



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio de aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR y de compost procedente de la fracción orgánica de residuos urbanos.

Autor

Cristina Quiñones Martínez-Aldama

Directora

Andrea López Martín

Ponente

Rosa Mosteo Abad

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2020

Estudio de aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR y de compost procedente de la fracción orgánica de residuos urbanos.

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo pongo fin a una gran etapa de mi vida en la que he sido muy feliz. Este proyecto ha supuesto para mí un crecimiento tanto personal como profesional. Ha abarcado un periodo intenso de esfuerzo y aprendizaje, que no hubiera sido posible sin las personas que me rodean. Es por ello, que me gustaría agradeceréselo.

En primer lugar, a Rosa Mosteo por darme la oportunidad y la confianza de haber podido realizar el trabajo de fin de grado a su lado, así como la ayuda y el tiempo dedicado en todo momento.

A Andrea López, mi guía en este proyecto, por su comprensión, dedicación, enseñanza, apoyo y conocimientos aportados durante todo este periodo. Gracias.

En general, a todas las personas que forman el grupo de investigación, en especial al personal del laboratorio de Agua y Salud Ambiental que han estado presentes en la realización de mi trabajo.

A la colaboración con NILSA (Navarra de Infraestructuras Locales S.A.) en el proyecto LIFE-IP NAdapta-CC (LIFE 16 IPC001, “Hacia una implementación completa, coherente e integrada de la política de adaptación al cambio climático en la región de Navarra - Towards an integrated, coherent and inclusive implementation of Climate Change Adaptation policy in a region: Navarre” en el marco del programa europeo LIFE2016 Integrated Projects), cofinanciado por el Programa LIFE de la Unión Europea, del que NILSA es socia beneficiaria.

Y por último, me gustaría dar las gracias a mis padres y hermana, por todo el apoyo y energía recibido a lo largo de toda la carrera y de la realización de este trabajo y por ser siempre mi pilar, sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Gracias por habérmelo dado todo.

También, a la familia que se elige, como son mis amigos, mis compañeras de piso y toda la gente que por suerte me llevo de esta ciudad. Gracias por haberme hecho vivir esta experiencia al máximo.

Cada página de este trabajo está dedicada a vosotros.

Estudio de aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR y de compost procedente de la fracción orgánica de residuos urbanos.

RESUMEN

Con objeto de abordar la problemática ambiental asociada a la generación y gestión de residuos, en el actual proyecto se plantea una solución como es la aplicación de enmiendas orgánicas a partir de residuos de distinta naturaleza (fracción orgánica de residuos sólidos urbanos y lodos de depuradora), con el fin de fomentar su uso como fertilizante agrícola, evitando su eliminación (deposición en vertederos), a la vez que mediante el control de sustancias contaminantes se pretende minimizar el riesgo ambiental y sanitario asociado y se contribuye al uso eficiente de recursos (economía circular).

En el trabajo se realiza una caracterización microbiológica y físico-química en un terreno experimental en el que se aplican las enmiendas objeto de estudio. En concreto, se determinan coliformes totales, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, DQO, pH... Además, se pone en marcha el método Índice de Germinación y se determina su validez como indicador de la madurez de las muestras.

Se realizan tres muestreos en el terreno tomando muestras de suelo y mezclas: el primero antes de la aplicación de las enmiendas y los otros dos tras la siembra de estas para analizar su evolución en el tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que hay un aumento de la materia orgánica tras la aplicación de las enmiendas y que no empeora la calidad microbiológica de los suelos. Además, las primeras determinaciones del Índice de Germinación plantean el uso de este indicador como eficaz, sencillo y económico para la detección de la fitotoxicidad y madurez en las enmiendas.

GLOSARIO

AD: Agua Destilada

AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación

ATAD: Digestión Aerobia Termófila Autosostenida

CCA: Chormogenic Coliform Agar

CPEN: Corporación Pública Empresarial de Navarra

DQO: Demanda Química de Oxígeno

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

FORSU: Fracción Orgánica de Residuo Sólido Urbano

IG: Índice de Germinación

ISO: International Standard Organization

L.D.: Límite de Detección

NILSA: Navarra de Infraestructuras Locales S.A.

NMP: Número Más Probable

Qi: Caudal en un determinado punto i de la línea de tratamiento de la depuradora

RD: Real Decreto

SCi: Mezcla de suelo y compost

SInor: Mezcla de suelo y fertilizante inorgánico

SFi: Mezcla de suelo y fango

SM: Standard Methods

TBX: Agar Glucurónico triptona y bilis

UE: Unión Europea

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNE: Norma Española

UZ: Universidad de Zaragoza

θ_{hi} : Tiempo de retención en la instalación i

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN	III
GLOSARIO.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	VII
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES Y MARCO LEGAL RELATIVO A LAS ENMIENDAS ORGÁNICAS OBJETO DE ESTUDIO	5
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	7
3.1 Descripción de las enmiendas orgánicas.....	7
3.2 Descripción del terreno y aplicación de enmiendas orgánicas	8
3.3 Toma de muestras	10
3.4 Metodología analítica.....	12
3.4.1 Parámetros físico-químicos	12
3.4.2 Parámetros microbiológicos.....	12
3.4.2.1 Preparación de muestras y diluciones seriadas.....	13
3.4.2.2 Procedimientos de recuento en placa.....	14
3.4.2.3 Preparación de placas con los medios de cultivo	14
3.4.2.4 Descripción del método de placa difusa y filtración en membrana.....	14
3.4.2.5 Recuento de colonias y expresión de resultados	15
3.4.2.6 Procedimiento del método del Número Más Probable (NPM)	16
3.4.3 Índice de Germinación	18
4. RESULTADOS	21
4.1 Puesta en marcha y optimización del método de pretratamiento de las muestras sólidas.....	21
4.2 Control de parámetros microbiológicos y físico-químicos durante el estudio de aplicación agrícola de las enmiendas	22
4.2.1 Análisis del agua de riego	22
4.2.2 Aplicación de las enmiendas orgánicas en el suelo	23
4.2.2.1 Muestreo inicial	23
4.2.2.2 Muestreo tras 5 semanas desde el abonado	27
4.2.2.3 Muestreo tras 9 semanas de abonado	29

