera, restos de poda de hojas de los jardines de palmeras de Elche.
- Compost de lodo, procedente de la EDAR de Aspe.
- Compost comercial, procedente de suministrador compuesto por: turba, perlita, cal, fertilizante NPK, fosfato de silicio y micronutrientes.

La elección de estos materiales se debe a que se han realizado estudios y diversos trabajos con ellos, por lo que se encuentran disponibles en el departamento.

3.2.1. Caracterización de los materiales de estudio

Con el propósito de conocer los parámetros que pueden afectar a la germinación de las semillas seleccionadas y a la concentración efectiva media (CE_{50}) en los estudios de toxicidad con *Daphnia magna*, se

realiza su caracterización, obteniendo así los valores de pH, conductividad eléctrica (CE) y elementos solubles (macro y micronutrientes) según las normas UNE referentes a suelos y sustratos de cultivo.

- 1) **pH:** El pH se determina en un extracto con agua destilada, en relación 1:5 (V/V) según la norma UNE-EN ISO 13037:2012. Las medidas se realizan con un pH-metro CRISON GLP 21.
- 2) **Conductividad eléctrica (CE):** La CE se determina en un extracto acuoso, en relación 1:5 (V/V) según la norma UNE-EN ISO 13038:2012. Las medidas se realizan con un conductímetro CRISON GLP 31.
- 3) **Macronutrientes (Na, K, Ca, Mg) y Micronutrientes (Mn, Cu, Fe, Zn) solubles:** se miden mediante espectrofotometría de absorción-emisión atómica (Thermo SCIENTIFIC ICE 3000 Series [figura 4]) en extracto acuoso 1:5 (V/V) según la norma UNE-EN ISO 13652:2001.



Figura 4. Espectrofotómetro de absorción-emisión atómica. Fuente: elaboración propia.

3.3. Selección de semillas

Una vez seleccionados los materiales orgánicos que se desea estudiar para conocer su conveniencia de aplicación como sustratos de cultivo, deben seleccionarse las semillas que mejor respondan para realizar los ensayos de fitotoxicidad. De esta manera, las semillas se seleccionan por su elevado porcentaje de germinación (%G). Para obtener las especies más viables se ensaya con 17 tipos diferentes de semillas, siendo éstas las que se encontraban fácilmente disponibles en viveros cercanos en la localidad de Alicante:

- berro de jardín (*Lepidium sativum*)
- berenjena, black beauty (*Solanum melongena*)
- berenjena, listada de Gandía (*Solanum melongena*)
- calabaza butternut (*Cucurbita moschata*)
- calabaza roteña (*Cucurbita maxima duchesne*)
- calabacín verde híbrido F1 (*Cucurbita pepo*)
- calabacín verte noire maraîchère (*Cucurbita pepo*)
- maíz dulce (*Zea mays L. var. rugosa*)
- melón, piel de sapo (*Cucumis melo*)
- melón, piñonet piel de sapo (*Cucumis melo*)
- pepino marketer (*Cucumis sativus*)
- pimiento de padrón (*Capsicum annuum*)
- pimiento dulce de España (*Capsicum annuum*)
- pimiento infante (*Capsicum annuum*)
- pimiento yolo wonder (*Capsicum annuum*)
- sandía sugar baby (*Citrullus lanatus*)
- tomate San Pedro (*Solanum betaceum*)

El %G se determina mediante la disposición de 10 semillas de cada especie en placas Petri de 90 mm de diámetro con papel de filtro en su base. Para cada especie se emplean 4 placas Petri, lo que hace un total de 40 semillas por especie.

Para proceder con el experimento, se adicionan 10 mL de agua destilada a cada placa y se disponen en un incubador PSELECTA en oscuridad, en condiciones controladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad durante 7 días. Se toman datos de %G, de elongación radicular y del tallo en el cuarto y séptimo día. Al cuarto día, a la vez que se anotan los datos observados, se incluyen también las anomalías percibidas, como puede ser el desarrollo de hongos o la falta de agua en alguna de las placas, entre otras, en cuyo caso se procede a adicionar 5 mL más de agua destilada, evitando así el marchitamiento de los brotes.

Se sigue este método de germinación control para proceder de manera similar a la bibliografía consultada sobre ensayos de fitotoxicidad, en el cual se adicionan 10 mL de extracto del compost (Tiquia & Tam, 1988; Komilis & Tziouvaras, 2009; Tiquia, 2010; Selim *et al.*, 2012 y Martínez *et al.*, 2020).

A raíz de los resultados obtenidos, se seleccionan las siguientes semillas, todas dicotiledóneas: pepino marketer (*Cucumis sativus*), tomate San Pedro (*Solanum betaceum*), berro de jardín (*Lepidium sativum*), pimiento dulce de España (*Capsicum annuum*) y sandía sugar baby (*Citrullus lanatus*).

3.4. Ensayo de fitotoxicidad

Tras realizar la selección de las semillas de ensayo y teniendo la caracterización de los materiales de estudio, se procede a obtener el extracto acuoso de cada material para poder realizar los estudios de germinación. De esta manera, siguiendo las directrices de varios autores (Tiquia & Tam, 1988; Komilis & Tziouvaras, 2009; Tiquia, 2010; Selim *et al.*, 2012 y Martínez *et al.*, 2020) e incorporando alguna adaptación, se preparan los extractos en relación 1:10 (P/V), agitando en volteador durante 1h y posteriormente filtrando a

vacío (figura 5), obteniendo para cada material orgánico un volumen de extracto acuoso suficiente para realizar los ensayos de fitotoxicidad y ecotoxicidad.

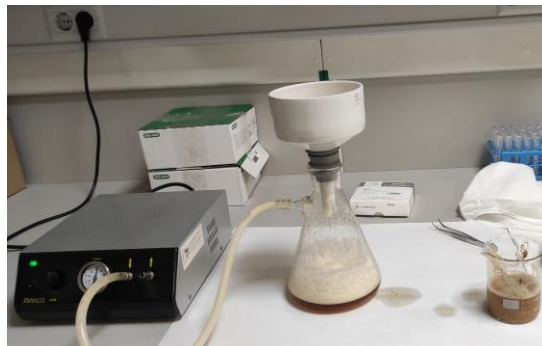


Figura 5. Filtración a vacío. Fuente: elaboración propia.

Una vez obtenido el extracto se procede a realizar los ensayos de germinación. Para cada especie se emplean 6 placas Petri con 10 semillas en cada una, 5 de las placas para germinación con el extracto y la restante para un blanco con agua destilada, de manera que todas las semillas crezcan en las mismas condiciones. Tanto en el caso del extracto como el del blanco se adiciona un volumen de 10 mL y se introducen las placas en un incubador PSELECTA en oscuridad, en condiciones controladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad durante 7 días (figura 6). Se mide %G, elongación radicular y del tallo al cuarto día, anotando también las posibles anomalías que pudieran surgir y observándose que en ninguna placa falta extracto acuoso del material o de agua destilada (blanco), y en caso de ser así, se adicionan 5 mL más de la correspondiente solución.

Al séptimo día se vuelve a medir %G, elongación radicular y del tallo (figura 7) y se vuelcan los datos a un Excel, de tal manera que mediante el promedio de la elongación de las plántulas de una determinada placa Petri entre el cuarto y el séptimo día, puede observarse el crecimiento de la especie en cuestión. A partir de los datos obtenidos se calcula el índice de germinación (IG) mediante la metodología descrita por Zucconi *et al.* (1981):

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

Donde PGR es el porcentaje de germinación relativa y se calcula a partir del número de semillas que germinan en los extractos y en el blanco, según la ecuación:

$$\text{PGR} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en el extracto}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en el blanco}} \times 100$$

Mientras que CRR es el crecimiento de la raíz relativo que se obtiene a partir de la longitud que alcanzan las raíces de las semillas germinadas con los extractos y con el blanco, mediante:

$$\text{CRR} = \frac{\text{Elongación de radículas en el extracto}}{\text{Elongación de radículas en el blanco}} \times 100$$

En algún caso, durante los ensayos, se hacen complicadas las medidas, puesto que en el proceso de germinación se desarrollan hongos que las dificultan, habiendo de trabajar en condiciones adecuadas para evitar la dispersión de sus esporas (figura 8).