4.3 Propiedades fitotóxicas y madurez de las enmiendas: estudio de Índice de Germinación.....	31
4.3.1 Optimización del método Índice de Germinación	31
4.3.2 Aplicación de las enmiendas al terreno: estudio de Índice de Germinación .	33
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37
7. ANEXOS.....	40
A. Descripción de las instalaciones para el proceso de compostaje	40
A.1. Pila estática aireada	40
A.2. Pila volteada	40
B. Límites fijados en el RD 506/2013 para aplicación agrícola de compost a partir de FORSU.....	41
C. Descripción de los tratamientos para el fango	42
C.1. Espesamiento	43
C.2. Digestión aerobia termófila autosostenida	43
C.3. Deshidratación centrífuga.....	44
C.4. Secado solar.....	44
C.5 Descripción de la planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR).....	45
C.6 Aplicación de fangos de EDAR en agricultura	46
D. Valores límite para la aplicación de fangos en suelos agrícolas	48
E. Metodología analítica. Parámetros microbiológicos.....	49
E.1 Protocolo de trabajo en el laboratorio de microbiología del grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental	49
E.2 Consideraciones iniciales.....	52
E.3 Preparación de placas con los medios de cultivo.....	53
E.4 Método del Número Más Probable (NMP).....	54
F. Resultados de laboratorios externos.....	55
F.1 Caracterización físico-química	55
F.4 Grado de madurez: índice de germinación	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico economía circular (Fundación Ecolec, 2019)	1
Figura 2. Infografía tratamiento y recogida de residuos en España (año 2017) (INE, 2019).....	2
Figura 3. Maquinaria empleada para el cribado: a) Cribadora; b) Compost cribado	7
Figura 4. Cultivo de maíz en terreno experimental	9
Figura 5. División de la parcela según la enmienda aplicada.....	10
Figura 6. Imágenes del terreno. a) Fracción de una de las muestras; b) Suelo arcilloso con brotes de maíz	11
(S+INOR: mezcla de suelo y fertilizante inorgánico; SCi: mezcla de suelo y compost; SFi: mezcla de suelo y fango). Figura 7. Línea temporal de la toma de muestras	11
Figura 8. Bolsas de homogenización estériles.....	13
Figura 9. Esquema del procedimiento para realizar diluciones seriadas	13
Figura 10. Descripción del método a) Empleo del asa para esparcir el volumen; b) Colocación del filtro en la placa; c) Filtración	15
Figura 11. Colonias de coloración positiva a) Medio CCA; b) Medio TBX.....	16
Figura 12. Procedimiento e imágenes del análisis mediante la técnica del NMP	17
Figura 13. Esquema del proceso de detección de positivos en el método del NMP	18
Figura 14. a) Equipo de filtración; b) Placas con semillas dentro de la estufa.....	19
Figura 15. Metodología Índice de Germinación a) Semillas impregnadas con el extracto de la muestra; b) Semillas germinadas	20
Figura 16. Resto de fango sobre la superficie del suelo tras 9 semanas desde abonado	30
Figura 17. Muestra del ensayo IG sin filtrar.....	32
Figura 18. Semillas tras 24 horas de incubación	34
Figura 19. Semillas de rábano germinadas tras 120 horas de incubación	35
Figura A1. Pila estática aireada; b) Sistema de aireación mediante canales	40
Figura A2. Pilas volteadas	40
Figura A3. Esquema generación y tratamiento de lodos (Gobierno de España, 2019)..	42
Figura A4. Tanque para el espesamiento de fangos	43
Figura A5. Digestor ATAD	44
Figura A6. Esquema de funcionamiento invernadero para el secado solar de fangos (Interempresas S.L.U., 2016).....	45
Figura A7. Dibujo esquemático de la EDAR y vista real.....	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Volumen y peso de materia inicial y final en cada pila.....	8
Tabla 2. Parámetros físico-químicos de control	12
Tabla 3. Temperatura y tiempo de incubación de cada medio de cultivo para la determinación de cada microorganismo con los procedimientos de recuento en placa .	15
Tabla 4. Clasificación del grado de fitotoxicidad según los valores obtenidos en el test de germinación (Hitzl, Mendez, & Renz, 2018).....	20
Tabla 5. Ensayos de pretratamiento de la muestra para el análisis microbiológico	21
Tabla 6. Optimización del pretratamiento (extracción sólido-líquido) de una muestra sólida.....	22
Tabla 7. Caracterización físico-química del agua de riego	23
Tabla 8. Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego en la UZ.....	23
Tabla 9. Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego (Lab. Eolisa)	23
Tabla 10. Caracterización físico-química del suelo arcilloso (M_suelo) antes de ser abonado (INTIA)	24
Tabla 11. Caracterización microbiológica (UFC/g de muestra seca) del suelo en UZ ..	24
Tabla 12. Caracterización microbiológica del suelo en Eolisa.....	25
Tabla 13. Caracterización inicial físico-química del compost (L.Alfaro).....	25
Tabla 14. Necesidades nutricionales del maíz (Miguel et al., 2019).....	25
Tabla 15. Caracterización inicial físico-química del fango (L.Alfaro)	26
Tabla 16. Caracterización microbiológica (UFC/g muestra seca) de fango y compost previa al abonado.....	26
Tabla 17. Caracterización microbiológica de las enmiendas orgánicas en Eolisa	26
Tabla 18. Comparación resultados con estudios anteriores (UFC/g) (López Martín, 2017).....	27
Tabla 19. Caracterización físico-química tras 5 semanas desde el abonado (UZ)	27
Tabla 20. Caracterización microbiológica (UFC/g) de las muestras tras 5 semanas de abonado (UZ).....	28
Tabla 21. Caracterización físico-química de las muestras tras 9 semanas de abonado..	29
Tabla 22. Caracterización microbiológica (UFC/g) tras 9 semanas desde el abonado ..	30
Tabla 23. Resultados Índice de germinación primer ensayo	31
Tabla 24. Resultados Índice de germinación segundo ensayo	32
Tabla 25. Resultados Índice de germinación tercer ensayo.....	32
Tabla 26. Resultados Índice de germinación segundo muestreo.....	33
Tabla 27. Resultados Índice de germinación tercer muestreo <i>Lepidium sativum</i>	34
Tabla 28. Resultados Índice de germinación tercer muestreo <i>Raphanus sativus</i>	35
Tabla A1. Caudal de carga de diseño y valores reales medios de tratamiento en la EDAR	46
Tabla A2. Parámetros operacionales de la EDAR.....	46
Tabla A3. Valores límite de metales en fangos y suelo, según RD 1310/1990.....	48
Tabla A4. Criterios de calidad para microorganismos en lodos (Europeo, 2000, 2003, 2010).....	48
Tabla A5. Material y reactivos para el análisis microbiológico (López Martín, 2017) .	52
Tabla A6. Instrumentos para llevar a cabo el análisis microbiológico (López Martín, 2017).....	52

Tabla A7. Normas de análisis y medios de cultivo empleados para la determinación de microorganismos mediante el recuento en placa (López Martín, 2017)	53
Tabla A8. Comprobación de positivos mediante datos tabulados.....	54
Tabla A9. Caracterización físico-química inicial suelo 1 (0-30cm).....	55
Tabla A10. Caracterización físico-química inicial suelo 2 (30-60cm).....	56
Tabla A11. Caracterización físico-química inicial suelo 3 (0-30 cm).....	57
Tabla A12. Resultados IG primer ensayo.....	58
Tabla A13. Resultados IG segundo ensayo	59
Tabla A14. Resultados IG tercer ensayo	60
Tabla A15. Resultados IG segundo muestreo	61
Tabla A16. Resultado IG tercer muestreo (<i>Lepidium Sativum</i>).....	62
Tabla A17. Resultados IG tercer muestreo (<i>Raphanus sativus</i>).....	63

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, uno de los principales objetivos a nivel europeo es la protección del medio ambiente y de la salud humana. Por ello, la Directiva Marco de Residuos (Directiva 2008/98/CE-DMR) ha introducido un cambio importante en la prevención y reducción de los impactos adversos derivados de la generación y gestión de residuos. Además, promueve el uso eficiente de recursos, un aspecto primordial dentro de la economía circular.

En España, la ley 22/2011, de 28 de julio de residuos y suelos contaminados transpone la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo generándose una orientación comunitaria de la política de residuos. Así, el objeto principal de esta ley se centra en la regulación de la gestión de residuos y del régimen jurídico de los suelos contaminados.

Este tipo de planteamiento permite sustituir el modelo de economía actual, la economía lineal, basado en la extracción intensiva de recursos para generar bienes y servicios, que una vez cumplida su utilización, se eliminan, por otro tipo en el que los residuos se incorporen de nuevo al proceso productivo evitando así su eliminación, tal y como se observa en la figura 1.



Figura 1. Gráfico economía circular (Fundación Ecolec, 2019)

Asimismo, la normativa introduce una nueva jerarquía en cuanto a la gestión de residuos que permitirá seguir un camino claro en la gestión y en la prevención de estos. Las opciones de gestión por orden de prioridad son: la prevención, la reutilización, el

reciclaje, otros tipos de valorización y por último la eliminación (el depósito en vertedero entre otras). (Mosteo, 2019; Sarasa, 2018)

La nueva normativa, además, incluye un nuevo término como es el denominado “biorresiduo” correspondiente a los residuos de parques y jardines, residuos alimenticios procedentes de hogares, restaurantes y de plantas de transformación de alimentos. Este tipo de residuos comprenden la fracción principal de los residuos sólidos urbanos. Hace pocos años el destino final de estos residuos era la incineración o su depósito en vertederos, y aunque en muchos países esta situación persiste, otros han considerado métodos más sostenibles para la gestión de residuos. Tal y como se muestra en la figura 2, en el año 2017 casi un 40% de los residuos se sometieron a reciclado en España.



Figura 2. Infografía tratamiento y recogida de residuos en España (año 2017) (INE, 2019)

Entre los tratamientos que permiten el reaprovechamiento de recursos, el compostaje es una tecnología aerobia de bajo coste que permite transformar residuos orgánicos en materiales biológicamente estables que pueden utilizarse como enmiendas y abonos del suelo disminuyendo el impacto ambiental asociado con los residuos y posibilitando el aprovechamiento de los recursos que contienen. (Tortosa, 2008)

Destinar la fracción orgánica de residuos al compostaje y emplearla posteriormente como enmienda orgánica en agricultura tiene muchas ventajas. Entre ellas, se ha demostrado que su uso puede mejorar y mantener la producción de los suelos, aumentar su capacidad hídrica, reducir la cantidad de fertilizantes químicos que se usan y disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero. (Bernstad et al., 2016; Cerda et al., 2018; López, 2018).

Los terrenos fértiles son indispensables para poder llevar a cabo una agricultura productiva y sostenible. Se entiende por fertilidad del suelo a su capacidad para

suministrar todos y cada uno de los nutrientes que necesitan las plantas en cada momento, en la cantidad necesaria y de una forma asimilable, para que estas puedan llevar a cabo sus procesos fisiológicos y metabólicos y desarrollarse sin problemas.

Los nutrientes se clasifican en macronutrientes (carbono, hidrógeno nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y calcio) que suponen un 99% de la masa y micronutrientes (hierro, zinc, cobre, manganeso, boro, níquel y cloro), que son necesarios ya que catalizan numerosas reacciones del metabolismo vegetal. Aunque estos últimos se consideran tóxicos por encima de determinadas concentraciones (García-Serrano et al., 2009; López Martín, 2017).

En España, la aplicación agrícola de compost a partir de Fracción Orgánica de Residuo Sólido Urbano (FORSU) está regulada mediante el Real Decreto 506/2013. Sin embargo, no hay normativa que regule el control tras la adquisición del producto y su posterior aplicación.

Por otro lado, los fangos generados en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) también se consideran un producto susceptible de utilización en el marco de una economía circular. En concreto, la Ley 22/2011 considera que los fangos de EDAR que se tratan en la propia instalación y se aplican al suelo serán “subproducto” y “no residuo” al ser una fuente importante de nutrientes y materia orgánica. Actualmente, esta aplicación se regula a través del Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, en el que se establecen límites o criterios de calidad para algunos metales, pero no para gérmenes patógenos.

Los tratamientos aplicados a los fangos generados en las EDARs suelen ser de estabilización e higienización para reducir su capacidad de fermentación, y con ello, el olor y los microorganismos potencialmente patógenos presentes.

Así mismo, la supervivencia de los microorganismos aplicados al suelo depende principalmente de las condiciones ambientales, el pH, la humedad, el tiempo de retención en los fangos y las características de los organismos presentes. En ocasiones los cultivos en contacto con los fangos son capaces de retenerlos y pueden causar problemas relacionados con la salud pública, si estos se ingieren como alimentos de consumo en crudo. Además, los animales pueden jugar un papel importante en los ciclos infecciosos, ya que pueden entrar en contacto con los biosólidos aplicados al suelo, infectarse y transportar después esta infección a otras zonas. (López Martín, 2017)

Igualmente, el interés y la sensibilidad de los consumidores y la opinión pública para la compra de productos obtenidos mediante métodos de producción respetuosos con el medio ambiente han aumentado considerablemente. En este contexto, la importancia de producir de una forma sostenible es de vital interés para las explotaciones agrícolas.

Son escasos los estudios realizados a escala real sobre el comportamiento y evolución de los microorganismos indicadores de contaminación microbiológica en suelos agrícolas abonados con diferentes enmiendas en una misma campaña y con el mismo cultivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, es evidente la importancia de evaluar los beneficios y riesgos potenciales de la aplicación de lodos y desechos orgánicos en abono a los suelos agrícolas. (Alvarenga et al., 2015; López et al., 2019; Pergola et al., 2018)

El presente trabajo tiene como objetivo general el control de sustancias contaminantes en suelo agrícola tras la aplicación de enmiendas orgánicas a partir de residuos de distinta naturaleza (fracción orgánica de residuos y fangos de depuradora), con el fin de fomentar su uso como fertilizante agrícola, evitando su eliminación mediante la deposición en vertederos, minimizando así el riesgo ambiental y sanitario asociado y contribuyendo al uso eficiente de recursos (economía circular).

En este trabajo fin de grado, se realizará la caracterización microbiológica y físico-química en un terreno experimental en el que se aplicarán las enmiendas objeto de estudio. Los análisis se realizan antes de la aplicación de las enmiendas y tras la siembra de estas para obtener una observación temporal.

El estudio se realiza en colaboración entre el grupo de investigación de referencia del Gobierno de Aragón “Agua y Salud Ambiental” perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza y Navarra de Infraestructuras Locales S.A. (NILSA) en el ámbito del siguiente contrato de investigación y proyecto de investigación:

- *Estudio de investigación sobre la aplicación de tecnologías de compostaje, en el tratamiento de residuos orgánicos para su valorización agronómica*, financiado por NILSA.
- Acción C4.1 del proyecto LIFE-IP NAdapta-CC (LIFE 16 IPC001, “*Hacia una implementación completa, coherente e integrada de la política de adaptación al cambio climático en la región de Navarra - Towards an integrated, coherent and inclusive implementation of Climate Change Adaptation policy in a region: Navarre*” en el marco del programa europeo LIFE2016 Integrated Projects), cofinanciado por el Programa LIFE de la Unión Europea, del que NILSA es socia beneficiaria”. En concreto, la acción C4.1 está liderada por INTIA, una sociedad pública adscrita al Gobierno de Navarra cuya misión es la transferencia e innovación en el sector agroalimentario. (INTIA, 2019)

2. ANTECEDENTES Y MARCO LEGAL RELATIVO A LAS ENMIENDAS ORGÁNICAS OBJETO DE ESTUDIO

El suelo agrícola es un recurso inestimable y limitado, cuyo potencial agronómico actual se debe a la labor desarrollada por el hombre durante siglos. La degradación irreversible de este recurso supone no sólo destruir el bien máspreciado de los agricultores, sino hipotecar las oportunidades agrícolas de generaciones futuras. Por este motivo, la protección del suelo constituye un objetivo prioritario en un buen abonado, para garantizar su fertilidad y su valor agronómico, presente y futuro.