Figura 6. Elongación del pepino con extracto de compost comercial en incubador. Fuente: elaboración propia.



Figura 7. Elongación del pepino con extracto de compost comercial. Fuente: elaboración propia.



Figura 8. Supresión de la elongación del pepino con extracto de olivo y desarrollo de hongo. Fuente: elaboración propia.

3.5. Ensayo de ecotoxicidad aguda con *Daphnia magna*

Por otro lado, una vez obtenido el extracto acuoso del material, se procede a realizar mediante *Daphnia magna* los correspondientes ensayos de toxicidad. Los neonatos empleados para dichos ensayos proceden de un cultivo madre de *Daphnia magna* alimentado con *Chlorella*, formado únicamente por hembras (diploides), en un ambiente libre de vapores y sustancias tóxicas, a $20\pm 2^\circ\text{C}$, tal y como viene descrito en la norma UNE-EN ISO 6341:2012.

La finalidad de este ensayo es determinar la concentración inicial que a las 24h inmoviliza al 50% de las *Daphnias* expuestas al agente contaminante, en nuestro caso, al extracto acuoso empleado para los ensayos de fitotoxicidad y que se encuentra en dilución con agua mineral apta para estos organismos. De este ensayo se obtiene la concentración inhibitoria inicial efectiva, designada como CE_{50-24h} (Orden Ministerial, 1989; APHA, AWA & WEF, 2012; UNE-EN ISO 6341:2012).

De esta manera, se analizan los extractos de los siete materiales empleados en los ensayos de fitotoxicidad. Para ello se realizan sucesivas diluciones, siendo la muestra más concentrada un 33,3% (V/V), y variando la más diluida en función del origen del extracto y de su toxicidad, para así obtener un porcentaje de mortalidad comprendido entre el 0% y el 100%. El agua mineral empleada para las correspondientes diluciones debe disponer de una dureza aproximada de 250 mg/L, tal y como indica la norma UNE-EN ISO 6341:2012. Cada dilución del extracto de ensayo se realiza por triplicado, suponiendo un total de 15 neonatos por dilución (figura 9). A las 24h se comprueba cuantos organismos quedan inmovilizados y a partir de esta observación se calcula el porcentaje de mortalidad.

La estimación de la CE_{50-24h} se realiza a partir de la representación gráfica (escala Gaussiana) del porcentaje de mortalidad frente al porcentaje de concentración del extracto en volumen.



Figura 9. Ensayos de ecotoxicidad con extracto de pino. Fuente: elaboración propia.

3.6. Análisis estadístico

La investigación acerca de la posible existencia de diferencias en los valores obtenidos que tengan significación y sean debidas a los tratamientos y ensayos realizados, precisa de una evaluación estadística. En este sentido, a lo largo de la experimentación se les aplicó a los resultados obtenidos un análisis de estadística descriptiva, calculando los valores medios (\bar{x}) y la desviación estándar (σ). Además, para poder determinar si existen diferencias significativas sobre los resultados se ha procedido a realizar el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y se ha aplicado el test de Tukey de comparaciones múltiples entre poblaciones.

Los cálculos y la estadística entre variables se han realizado mediante los programas EXCEL (Office v. 2021) y IBM SPSS Statistics (v. 26).



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de materiales

Tras realizar la caracterización de los 7 materiales de estudio siguiendo las directrices establecidas por las normas UNE referentes a suelos y sustratos de cultivo (UNE-EN ISO 13652:2001; UNE-EN ISO 13037:2012; UNE-EN ISO 13038:2012), se obtienen los resultados que se presentan en las tablas 2, 3 y 4, datos que pueden responder al comportamiento de las semillas frente al extracto de cada material, su germinación y la manera en que se desarrollan.

Así pues, como puede observarse en la tabla 2, se presentan los valores medios (\bar{X}) obtenidos del triplicado realizado para cada macronutriente frente a su desviación estándar (σ). Se analizan los macroelementos de cada material de estudio, adoptando como unidades: mg del catión por kg de material. Según estos datos, la palmera es el material con mayor contenido en Na, Ca y Mg, siendo superado por la paja en el contenido de K. Tanto la paja como la palmera son los 2 materiales con mayor contenido en macronutrientes, siendo las concentraciones para los 4 elementos analizados, superiores a 1000 mg/kg.

Tabla 2. Macronutrientes de cada material orgánico de estudio

Material	Macronutrientes (mg/kg)							
	Na		K		Ca		Mg	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
Pino	526	98	983	28	824	54	378	18
Paja	1493	41	9691	169	2680	184	1149	93
Sarmiento	418	33	3552	45	1454	30	1051	16
Olivo	290	28	4074	127	714	34	376	19
Palmera	1555	36	6559	246	3476	127	2576	63
Compost EDAR	863	14	1475	22	590	25	160	0
Compost Comercial	482	29	673	4	1343	49	477	7

Es de vital importancia que estos materiales de estudio aporten a los cultivos los elementos necesarios, ya que la deficiencia de macronutrientes puede causar problemas severos en el crecimiento y apariencia de las plantas. Por ejemplo, la deficiencia de K no produce síntomas visibles de inmediato, pero las plantas afectadas muestran una mayor susceptibilidad al daño por heladas y al ataque de hongos. El Ca, por su parte, juega un papel decisivo en el crecimiento y desarrollo de las plantas y su déficit puede deformar las hojas jóvenes. Los síntomas de deficiencia de Mg difieren entre especies de plantas, pero un suministro inadecuado deprime el crecimiento de brotes y raíces (Mengel & Kirkby, 2001). Según Trevizan *et al.* (2008), el intervalo de

concentraciones esperado de macronutrientes en las hojas de las plantas de cultivo en buen estado nutricional, asumido para la mayoría de las plantas de interés agrícola, varía en los siguientes rangos (base de materia seca): 6–60 g/kg K, 2–60 g/kg Ca y 1–10 g/kg Mg.

En el caso de los micronutrientes (tabla 3), también se presentan los valores medios (\bar{x}) obtenidos de un triplicado de cada elemento, frente a su desviación estándar (σ). Estos micronutrientes, como su propio nombre indica, son esenciales en pequeñas cantidades para el desarrollo óptimo de las plantas. De los resultados que se obtienen para cada material, destacan la palmera y el compost de lodo (EDAR). La palmera por ser el material con mayor contenido en manganeso (Mn), y el compost de lodo (EDAR) por su contenido en hierro (Fe). La aplicación de estos materiales puede suponer una solución para suelos de cultivo con carencias de estos micronutrientes.

Tabla 3. Micronutrientes de cada material orgánico de estudio

Material	Micronutrientes (mg/kg)							
	Mn		Cu		Fe		Zn	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Pino	2,43	0,11	1,10	0,09	3,46	0,73	1,01	0,54
Paja	8,97	0,31	2,94	0,18	6,68	0,49	4,20	0,18
Sarmiento	7,76	0,11	2,50	0,03	2,31	0,29	3,77	0,05
Olivo	3,80	0,03	2,19	0,03	3,17	0,03	2,35	0,04
Palmera	10,66	0,24	1,83	0,06	2,02	0,09	3,33	0,03
Compost EDAR	0,25	0,03	0,48	0,01	11,80	0,96	3,58	0,51
Compost Comercial	5,20	0,04	0,27	0,01	2,02	0,07	0,23	0,01

En cuanto al pH y la CE de cada material de estudio (tabla 4), los resultados obtenidos indican que los valores medios (\bar{x}) de pH oscilan entre la acidez y la neutralidad. Tanto el olivo como el compost comercial son los materiales con el pH más ácido, lo que se traduce en una mayor movilización y disponibilidad de nutrientes. El compost de lodo (EDAR) es el material con el pH más cercano a la neutralidad y su CE es la más alta, con un valor medio de 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La CE hace referencia en este caso, a la capacidad de un extracto acuoso para conducir la electricidad como una función de la concentración iónica (UNE-EN ISO 13038:2012) o concentración de sales, lo que significa que el extracto acuoso del compost de lodo (EDAR) es el que mayor cantidad de iones en disolución contiene. Se recomienda que la CE de un sustrato sea baja, en lo posible menor a 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, para facilitar así la absorción de nutrientes y evitar efectos fitotóxicos (Barbaro *et al.*, 2018).