La aparición de nuevos productos que contienen nutrientes para las plantas y capacidad fertilizante no debe ser obstáculo para que se olviden sus posibles repercusiones en la salud y seguridad de las personas y del medio ambiente.

En este contexto y ante la necesidad de normativa básica en materia de productos fertilizantes se aprueba el Real Decreto (RD) 506/213, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes, donde se establecen los límites bacteriológicos, físico-químicos y de metales pesados que se deben controlar para que la aplicación del compost en suelo agrícola no resulte perjudicial para el medio ambiente o para la salud humana. Estos límites se pueden consultar en el Anexo B. (Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, 2013).

El lodo generado en las EDARs puede ser aplicado en suelos agrícolas conforme a lo que se establece en el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. Además, en este RD se hace referencia a la problemática que supone el almacenamiento y la eliminación de lodos procedentes de la depuración de aguas residuales domésticas o urbanas, dada su elevada producción. También, se señala que son una fuente elevada de materia orgánica y nutrientes que permite que su uso sea posible en agricultura.

Por otro lado, se contempla que una de las principales características asociadas a los lodos es la presencia de metales pesados en concentraciones superiores a un cierto umbral. Este hecho hace que se establezcan unos límites en el RD con relación al contenido en metales pesados, para garantizar la calidad del fango y su posterior aplicación.

El Real Decreto 1310/1990 no establece límites en cuanto a parámetros microbiológicos y sin embargo, la presencia de patógenos podría limitar su actividad agrícola y suponer un grave riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Por ello, se publica en España la Orden AAA/1072/2013 sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, cuyo objetivo es establecer la información que las EDARs deben proporcionar en relación con el tratamiento aplicado a sus fangos y además informar sobre la concentración de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y otros contaminantes químicos inorgánicos y orgánicos presentes en el mismo. De esta manera, tanto las instalaciones que tratan los lodos como los gestores responsables de su aplicación agrícola, deben cumplimentar los formularios correspondientes, tal y como

establece el Registro Nacional de lodos, donde se incluyen ciertos indicadores microbiológicos, parámetros agronómicos y metales.

Con el objetivo de establecer un límite microbiológico que determine la minimización de riesgo, la Unión Europea (UE) ha presentado varias guías y normas donde se marcan criterios de calidad relativos a microorganismos indicadores (López Martín, 2017).

Tanto los límites de sustancias y materiales inorgánicas presentes en el fango como los referentes a gérmenes patógenos fijados por la legislación vigente se recogen en el Anexo D.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Descripción de las enmiendas orgánicas

El FORSU y el estructurante a partir del cual se genera el **compost** aplicado en este estudio provienen de una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos de la Comunidad Foral de Navarra. La planta de tratamiento recoge el quinto contenedor de una de las mancomunidades navarras, donde los vecinos han separado previamente la fracción orgánica del resto de residuos urbanos generados. La población aproximada de la mancomunidad es de 31896 habitantes (a fecha de 01/01/2018). (Gobierno de Navarra, 2018)

Para este trabajo, se recogen tanto el FORSU como el estructurante en la planta de tratamiento y se lleva a cabo el proceso de compostaje en las diferentes instalaciones a escala piloto disponibles en la EDAR de Tudela (Navarra). En concreto, se trata de instalaciones para compostar mediante pilas volteadas o pilas estáticas aireadas. En el Anexo C se puede encontrar una breve descripción de cada tipo de instalación.

Las mezclas FORSU:estructurante empleadas para realizar los ensayos en las instalaciones son FORSU:estructurante 1:2 y FORSU:estructurante 1:1. Se realiza una caracterización inicial de ambas matrices, determinando parámetros agronómicos y microbiológicos entre otros. Durante el proceso de compostaje se controla la temperatura de manera continua y se toman muestras para la determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos con el objetivo de ver la evolución temporal de dichos parámetros.

Cuando el compost ha pasado 20 semanas en cada una de las instalaciones, se somete a un proceso de cribado (Figura 3). Con esta técnica se separan los impropios del producto (plástico, vidrio, tela, cáscaras de nuez, etc.). Una vez realizado, la enmienda orgánica se almacena para su posterior utilización.



Figura 3. Maquinaria empleada para el cribado: a) Cribadora; b) Compost cribado

La tabla 1 muestra los pesos y volúmenes iniciales de FORSU y estructurante en cada pila, obtenido en cada instalación, y los pesos y volúmenes finales.

Tabla 1. Volumen y peso de materia inicial y final en cada pila

	PILAS AIREADAS		PILAS VOLTEADAS		TOTAL
	1:2	1:1	1:2	1:1	
Volumen inicial de FORSU (m³)	2	3	2	2	9
Peso inicial de FORSU (kg)	880	1300	880	880	4000
Volumen inicial de estructurante (m³)	4	3	4	2	13
Peso inicial estructurante (kg)	970	720	970	490	3200
Peso inicial de FORSU+estructurante (kg)	19000	2000	1400	1900	7100
Volumen inicial pila (m³)	6	6	6	4	22
Volumen final compost (m³)	2,2	2	2,2	2,3	8,7
Peso final compost (kg)	770	800	770	690	3000
Peso compost/peso FORSU inicial	0,88	0,61	0,88	0,78	0,76

Durante su almacenamiento, se realiza un control mensual y además se lleva a cabo una caracterización final antes de su aplicación agrícola, donde se determinan parámetros físico-químicos y microbiológicos. En cualquier caso, el compost obtenido debe cumplir con lo establecido en el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio sobre productos fertilizantes. (López, 2018)

Por otro lado, el **fango** objeto de análisis en este trabajo para su aplicación agrícola se somete a procesos de estabilización mediante digestión aerobia y posterior deshidratación para su transporte. Además, se han realizado ensayos relacionados con la optimización de metodología analítica de algunas de las determinaciones realizadas en este estudio, con fangos sometidos a otros tratamientos como secado solar o digestión anaerobia. En el Anexo C se puede encontrar una breve descripción de estos procesos y de las instalaciones.

La EDAR de la cual se han obtenido los fangos para este trabajo recibe aguas de origen doméstico e industrial asimilables a urbanas. La población censada era en 2018 de 35595 habitantes y la carga media tratada de 82500 habitantes equivalentes. Las aguas residuales industriales generan un caudal de aproximadamente 168000 m³/año proveniente de la industria agroalimentaria y 371000 m³/año proveniente de la industria papelera y suponen un 60% de la carga orgánica que llega a la EDAR. El cauce receptor del vertido es el río Ebro (López Martín, 2017).

Antes de ser aplicados en suelo agrícola, se realizan las determinaciones exigidas por la legislación vigente.

3.2 Descripción del terreno y aplicación de enmiendas orgánicas

La zona objeto de estudio se encuentra en la Comunidad Foral de Navarra.

El clima en esta zona es de transición entre mediterráneo y atlántico. Se caracteriza por ser templado y cálido. La temperatura promedio anual es de 12.7 °C. Los

veranos son calientes, secos y mayormente despejados y los inviernos son muy fríos y parcialmente nublados. Con una temperatura media de 21.1 °C agosto es el mes más cálido. El mes más frío del año es enero con una media de temperatura de 4.7 °C. Hay precipitaciones durante todo el año, hasta el mes más seco tiene mucha lluvia (julio, 38 mm). El total de las precipitaciones a lo largo del año es de 804 mm al año (Climate-Data, 2019).

El suelo tiene un contenido en arcilla superior al 30 %, esto significa que se trata de tipo de terreno arcilloso. Las características que posee este tipo de suelo son: alta compacidad, baja infiltración y alta capacidad de intercambio térmico, entre otras. La caracterización físico-química del terreno llevada a cabo en una campaña anterior por INTIA, sociedad pública adscrita al Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local, integrada en la Corporación Pública Empresarial de Navarra (CPEN). (INTIA, 2018).

La forma de riego de los campos es por aspersión y cubre toda la superficie cultivable. El agua de riego proviene del Canal de Navarra.

El cultivo sembrado es maíz (*Zea mays*), tal y como se observa en la figura 4. El maíz es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial. Además, se adapta con facilidad a diversas condiciones, pero a su vez es muy exigente en cuanto a la fertilización física del suelo.

Los fangos y compost a partir de FORSU usados se aplican en el suelo en abril de 2019. La recogida de cultivos se prevé que se realice en noviembre de ese mismo año, pero debido a una campaña con elevadas lluvias, se pospone hasta finales de enero.



Figura 4. Cultivo de maíz en terreno experimental

La siembra y aplicación de las enmiendas orgánicas se realiza con la ayuda de una abonadora y sembradora agrícola y en base a las determinaciones de parámetros agronómicos llevadas a cabo por INTIA, con las que calculan la cantidad de enmienda a añadir por hectárea en función de las necesidades nutricionales. Posteriormente ajustan con algún aditivo el nitrógeno, el fósforo y el potasio en caso de ser necesario. Tal y como se puede observar en la figura 5, el terreno se divide en varias filas que se diferencian gracias a la colocación de los aspersores, lo que facilita la toma de muestras. Las enmiendas se aplican por duplicado, es decir, en cuatro filas, dos para lodos (color azul en la figura) y dos para compost (color amarillo). También se deja una parte del

terreno sin abonar pero donde se siembra maíz igualmente, que podemos considerarla como blanco, y otra parcela solo se enriquece con componentes inorgánicos (color verde en la figura).

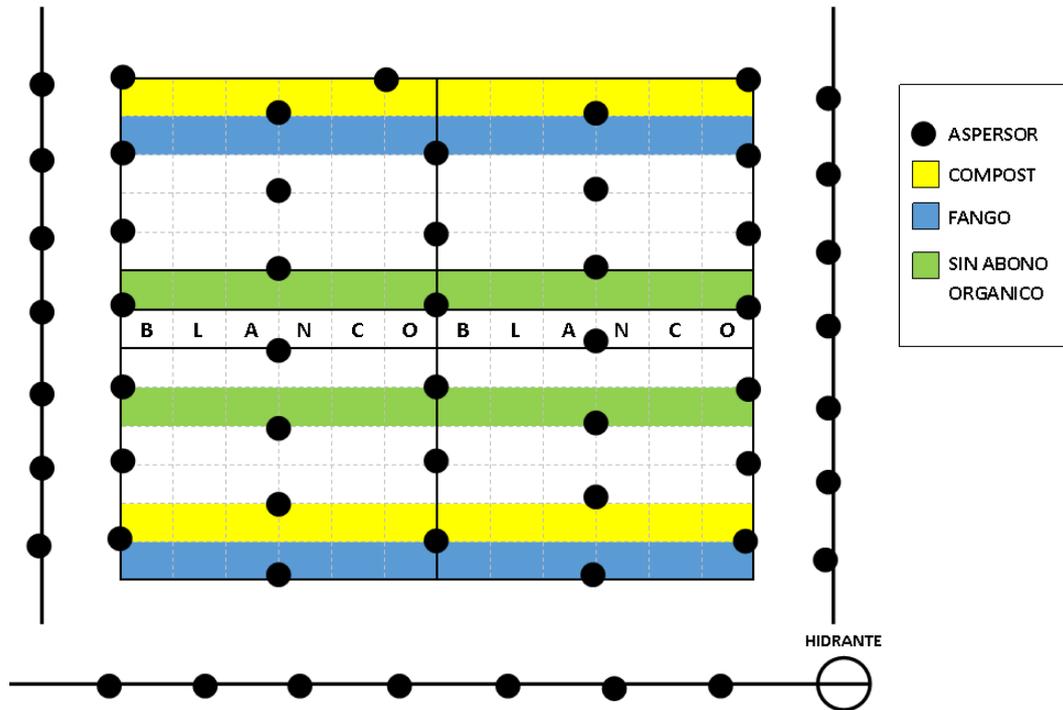


Figura 5. División de la parcela según la enmienda aplicada

3.3 Toma de muestras

Las muestras objeto de estudio en este trabajo son: muestras del suelo sin abonar, muestras de fangos de EDAR tratado antes de añadir al suelo, muestras de compost de FORSU antes de añadir al suelo, muestras de suelo abonado con fangos y con compost, muestras de suelo abonado con fertilizante inorgánico y además, muestras de agua de riego.

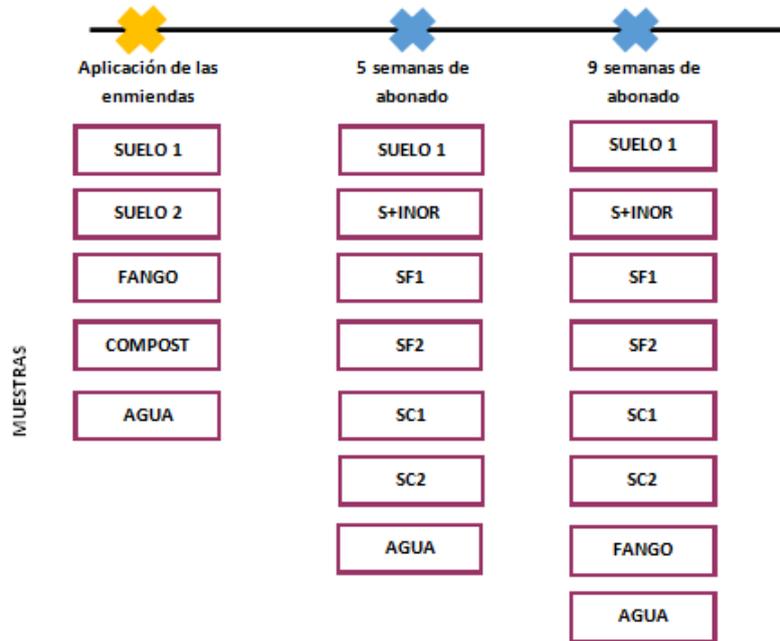
Se realizan tres muestreos separados en el tiempo para un correcto seguimiento. El primero, se realiza el día de la aplicación de los fertilizantes, en abril de 2019. El segundo, se hace tras 5 semanas del primer muestreo, en mayo de 2019. Y el último, se efectúa en junio de 2019. Los muestreos se realizan en días en los que las condiciones climatológicas son más favorables. (Figura 6)

En la figura 7 se observa un esquema en el que aparecen las muestras tomadas en los distintos muestreos efectuados. Así, en el primero se toma una muestra de suelo por duplicado (Suelo 1 y 2), de compost y fango antes de ser aplicado y de agua. A las 5 semanas, se cogen muestras por duplicado de la mezcla de compost y suelo de las dos filas en las que se deposita la enmienda (SC1 y SC2) y de igual modo para el caso de fango y suelo (SF1 y SF2), además de suelo, agua y de la mezcla formada por el suelo y fertilizante inorgánico (S+inor.), todas por duplicado según lo descrito en la figura 5, apartado 3.2. Para el último muestreo, además de las muestras comentadas

anteriormente, se analiza una muestra de fango que se encuentra en la superficie del terreno.