Tabla 4. pH y conductividad eléctrica (CE) de cada material orgánico de estudio

Material	pH			CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (25°C)	
	\bar{X}	σ	Tª (°C)	\bar{X}	σ
Pino	6,12	0,03	21,2	496	8
Paja	5,40	0,06	21,0	972	31
Sarmiento	5,78	0,06	21,2	1188	24
Olivo	4,76	0,02	21,1	1491	13
Palmera	6,08	0,04	21,0	2325	21
Compost EDAR	7,61	0,02	21,2	3000	141
Compost Comercial	4,43	0,03	21,0	1243	11

4.2. Fitotoxicidad

Cumpliendo con los objetivos descritos, tras realizar los ensayos correspondientes de fitotoxicidad según la bibliografía consultada (Tiquia & Tam, 1988; Komilis & Tziouvaras, 2009; Tiquia, 2010; Selim *et al.*, 2012 y Martínez *et al.*, 2020), se obtiene para cada especie de semilla seleccionada los resultados del cuarto y séptimo día. Se extraen datos de %G, elongación del tallo y la raíz e IG. Se trabaja con los valores del séptimo día, puesto que es más representativo para reflejar el IG en los gráficos que se generan, a partir de los cuales se analiza la resistencia de los diferentes tipos de semillas frente a la exposición al extracto de cada material y la fitotoxicidad que posee cada uno de ellos.

Comenzando el análisis por el pepino (tabla 5), y siguiendo el criterio establecido por Zucconi *et al.* (1981), los materiales orgánicos que permiten un desarrollo similar al del blanco son el pino y el sarmiento, alcanzando con ambos un IG superior al 80% (figura 10), valor a partir del cual se interpreta que los compuestos fitotóxicos que puede contener el material son mínimos. El material que permite también un crecimiento relativamente normal es el compost comercial, resultado esperable, destacando además su capacidad para estimular la elongación del tallo, superior incluso a la elongación obtenida con el blanco (figura 11). Se observan diferencias significativas para los valores medios de los parámetros estudiados, excepto para el porcentaje de germinación (%G). Esto nos indica que existen diferencias en los resultados obtenidos entre los materiales empleados, algo normal al tener cada uno su origen. Mediante las letras que acompañan los valores, se puede establecer qué resultados de cada columna son significativamente iguales, observándose esta igualdad entre el pino, sarmiento, compost comercial y palmera, en lo que se refiere al IG.

Tabla 5. Valores al 7º día de %G, elongación de la raíz y del tallo e IG de la semilla de pepino para cada material de estudio

	PEPINO							
	G7 (%)		R7 (cm)		T7 (cm)		IG7 (%)	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Blanco	100	0	8,2 c	1,4	7,6 a	0,5	100	0
Pino	88 a	4	6,9 bc	2,1	7,1 a	0,4	83 d	25
Paja	84 a	5	2,5 a	0,6	3,9	1,5	29 ab	7
Sarmiento	88 a	13	6,3 bc	1,9	7,4 a	1,8	88 d	35
Olivo	72 a	22	0,2	0,1	0,0	0,0	3 a	2
Palmera	90 a	10	5,3 bc	1,6	7,3 a	3,0	53 bcd	21
Compost EDAR	84 a	9	4,4 ab	1,1	7,4 a	1,2	47 bc	14
Compost Comercial	98 a	4	5,5 bc	1,1	10,6	1,3	74 cd	17
F ANOVA	2,43 ns		16,7 ***		21,4 ***		11,8 ***	

F ANOVA: Estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA) de un factor para analizar la significancia estadística de los resultados. Valores de F con ***, **, * indican significación a nivel de $p = 0,001$; 0,01 y 0,05, respectivamente; ns indica no significativo. Valores medios de cada columna, seguidos de la misma letra indican que son significativamente iguales con una probabilidad del 95%.

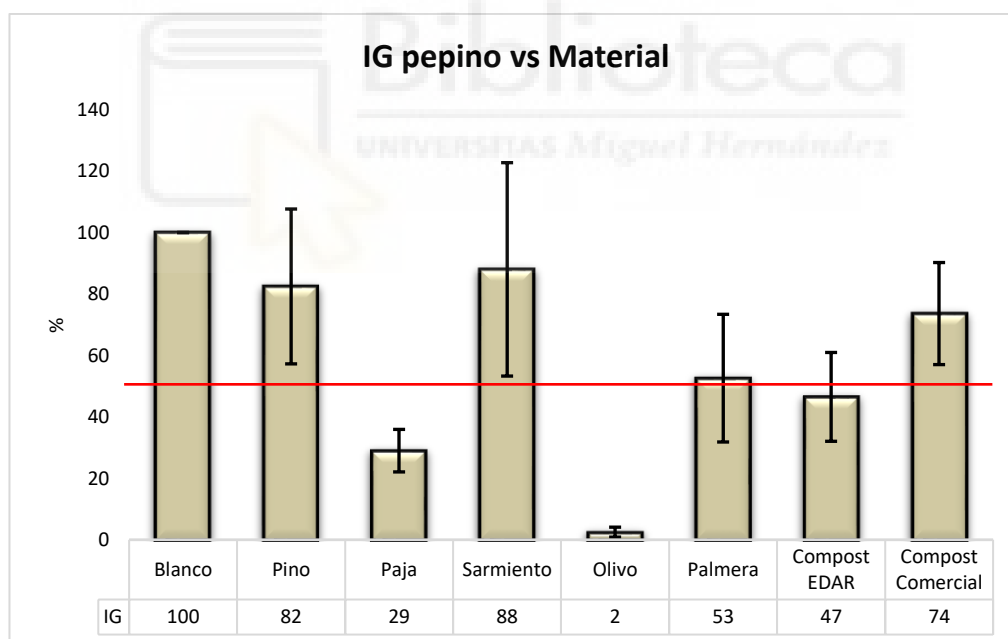


Figura 10. IG del pepino para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

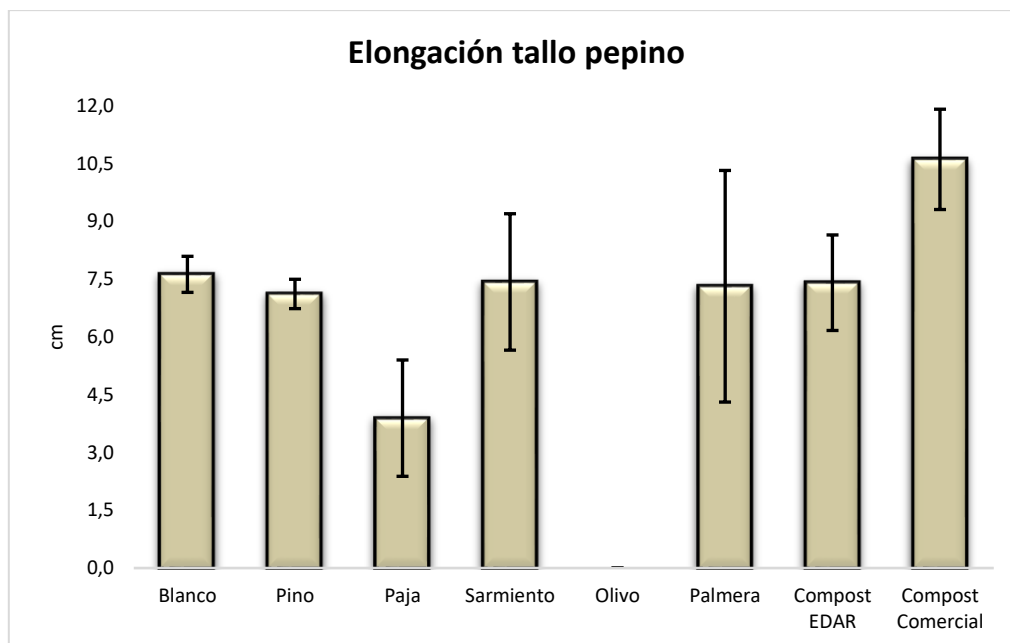


Figura 11. Elongación del tallo del pepino para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

En el caso del tomate (tabla 6), los dos materiales que le permiten un buen desarrollo son la palmera y el compost de lodo (EDAR), alcanzándose un IG superior al 80% (figura 12). El compost comercial también se comporta adecuadamente, proporcionando un IG cercano al 60% y permitiendo que la elongación del tallo sea mayor que la del blanco (figura 13). Los valores medios de cada columna presentan diferencias significativas, siendo el pino, el sarmiento, la palmera, el compost de lodo (EDAR) y el compost comercial los materiales que presentan un IG significativamente igual según la coincidencia de sus letras.

Tabla 6. Valores al 7º día de %G, elongación de la raíz y del tallo e IG de la semilla de tomate para cada material de estudio

	TOMATE							
	G7 (%)		R7 (cm)		T7 (cm)		IG7 (%)	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
Blanco	100	0	3,6	0,8	4,2 d	0,9	100	0
Pino	72 a	19	2,4 b	0,9	2,8 c	1,0	56 c	30
Paja	70 a	14	0,5 a	0,3	0,7 ab	0,3	14 ab	11
Sarmiento	76 a	21	1,6 b	0,5	2,1 bc	0,8	46 bc	21
Olivo	14	15	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0	1
Palmera	80 a	19	2,1 b	0,5	2,0 bc	0,9	84 c	26
Compost EDAR	94 a	9	2,4 b	0,4	4,8 d	0,6	87 c	21
Compost Comercial	100 a	0	2,3 b	0,3	6,7	1,0	58 c	9
F ANOVA	16,6 ***		23,5 ***		39,3 ***		9,96 ***	

F ANOVA: Estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA) de un factor para analizar la significancia estadística de los resultados. Valores de F con ***, **, * indican significación a nivel de $p = 0,001$; $0,01$ y $0,05$, respectivamente; ns indica no significativo. Valores medios de cada columna, seguidos de la misma letra indican que son significativamente iguales con una probabilidad del 95%.

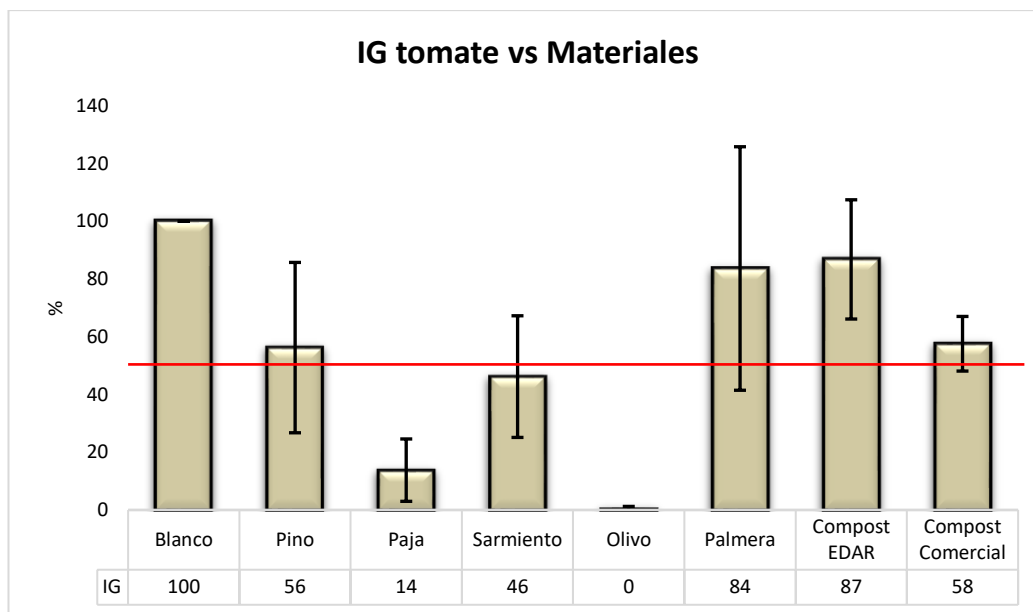


Figura 12. IG del tomate para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

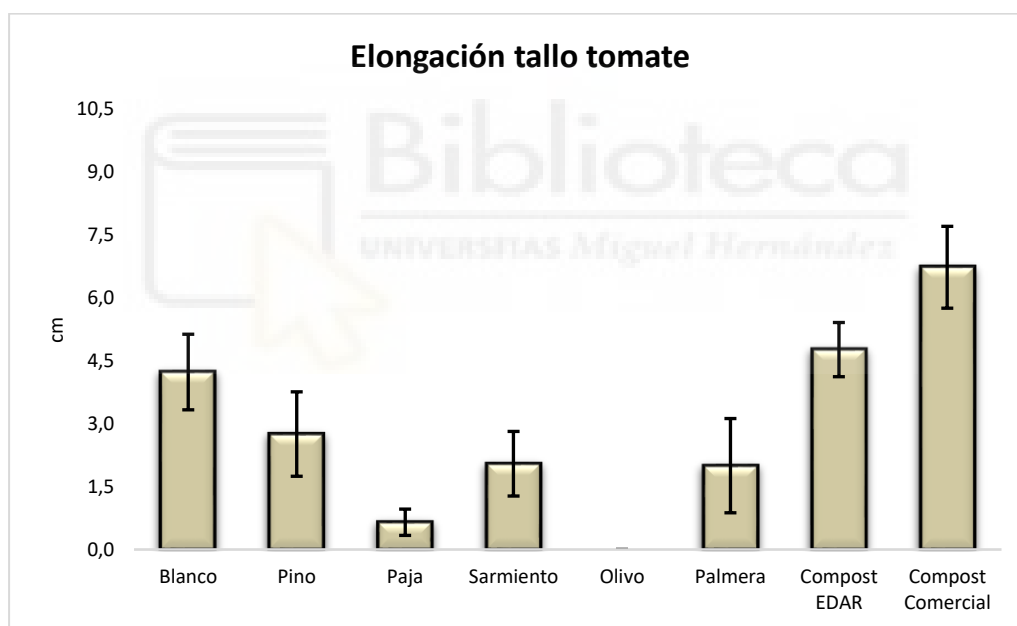


Figura 13. Elongación del tallo del tomate para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

Con el empleo del berro como semilla de prueba (tabla 7), no se logra alcanzar para ningún material un valor de IG superior al 80% (figura 14), lo que nos indica que esta semilla es la más susceptible de las ensayadas en este TFG a los efectos fitotóxicos que pueden provocar los materiales orgánicos de estudio. Esto explica que sea una de las especies más utilizadas en los ensayos de germinación para comprobar la toxicidad de diferentes materiales orgánicos, sobre todo cuando se llevan a cabo procesos de compostaje y es necesario conocer cómo evoluciona la toxicidad y el momento en el que se alcanza la madurez del compost (Zucconi *et al.*, 1981; Iglesias & Pérez, 1989; Komilis & Tziouvaras, 2009; Tiquia, 2010; Nolan *et al.*, 2011; Selim *et al.*, 2012). Según el valor

de F, existen diferencias significativas entre cada material para cada parámetro obtenido. Destacan el pino, el compost de lodo (EDAR) y el compost comercial por ser los que mejor resultados proporcionan en lo que se refiere al IG, siendo los valores medios de estos 3 materiales significativamente iguales. En el caso del compost comercial, la elongación del tallo con este material respecto del blanco es mayor (figura 15).

El pimiento, en cambio, se caracteriza por desarrollarse de manera más pausada, apreciable por su poca elongación obtenida en los 7 días de incubación, incluido el blanco (tabla 8). El material que le permite un crecimiento considerable respecto al blanco es el compost comercial, permitiendo una elongación radicular y del tallo mayores al de éste. Además, el IG que obtiene el pimiento con el extracto acuoso de este compost es superior al 90%. Sin embargo, el compost de EDAR también aporta buenos resultados, alcanzándose un valor próximo al 70% (figura 16).

Tabla 7. Valores al 7º día de %G, elongación de la raíz y del tallo e IG de la semilla de berro para cada material de estudio

	BERRO							
	G7 (%)		R7 (cm)		T7 (cm)		IG7 (%)	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
Blanco	100	0	4,5	0,8	4,9 cd	0,7	100	0
Pino	94 a	13	3,3 c	0,7	3,5 bc	0,9	69 cd	19
Paja	32	19	0,2 a	0,1	0,2 a	0,2	1 a	1
Sarmiento	74 a	29	1,5 b	1,4	2,0 b	2,1	30 ab	30
Olivo	0	0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0	0
Palmera	70 a	21	2,0 bc	0,7	3,1 b	0,9	43 bc	25
Compost EDAR	96 a	9	2,3 bc	0,5	5,5 d	0,9	79 d	22
Compost Comercial	96 a	5	2,7 bc	0,4	6,0 d	0,5	60 bcd	7
F ANOVA	24,6 ***		29,7 ***		33,0 ***		14,4 ***	

F ANOVA: Estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA) de un factor para analizar la significancia estadística de los resultados. Valores de F con ***, **, * indican significación a nivel de p = 0,001; 0,01 y 0,05, respectivamente; ns indica no significativo. Valores medios de cada columna, seguidos de la misma letra indican que son significativamente iguales con una probabilidad del 95%.