Figura 6. Imágenes del terreno. a) Fracción de una de las muestras; b) Suelo arcilloso con brotes de maíz



(S+INOR: mezcla de suelo y fertilizante inorgánico; SCi: mezcla de suelo y compost; SFi: mezcla de suelo y fango).

Figura 7. Línea temporal de la toma de muestras

La toma de muestras de suelo tanto abonado como sin abonar se realiza mediante un muestro estandarizado. Las parcelas se dividen por cuadrículas (Figura 5, apartado 3.2). En cada cuadrícula se recoge con una pala una porción de suelo a unos 15 cm de profundidad como se puede observar en la figura 6a. Se cogen un total de 12-14 puntos. Cada punto se deposita en un cubo y de toda la mezcla se selecciona una parte por el método cuarteos. Este método consiste en homogeneizar el material, aplanarlo hasta obtener un espesor uniforme, dividir la pila en cuatro partes iguales y seleccionar

partes diagonalmente opuestas. La mezcla seleccionada vuelve a homogeneizarse, aplanarse, cuartearse y seleccionarse sucesivamente hasta obtener el tamaño de muestra requerido, en este caso 500 g (Carter, 1993).

Por otra parte, para el análisis microbiológico, las muestras de fango, compost y agua se recogen en recipientes estériles de 150 y 500 ml y en recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Los análisis microbiológicos se realizan en un tiempo no superior a las 24 horas tras la toma de muestras (ISO & AENOR, 2011, 2013).

3.4 Metodología analítica

3.4.1 Parámetros físico-químicos

La medición de estos parámetros (Tabla 2) está realizada en algunos casos por laboratorios externos (Laboratorios Alfaro S.L. y laboratorio de la EDAR de Tudela), en conjunto con las determinaciones realizadas en el laboratorio del grupo “Agua y Salud Ambiental” de la Universidad de Zaragoza. En concreto se determina pH, conductividad, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Nitrógeno total, Fósforo en forma P_2O_5 y Potasio en forma de K_2O . Además, se determina la humedad de las muestras sólidas que nos indican los valores de los parámetros determinados por gramo de muestra.

Los análisis físico-químicos del suelo antes de la aplicación de las enmiendas están realizados por INTIA.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos de control

PARÁMETRO	UNIDADES
pH	-
Conductividad	$\mu S/cm$
DQO	mg/L
Nitrógeno	mg/L
Fósforo	mg/L
Potasio	mg/L
Humedad	%

3.4.2 Parámetros microbiológicos

Las muestras se analizan en el laboratorio del grupo “Agua y Salud Ambiental” de la Universidad de Zaragoza. En el Anexo E se encuentra el protocolo de trabajo de microbiología del laboratorio. Se determinan tres bacterias: Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* Puntualmente, se analizan en laboratorios externos otros dos microorganismos como son *Clostridium perfringens* y *Salmonella spp.* (Eolisa Laboratorios).

3.4.2.1 Preparación de muestras y diluciones seriadas

En este estudio se analizan en su mayoría muestras sólidas. Solo hay un tipo de análisis en el que las muestras son líquidas (agua de riego).

En el caso de las muestras sólidas, se realiza un pretratamiento antes de su caracterización, cuya metodología se optimiza con muestras reales y en ensayos que se detallan en el capítulo de resultados (apartado 4.1). Se prepara una suspensión inicial pesando aproximadamente 10 g de muestra que se disuelven en 90 ml de agua de dilución estéril. La disolución está contenida en una bolsa estéril de homogenización que tiene un filtro en mitad de la bolsa, como se pueden observar en la figura 8. Este filtro separa la parte líquida extraída de la parte sólida de la muestra. Se realiza una trituration mecánica de la mezcla en la bolsa durante 5 minutos para conseguir la correcta extracción líquida.



Figura 8. Bolsas de homogenización estériles

En las muestras no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente, por lo que en aquellos casos que se prevé una concentración elevada, se realizan diluciones en serie a partir de la muestra inicial, hasta obtener una concentración que pueda determinarse o contabilizarse con fiabilidad. Éstas se utilizan para crear disoluciones diluidas con precisión, a partir de la muestra inicial y se realizan con suero fisiológico estéril (NaCl 0,9%). En la figura 9 se muestra un esquema con los pasos seguidos para preparar las diluciones. (López Martín, 2017)

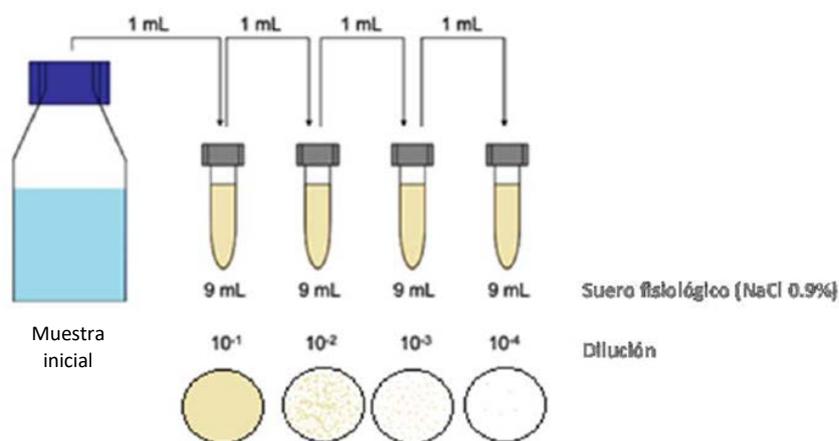


Figura 9. Esquema del procedimiento para realizar diluciones seriadas

3.4.2.2 Procedimientos de recuento en placa

El recuento o cultivo en placa es un procedimiento de recuento de células viables, que se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Con estas consideraciones, los recuentos en placa se expresan como Unidades Formadoras de Colonias (UFC). El procedimiento de recuento en placa se puede realizar por el método de placa difusa, el método del vertido en placa o el método de filtración en membrana y se emplea uno u otro, en función de la concentración microbiológica previsible de la muestra (López Martín, 2017).

En el Anexo E se pueden encontrar las tablas que muestran el material fungible y reactivos necesarios para la realización del análisis.

3.4.2.3 Preparación de placas con los medios de cultivo

Para cada microorganismo se emplea un medio de cultivo distinto. Todos, salvo el agar nutritivo son selectivos a un microorganismo. En este estudio las bacterias que se analizan son Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* En el Anexo E se puede encontrar una tabla que detalla los medios usados para cada microorganismo.