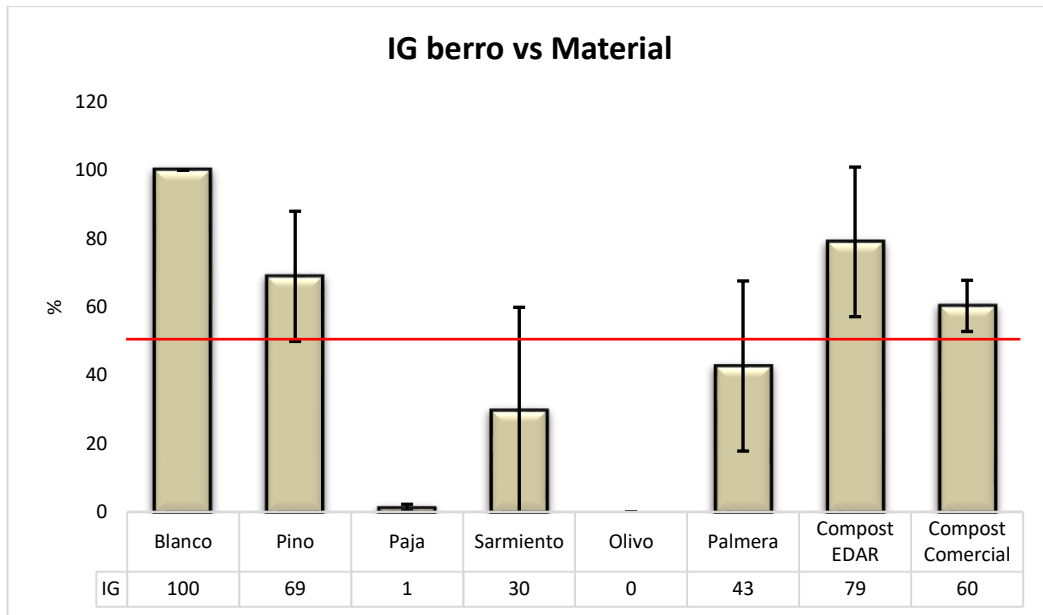


Figura 14. IG del berro para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

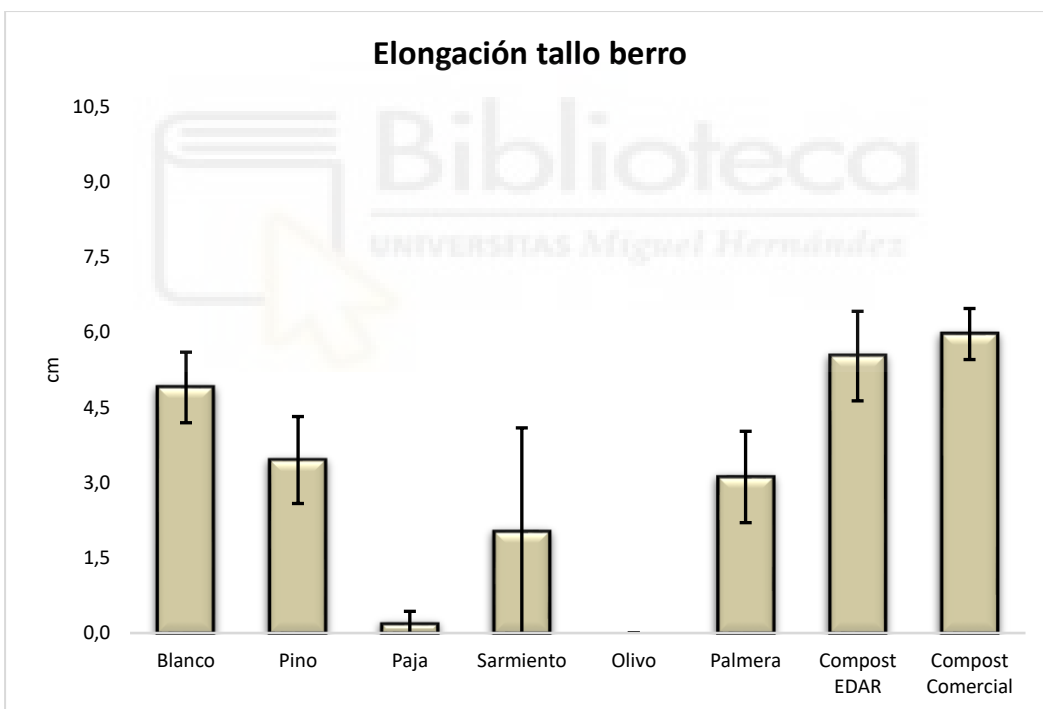


Figura 15. Elongación del tallo del berro para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

Tabla 8. Valores al 7º día de %G, elongación de la raíz y del tallo e IG de la semilla de pimienta para cada material de estudio

	PIMIENTO							
	G7 (%)		R7 (cm)		T7 (cm)		IG7 (%)	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Blanco	100	0	1,3 b	0,4	0,3 b	0,1	100	0
Pino	58 bc	13	0,6 a	0,4	0,2 ab	0,1	21 a	17
Paja	38 ab	18	0,2 a	0,1	0,0 a	0,1	6 a	5
Sarmiento	32 ac	23	0,2 a	0,1	0,1 a	0,0	8 a	7
Olivo	50 abc	12	0,1 a	0,0	0,0 a	0,0	5 a	2
Palmera	68	4	0,5 a	0,1	0,2 ab	0,1	20 a	6
Compost EDAR	92 d	8	1,3 b	0,3	0,3 b	0,1	68 b	17
Compost Comercial	94 d	5	1,7 b	0,5	0,7	0,3	91 b	30
F ANOVA	16,4 ***		20,7 ***		17,4 ***		25,7 ***	

F ANOVA: Estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA) de un factor para analizar la significancia estadística de los resultados. Valores de F con ***, **, * indican significación a nivel de $p = 0,001$; 0,01 y 0,05, respectivamente; ns indica no significativo. Valores medios de cada columna, seguidos de la misma letra indican que son significativamente iguales con una probabilidad del 95%.

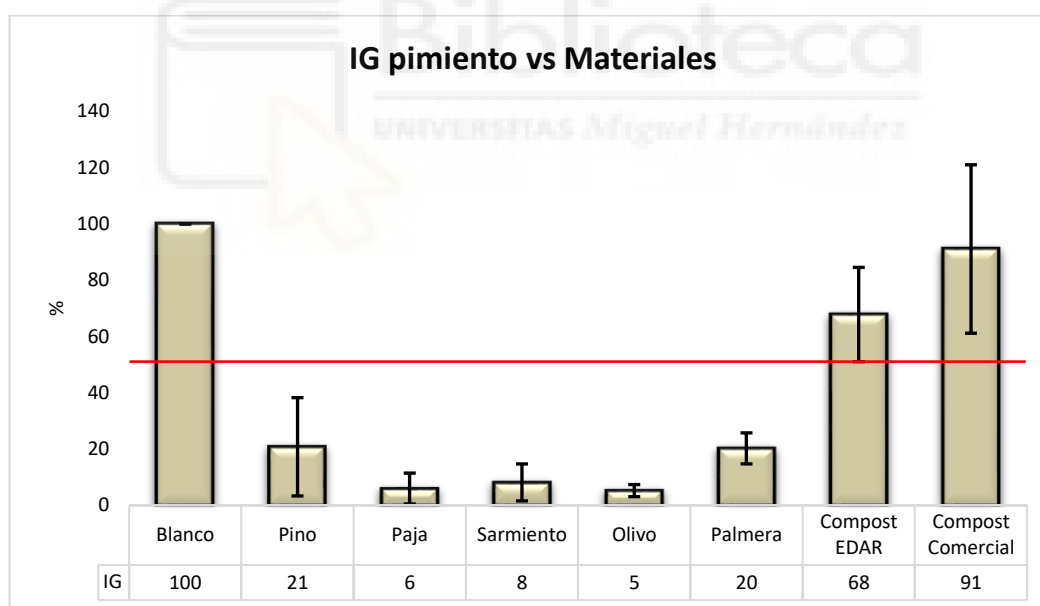


Figura 16. IG del pimienta para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

Por último, los resultados obtenidos para la sandía (tabla 9) muestran que el sarmiento es el material con el que logra un mayor IG, alcanzando un 95% (figura 17). Sin embargo, para los restantes materiales de estudio, la sandía no evoluciona adecuadamente, obteniéndose únicamente para el pino, un IG superior al 50% (51,5%). Este valor de IG indica la presencia moderada de sustancias y compuestos fitotóxicos en el material (Zucconi *et al.*, 1981). Resulta curioso que esta semilla no responda adecuadamente con el compost comercial, debiéndose

tal vez al poco K y Mg que contiene este material en comparación con el sarmiento. Para todos los valores obtenidos existen diferencias significativas entre cada material de estudio.

Tabla 9. Valores al 7º día de %G, elongación de la raíz y del tallo e IG de la semilla de sandía para cada material de estudio

	SANDÍA							
	G7 (%)		R7 (cm)		T7 (cm)		IG7 (%)	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
Blanco	100	0	3,6 d	1,5	3,9	1,5	100	0
Pino	84 a	18	2,2 bcd	0,5	1,6 ab	0,5	51 a	21
Paja	34	9	0,1 a	0,0	0,1 a	0,0	2 c	0
Sarmiento	92 a	8	2,4 cd	0,3	1,8 b	0,9	95	12
Olivo	0	0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0 c	0
Palmera	74 a	18	1,2 ab	0,3	0,5 ab	0,2	15 bc	7
Compost EDAR	84 a	5	1,3 abc	0,4	1,5 ab	0,8	40 ab	14
Compost Comercial	88 a	11	1,8 bc	0,4	2,1 b	0,9	23 bc	6
F ANOVA	44,0 ***		13,8 ***		14,7 ***		34,0 ***	

F ANOVA: Estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA) de un factor para analizar la significancia estadística de los resultados. Valores de F con ***, **, * indican significación a nivel de $p = 0,001$; $0,01$ y $0,05$, respectivamente; ns indica no significativo. Valores medios de cada columna, seguidos de la misma letra indican que son significativamente iguales con una probabilidad del 95%.

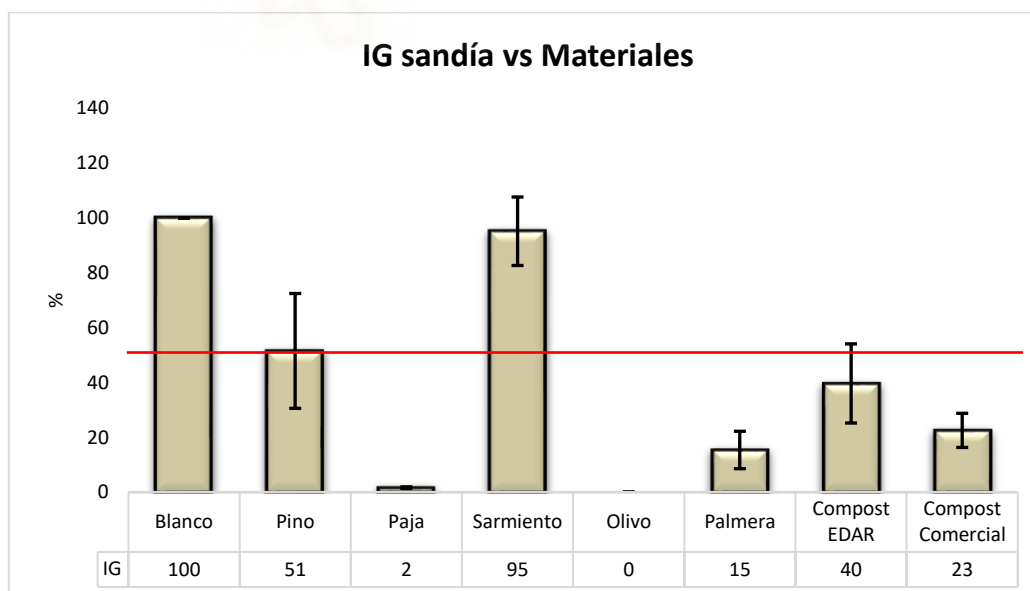


Figura 17. IG de la sandía para cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

Como se puede apreciar en cada una de las figuras comentadas con anterioridad (figuras 10, 12, 14, 16 y 17), el IG de las semillas obtenido para el material de olivo es el más bajo con respecto a los otros materiales de

estudio. Se trata, por tanto, de un material con un contenido en compuestos fitotóxicos muy elevado. Varios estudios sugieren que los componentes fenólicos que contiene este material son los principales causantes de su fitotoxicidad (Capasso *et al.*, 1992; Bonari *et al.*, 1993; Aliotta *et al.*, 2000). En el estudio realizado por Capasso *et al.* (1992), los principales polifenoles aislados de este material en las aguas residuales de las almazaras fueron: catecol, 4-metilcatecol, tirosol e hidroxitirosol. Tras realizar unas pruebas de fitotoxicidad, el único que no supuso un problema para la germinación y desarrollo de las plántulas fue 4-metilcatecol. Incluso tras la extracción de los polifenoles totales de las aguas residuales y su posterior aplicación a las semillas, resultó que este agua no permitía un desarrollo óptimo de las plantas de ensayo, lo que sugiere que intervienen otros compuestos generadores de fitotoxicidad.

Otro factor, que puede afectar a la germinación y crecimiento de las plántulas es el crecimiento de hongos durante el ensayo con este material (figura 18), así como la consistencia gelatinosa del extracto acuoso, que puede dificultar la absorción de agua y nutrientes por parte de la semilla (figura 19).



Figura 18. Crecimiento de hongo en extracto de olivo y supresión de la germinación en berro.
Fuente: elaboración propia.



Figura 19. Extracto de olivo y semillas de pepino.
Fuente: elaboración propia.

Para poder comparar la viabilidad de los diferentes materiales de estudio, se toma como referencia la semilla de berro de jardín, especie más utilizada debido a su sensibilidad según la bibliografía consultada. De esta manera, se puede observar según la tabla 7 y la figura 14 que son tres los materiales que permiten un mejor desarrollo de esta semilla, atendiendo a su IG. El compost de lodo (EDAR) es el que mejor resultados ofrece (79% IG), seguido del pino (69% IG) y finalmente el compost comercial (60% IG). Estos tres materiales se encuentran en el intervalo entre el 50-80%, lo que nos indica que presentan un contenido moderado de compuestos fitotóxicos que no inhiben el desarrollo de la planta.

4.3. Ecotoxicidad

A la vista de los resultados obtenidos para los ensayos de fitotoxicidad, se espera que los materiales orgánicos estudiados presenten cierta toxicidad para los organismos de ensayo *Daphnia magna*. Sin embargo, el material que presenta la toxicidad más acusada y considerable es el olivo, reflejándose así en la figura 20. En los extractos de los demás materiales orgánicos, en la muestra más concentrada (33,3%) sobreviven el 100% de los organismos objeto de estudio, lo que indica que dichos extractos no son tóxicos para la *Daphnia magna*. Por tanto, al no poder ser cuantificada la toxicidad, se establece un límite correspondiente a 33300 mg/L. Estos materiales sin apreciable toxicidad se sitúan por encima de este límite (> 33300 mg/L).

Para el material de olivo, ha sido necesario diluir hasta 5,1% (V/V) para conseguir un 0% de mortalidad, lo que supone, haciendo los cálculos correspondientes, una CE_{50} de 7829 mg/L, concentración a partir de la cual un medio dulceacuícola puede sufrir un evento tóxico, afectando a los organismos que habitan en él.

La toxicidad de este material proviene de ciertos polifenoles y otras sustancias que posee, como ya se ha comentado con anterioridad. De los otros materiales puede afirmarse que según los valores obtenidos son inocuos para aguas dulces.