Los medios de cultivo de los que se dispone se encuentran en forma deshidratada. Así, se adiciona una cantidad determinada de medio por volumen de agua desionizada y la mezcla se lleva a ebullición. A continuación, se disponen en botellas y se autoclavan según las especificaciones del medio. Tras este paso, se dejan enfriar hasta 55 °C aproximadamente y se vierten en placas Petri. En algunas preparaciones se necesita añadir un suplemento antes de verter el medio en las placas. Una vez solidificado el medio, las placas se guardan en la nevera. Las placas preparadas se pueden conservar refrigeradas hasta dos meses.

3.4.2.4 Descripción del método de placa difusa y filtración en membrana

El método de placa difusa es un método estandarizado. En este tipo de método las bacterias crecen en la superficie del medio de cultivo. (Figura 10a)

Se añade en las placas un volumen de la muestra diluida (apartado 3.4.2.1), en atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen. Se añade un volumen de 100 µl en cada placa y se distribuye por la superficie de esta con un asa de vidrio estéril. Después, las placas se introducen en la estufa incubadora el tiempo y temperatura establecidos en el método de análisis para la determinación de cada microorganismo como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Temperatura y tiempo de incubación de cada medio de cultivo para la determinación de cada microorganismo con los procedimientos de recuento en placa

PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA/ TIEMPO INCUBACIÓN
Coliformes totales	Agar CCA	36 ± 2°C/ 18±24h
<i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	Agar CCA	36 ± 2°C/ 18±24h
	Agar TBX	44 ± 2°C/ 18±24h
	Agar Maconkey	18±24h
<i>Enterococcus</i> sp.	Agar Slanetz&Bartley	36 ± 2°C/ 40±48h

El método filtración en membrana suele usarse para grandes volúmenes de agua y cuando la concentración microbiológica esperada es pequeña. Cuando se trata de muestras que contienen fangos y suelos existe una limitación del método debido a los sólidos presentes que ensucian el filtro y dificultan el crecimiento adecuado de las bacterias además de impedir el recuento de las mismas.

En primer lugar se coloca un filtro de 0.45 µm en un equipo de filtración en embudo estéril y se hace pasar un pequeño volumen de agua destilada NaCl 0,9% para humedecer el filtro y a continuación un volumen determinado de muestra. El filtro se coloca con unas pinzas estériles sobre una placa Petri que contiene el medio de cultivo (Figura 10b, figura 10c). Una vez colocado el filtro, la placa se introduce en la estufa incubadora el tiempo y temperatura requeridos para cada medio de cultivo (tabla 3). (López Martín, 2017)



Figura 10. Descripción del método a) Empleo del asa para esparcir el volumen; b) Colocación del filtro en la placa; c) Filtración

3.4.2.5 Recuento de colonias y expresión de resultados

Tras el periodo de incubación se realiza el recuento de las bacterias que dan una coloración positiva en cada medio (Figura 11). A continuación se seleccionan las placas

cuyo recuento esté en un rango óptimo de entre 30-300 UFC/placa. Los resultados de la determinación se expresan como UFC/100ml de muestra en muestras de agua y como UFC/g en muestras sólidas. Para expresar los resultados de concentración en las muestras sólidas en base seca (UFC/g) se mide la humedad (Standard Methods (SM) 2540D). En caso de haber realizado alguna dilución de la muestra inicial se aplica la ecuación 1.

$$\frac{\text{UFC}}{100 \text{ mL}} = \frac{\text{UFC}}{\text{mL muestra filtrada}} \cdot 100 \text{ mL} \cdot F_d \quad F_d: \text{factor de dilución} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Ante el desconocimiento de la concentración bacteriana en la muestra, se siembran y/o filtran varias placas con diferentes volúmenes y diluciones, por duplicado, con el fin de asegurar un recuento final apropiado. Por tanto, por cada muestra se cultivan al menos 6 placas para analizar los tres microorganismos, realizándose por tanto entre 75-100 análisis cuando se recogen 5 muestras en el terreno experimental y entre 160-200 análisis cuando se recogen 8 muestras . (López Martín, 2017)

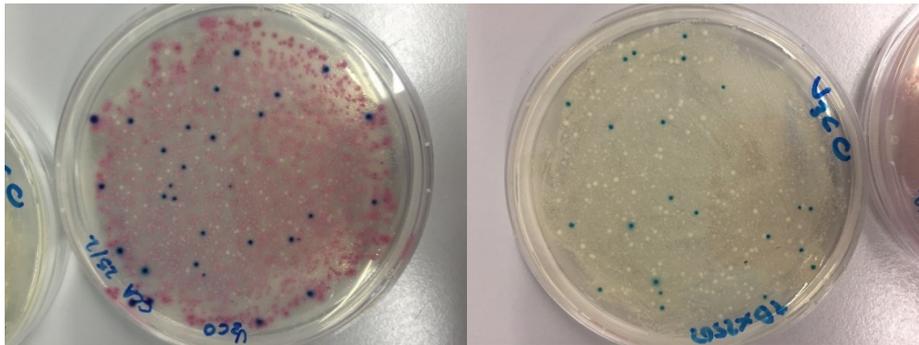


Figura 11. Colonias de coloración positiva a) Medio CCA; b) Medio TBX

3.4.2.6 Procedimiento del método del Número Más Probable (NPM)

Este procedimiento se describe en la norma UNE EN ISO 9308-2. Calidad del Agua. Consiste en realizar pruebas bioquímicas en serie, para detectar y cuantificar al microorganismo objeto de estudio. Este número, basado en fórmulas probabilísticas, es una estimación de la densidad media de microorganismos en la muestra (Eaton et al., 2005). Este método es el recomendado por determinadas normativas para el análisis microbiológico aunque resulta menos reproducible y rápido que otros métodos de análisis (Eaton et al., 2005).

Para llevar a cabo el procedimiento se dispone de al menos tres diluciones de la muestra. Para el método se emplean diferentes caldos de cultivo en función de la bacteria que se quiera analizar. En el caso de este trabajo se analiza por este procedimiento la bacteria *Escherichia coli*. El caldo empleado será glutamato (ISO & AENOR, 2015).

En la figura 12 se muestra un breve esquema del procedimiento llevado a cabo.



Figura 4. Procedimiento e imágenes del análisis mediante la técnica del NMP

En la etapa 1 se vierte 1 ml de muestra inicial o de una dilución a los tubos que contienen el glutamato y se incuban en la estufa durante 24 h a 36 ± 2 °C. Pasado este tiempo, se sacan para su confirmación.

A partir de los tubos positivos de la etapa 1, en la etapa 2, se transfiere un pequeño volumen a otros medios de cultivo selectivo. En este caso, el medio de cultivo será CCA (medio altamente selectivo para *E.coli*). Del mismo modo se mantienen en la estufa durante 24 horas a 36 ± 2 °C.

Pasado este periodo de tiempo, las zonas de la placa donde se ha producido la tinción, será positiva en la bacteria. Tras esto, se establece una combinación de 3 cifras, una por dilución de la muestra disponible, donde cada valor indica el número de tubos. En la figura 13 aparece un esquema representativo.