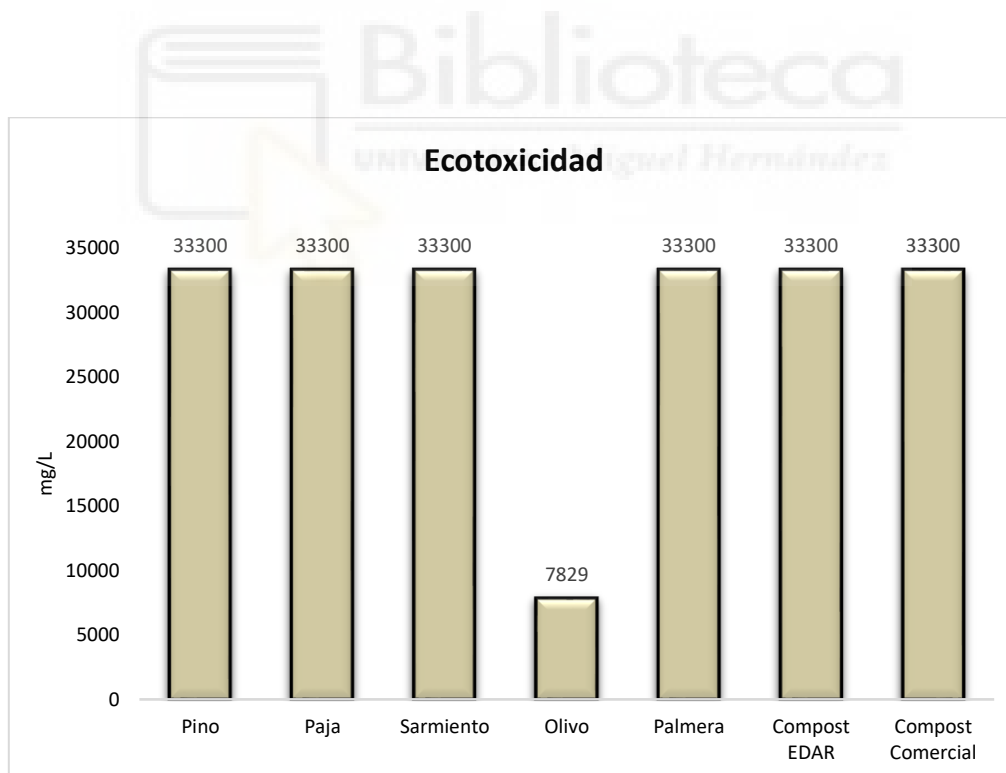


Figura 20. Ecotoxicidad de cada material de estudio. Fuente: elaboración propia.

5. CONCLUSIONES

Según lo comentado con anterioridad y habiendo analizado los resultados obtenidos se pueden extraer una serie de conclusiones.

En primer lugar, se comprueba mediante los ensayos realizados, que verdaderamente las semillas de diferentes especies muestran distintas sensibilidades a la toxicidad biológica de los materiales orgánicos de estudio, siendo posible medir esta sensibilidad interespecífica mediante el índice de germinación, un indicador biológico ampliamente utilizado en ensayos de fitotoxicidad.

Como consecuencia de esta sensibilidad interespecífica a las sustancias fitotóxicas, pudiéndose deber también a los requerimientos nutricionales de cada especie de planta, se hace necesario seleccionar un tipo de semilla con la que comparar los diferentes materiales de estudio, siendo el berro la semilla seleccionada por su aparente sensibilidad y por ser la más empleada en la bibliografía consultada. De esta comparativa, se extrae que los materiales que ofrecen un desarrollo adecuado son el pino, el compost de lodo (EDAR) y el compost comercial, alcanzando los tres un IG superior al 50%. Por el contrario, la paja, el sarmiento, el olivo y la palmera son los materiales que no permiten un buen desarrollo de esta semilla, viéndose reflejado mediante el IG, siendo la paja y el olivo los materiales que prácticamente inhiben su crecimiento.

Es de destacar que el extracto de compost comercial es el único que permite para cuatro de las cinco semillas seleccionadas una elongación del tallo superior a la del blanco, resultado un tanto esperable puesto que es un producto que se comercializa con la finalidad de mejorar el rendimiento de los cultivos.

De los ensayos de ecotoxicidad se puede concluir que el único material que resulta perjudicial para el medio dulceacuícola es el olivo. Por tanto, a excepción del olivo, los otros materiales pueden aplicarse al medio sin ningún riesgo aparente que pueda surgir como consecuencia de procesos de escorrentía y lixiviación.

Así pues, los materiales que podrían ser empleados como sustratos de cultivo, habiéndose realizado los estudios de fitotoxicidad y ecotoxicidad son: pino, compost de lodo (EDAR) y compost comercial.

A partir de la investigación realizada, se haría necesario un trabajo futuro que tratara aspectos no recogidos en la misma, pues hay mucho de lo que estudiar en este campo sobre la reutilización de materiales, como por ejemplo:

- Analizar qué parámetros son los que intervienen en la sensibilidad de cada especie de semilla a las sustancias fitotóxicas.

- Analizar la fitotoxicidad de los materiales cuando se mezclan sus extractos acuosos, si se potencia su efecto o se reduce.
- Analizar la fitotoxicidad de ciertos materiales y su empleo como herbicida natural.



6. BIBLIOGRAFÍA

Aliotta G., Cafiero G., De Feo V., Di Blasio B., Iacovino R. & Oliva A. (2000). Allelochemicals from Rue (*Ruta graveolens* L.) and Olive (*Olea europaea* L.) oil mill waste as potential natural pesticides. *Current Topics in Phytochemistry*, 3: 167-177.

APHA, AWWA & WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th. American Public Health Association. ISBN 978-087553-013-0.

Awasthi A.K., Yuan Z., Awasthi M.K., Li M., Mishra S. & Pandey A.K. (2022). Bioprocess potential of Eco-friendly fungal isolates converting organic waste to bioresource. *Bioresource Technology*, 346: 126586. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126586>

Barbaro L., Karlanian M. & Mata D. (2018). Importancia del pH y la conductividad eléctrica en los sustratos para plantas. 1º ed. Ediciones INTA. ISBN 978-987-521-918-2. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-importancia-del-ph-y-la-conductividad-elctrica.pdf>

Bernal M.P., Albuquerque J.A. & Moral R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment: A review. *Bioresource Technology* 100: 5444-5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>.

Bonari E., Macchia M., Angelini L.G. & Ceccarini L. (1993). The wastewaters from olive oil extraction: their influence on the germinative characteristics of some cultivated and weed species. *Agricultura Mediterranea*, 123: 273-280.

Capasso R., Cristinzio G., Evidente A. & Scognamiglio F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewater. *Phytochemistry*, 31: 4125-4128. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80426-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80426-F)

Chen H.Y., Awasthi M.K., Liu T., Zhao J.C., Ren X.N., Wang M.J., Duan Y.M., Awasthi S.K. & Zhang Z.Q. (2018). Influence of clay as additive on greenhouse gases emission and maturity evaluation during chicken manure composting. *Bioresource Technology*. 266: 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.073>

De Burgos I.M. (1996). Evaluación Agronómica del Compost Urbano procedente de la planta de compostaje de Villarrasa (Huelva). Efectos sobre la Germinación, Emergencia, Desarrollo y Estado Nutricional de *Lolium* c.v. Tewera. [Proyecto Fin de Carrera. E.U.I.T.A. Cortijo de Cuarto. Sevilla]

- Ebert D. (2005).** Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. *National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information*. ISBN 1-932811-06-0.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/corehtml/pmc/homepages/bookshelf/pdf/daph_screenUS.pdf
- Emino E. & Warman P. (2004).** Biological assay for compost quality. *Compost Science & Utilization*, 12: 342-348. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2004.10702203>
- Fombellida A. (2010).** Consideraciones agronómicas y económicas de la quema de rastrojos frente a otras técnicas. *Vida Rural*, 310: 60-65.
https://www.mapa.gob.es/app/publicaciones/art_datos.asp?articuloid=3681&codrevista=Vrural
- García D. (1999).** Evaluación agronómica de residuos orgánicos mediante caracterización fisicoquímica y bioensayos de laboratorio e invernadero. [Proyecto Fin de Carrera. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC]
- Iglesias E. & Pérez V. (1989).** Evaluation of City Refuse Compost Maturity: A Review. *Biological Wastes*, 27: 115-142. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90039-6)
- Komilis D.P. (2015).** Compost quality: Is research still needed to assess it or do we have enough knowledge? *Waste Management*, 38: 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.023>
- Komilis D.P. & Tziouvaras I.S. (2009).** A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Management*, 29: 1504–1513. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.10.016>
- Martínez S., Vela A., Botero A., Arandia F. & Mollinedo P. (2010).** Nuevo micro-bioensayo de ecotoxicidad de extractos acuosos de plantas medicinales sobre *Daphnia magna* sp, 27.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602010000100005
- Martínez M.M., Pliego L., Robles & C. Zárate, G. (2020).** Fitotoxicidad de materiales compostados destinados para uso agrícola. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 7: 64-75.
<https://docplayer.es/213446783-Fitotoxicidad-de-materiales-compostados-destinados-para-uso-agricola-1-phyto-toxicity-of-composed-materials-intended-for-agricultural-use-resumen.html>
- Mengel K. & Kirkby E.A. (2001).** Principles of plant nutrition. 5th ed, *Kluwer Academic*. ISBN: 978-94-010-1009-2.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (2021).** Anuario de estadística forestal 2019. ISBN: 978-84-18508-49-3.

https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/aef2019_completo_estandar_tcm30-534526.pdf

Nolan T., Troy S.M., Healy M.G., Kwapinski W., Leahy J.J. & Lawlor P.G. (2011). Characterization of compost produced from separated pig manure and a variety of bulking agents at low initial C/N ratios. *Bioresource Technology*, 102: 7131–7138. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.066>

Núñez M. & Hurtado J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Revista Peruana de biología*, 12: 165-170. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332005000100018

Orden MAM/304/2002 de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. *Boletín Oficial del Estado*, Madrid 19 de febrero de 2002, 43: 6494-6515.

Orden Ministerial de 13 de octubre de 1989, por la que se determinan los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos. *Boletín Oficial del Estado*, Madrid 10 de noviembre de 1989, 270: 35216-35222.

Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid 1 de noviembre de 1990, 262: 2339-32340

Real Decreto 865/2010, de 2 de julio, sobre sustratos de cultivo. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid 14 de julio de 2010, 170: 61831-61859.

Román P., Martínez M.M. & Pantoja A. (2013). Manual de Compostaje del Agricultor. Experiencias en América Latina. FAO. E-ISBN 978-92-5-307845-5. <https://www.fao.org/3/i3388s/i3388S.pdf>

Sánchez R. (2017). Nueva estrategia para el aprovechamiento del sarmiento: utilización de sus extractos en la viña y su efecto en la calidad del vino. [Tesis Doctoral. Universidad de Castilla - La Mancha]

Selim S.M., Zayed M.S. & Atta H.M. (2012). Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *Nature and Science*, 10: 469-475.

HLPE, The High Level Panel of Expert son Food Security and Nutrition. (2014). Food losses and waste in the context of sustainable food systems. A report by the High Level Panel of Experts on Food Security y Nutrition of the Committee on World Food Security. <https://www.fao.org/3/i3901e/i3901e.pdf>

- Tiquia S.M. (2000).** Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig – on – litter system. *Proceedings of the International Composting Symposium*, 625-647.
https://www.academia.edu/23009812/Evaluating_Phytotoxicity_of_Pig_Manure_from_the_Pig-on-Litter_System
- Tiquia S.M. (2010).** Reduction of compost phytotoxicity during the process of decomposition. *Chemosphere*, 79: 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.040>
- Tiquia S.M. & Tam N.F.Y. (1988).** Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technology* 65: 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00024-8)
- Trevizan L.C., Santos D., Elgul R., Dias N., Seimi C., Nunes L.C., Aparecida I. & Krug F.J. (2008).** Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. *Spectrochimica Acta Part B*, 63: 1151-1158. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.08.005>
- UNE EN 13652:2001. (2001).** Mejoradores del suelo y sustratos de cultivo. Extracción de nutrientes y elementos solubles en agua.
- UNE EN 6341:2012. (2012).** Calidad de Agua. Determinación de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, crustacea). Ensayo toxicidad aguda.
- UNE EN 13037:2012. (2012).** Mejoradores del suelo y sustratos de cultivo. Determinación del pH.
- UNE EN 13038:2012. (2012).** Mejoradores del suelo y sustratos de cultivo. Determinación de la conductividad eléctrica.
- Valero Yáñez M. (1989).** El reciclaje: el cambio ecológico de los Residuos Urbanos y Medio Ambiente. Ed. Univ. Autónoma de Madrid. Cantoblanco, Madrid. 3: 189-205.
- Varnero MT., Orellana R., Rojas C. & Santibañes C. (2006).** Evaluación de especies sensibles a metabolitos fitotóxicos mediante bioensayos de germinación. *El Medioambiente en Iberoamérica: Visión desde la Física y la Química en los albores del siglo XXI*, 3: 363-369.
- Varnero MT., Rojas C. & Orellana R. (2007).** Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 7:28-37.
https://www.researchgate.net/publication/268516946_Indices_de_fitotoxicidad_en_residuos_organicos_durante_el_compostaje

- Xue W., Hu X., Wei Z., Mei X., Chen X. & Xu Y. (2019).** A fast and easy method for predicting agricultural waste compost maturity by image-based deep learning. *Bioresource Technology*, 290: 121761. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121761>
- Yan Y., Guoying W., Guoxue L., Ruonan M., Yilin K. & Jing Y. (2021).** Selection of sensitive seeds for evaluation of compost maturity with the seed germination index. *Waste Management*, 136: 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.09.037>
- Yuan L., Jie L., Guangming Z., Ming C., Dan M., Guoxue L. & Difang Z. (2018).** Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, 71: 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.023>
- Zapata N., Guerrero F. & Polo A. (2005).** Evaluación de corteza de pino y residuos urbanos como componentes de sustratos de cultivo. *Agricultura técnica*, 65: 387-387. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072005000400004>
- Zubillaga M.S., Branzini A. & Silvio R. (2008).** Problemas de fitotoxicidad en compost. *Revista Pilquen*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3360572>
- Zucconi F., Pera A., Forte M. & DeBertoli M. (1981).** Evaluation toxicity of immature compost. *BioCycle*, 22: 54-57.

6.1. Referencias de internet

Ajuntament d'Elx (s.f.). "El Palmeral" (Consultado 04/06/2022). Disponible en:

<https://www.elche.es/museos/museo-del-palmeral/el-palmeral-de-elche/>

COI, Consejo Oleícola Internacional (2021). "Producción de aceite de oliva" (Consultado: 15/06/2022).

Disponible en:

<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/12/IOC-Olive-Oil-Dashboard-1.html#production-2>

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2013). "La seguridad alimentaria y nutricional debe ser el principal objetivo de desarrollo" (Consultado: 08/04/2022). Disponible en: <https://www.fao.org/news/story/es/item/169886/icode/>

INE, Instituto Nacional de Estadística (2021). “Estadística sobre recogida y tratamiento de residuos. Año 2019”
(Consultado: 06/04/2022). Disponible en: https://www.ine.es/prensa/residuos_2019.pdf

MITECO, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (s.f. a). “Sector agrícola y ganadero”
(Consultado: 06/06/2022). Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/cambio-climatico/temas/mitigacion-politicas-y-medidas/agricola.aspx>

MITECO, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (s.f. b). “Aceite de oliva” (Consultado: 22/06/2022). Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceite.aspx>

MITECO, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (s.f. c). “Lodos de depuración de aguas residuales” (Consultado: 05/06/2022). Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>

OIV, Organización Internacional de la Viña y el Vino (2019). “Superficie (ha) de viñedos en España”
(Consultado: 24/06/2022). Disponible en:
<https://www.oiv.int/es/statistiques/?year=2019&countryCode=ESP>

ONU, Organización de las Naciones Unidas (2015). “Objetivos de desarrollo sostenible” (Consultado: 08/04/2022). Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

6.2. Figuras

Todas las figuras son de elaboración propia, excepto las figuras 1 y 3.

Figura 1: Objetivos de desarrollo sostenible. ONU, Organización de las Naciones Unidas (2015).
<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

Figura 3: Hembra de *Daphnia magna* con huevos en su interior. Marek Mis (2019).
<https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2019-photomicrography-competition/pregnant-daphnia-magna-small-planktonic-crustacean>