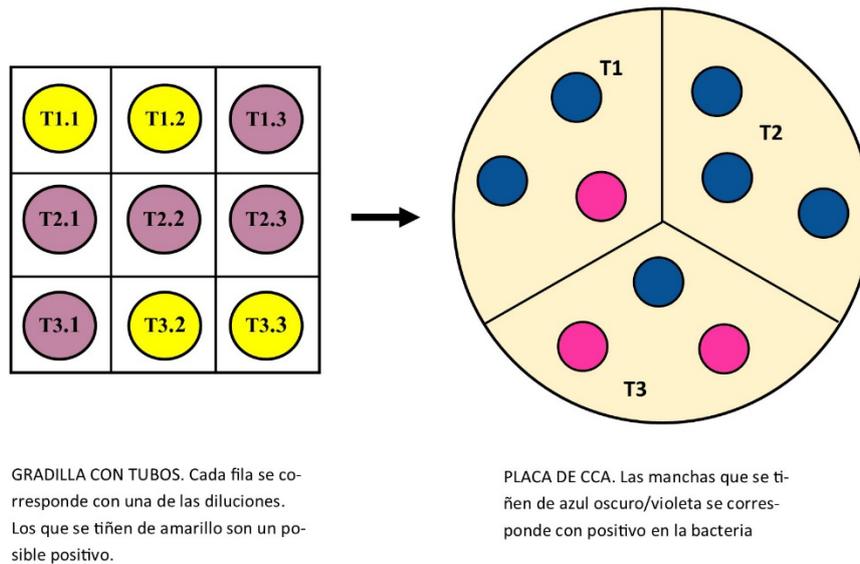


Figura 5. Esquema del proceso de detección de positivos en el método del NMP

La densidad bacteriana se medirá a través de la ecuación 2 y de los valores de la tabla A8 recogida en el Anexo E. Estos datos se corresponden con la distribución de Poisson (dispersión aleatoria) donde se establece una combinación de 3 números y cada número de esa combinación indica la cantidad de tubos positivos de cada dilución. (López Martín, 2017)

$$\frac{\text{NMP}}{100 \text{ ml}} = \left(\frac{\text{NMP tabla}}{100 \text{ ml}} \right) \cdot 10/v \quad \text{[Ecuación 2]}$$

v: volumen de una muestra en la dilución más pequeña

3.4.3 Índice de Germinación

Este método está basado en el bioensayo de germinación propuesto por Zucchini (Zucchini et al., 1981), que se basa en concepto dinámico de la toxicidad. Por una parte, tiene en cuenta el desarrollo diferencial y altamente específico del sistema radicular de las plantas en su respuesta a los distintos sustratos, y por otra, que dicho sustrato puede experimentar variaciones en su composición, dado que a medida que transcurre el tiempo, los elementos fitotóxicos varían en cantidad y calidad (Esteban, 2018).

Para llevar a cabo el ensayo se consulta bibliografía específica, ya que nunca se había realizado esta prueba en este laboratorio donde se lleva a cabo el estudio. Además, se cuenta con un protocolo analítico por parte de CEIT-IK4, un centro de investigación creado por iniciativa de la Universidad de Navarra y con el que se ha colaborado en relación a los procesos de compostaje en las plantas piloto de Tudela (Esteban, 2018; Romero et al., 2014; Luo et al., 2018, 2019; Tortosa, 2013).

El test de germinación necesita un extracto acuoso de las muestras a analizar. Esto se consigue mediante una disolución 1:10, es decir, mezclando 5 gr de la muestra con 50 ml de agua destilada a una temperatura de 60 ° C aproximadamente. La mezcla se mantiene agitando durante 30 minutos y tras este tiempo se filtra. Para filtrar se emplea una bomba centrífuga y un equipo de filtración a vacío como puede observarse en la figura 14a.

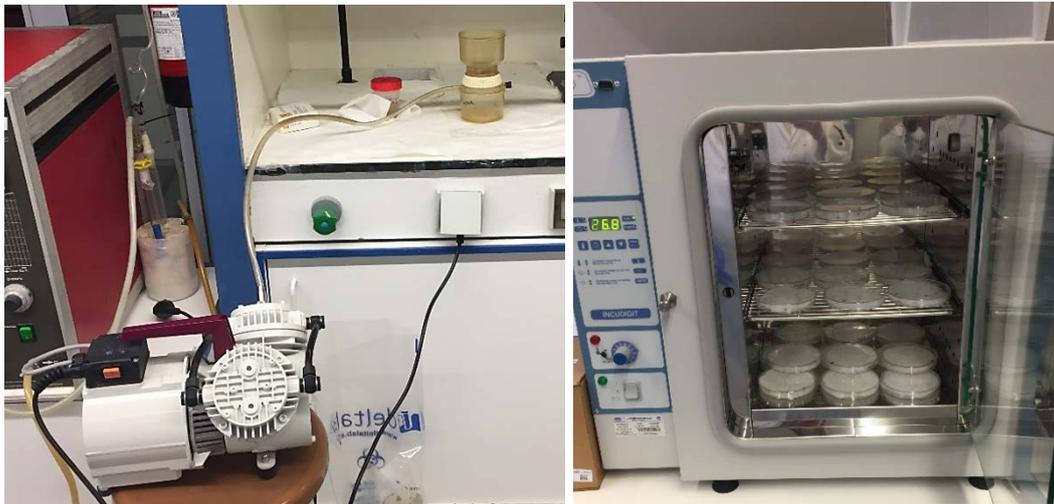


Figura 14. a) Equipo de filtración; b) Placas con semillas dentro de la estufa

Previamente, se prepara una placa de Petri de 9 cm de diámetro con un filtro cubriendo su fondo. En la placa se depositan 10 semillas de berro de jardín (*Lepidium Sativum*) que se impregnan con 3 ml del extracto acuoso de la muestra. Tras esto, las semillas se meten en la estufa incubadora (Figura 14b). A las 24 horas, se hace un recuento de las semillas germinadas y se mide la longitud de las raíces. A las 48 horas se realiza una segunda medida. (Figura 15)

Se han utilizado en ensayos puntuales semillas de rábano (*Raphanus sativus*), como indica la bibliografía consultada, cuyo procedimiento se asemeja al de las semillas de berro de jardín salvo que las semillas de rábano se incuban durante 5 días en una estufa a 22 ° C en oscuridad y a un 80% de humedad, característica que se consigue envolviéndolas con papel de aluminio. Los cálculos se hacen como se describe en la metodología (Tortosa, 2013).

Además de las placas que contienen los extractos, se preparan placas control que se impregnan con agua destilada y extracto de turba comercial.

Cada una de las muestras, tanto las de control como las de estudio se realizan por triplicado.

El índice de germinación (IG) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$IG = \frac{G \cdot L_m}{L_c} \quad \text{[Ecuación 3]}$$

donde:

Estudio de aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR y de compost procedente de la fracción orgánica de residuos urbanos.

G = porcentaje de germinación

L_m = longitud media de las raíces en las placas con muestra filtrada (mm)

L_c = longitud media de las raíces del control (mm)

En general, los valores del índice de germinación se clasifican según los datos recogidos en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación del grado de fitotoxicidad según los valores obtenidos en el test de germinación (Hitzl, Mendez, & Renz, 2018)

VALOR IG	GRADO DE FITOTOXICIDAD
< 50	Alto
50 < IG < 80	Moderado
80 < IG < 100	Fitotoxicidad no confirmada
> 100	Fitonutriente o fitoestimulante

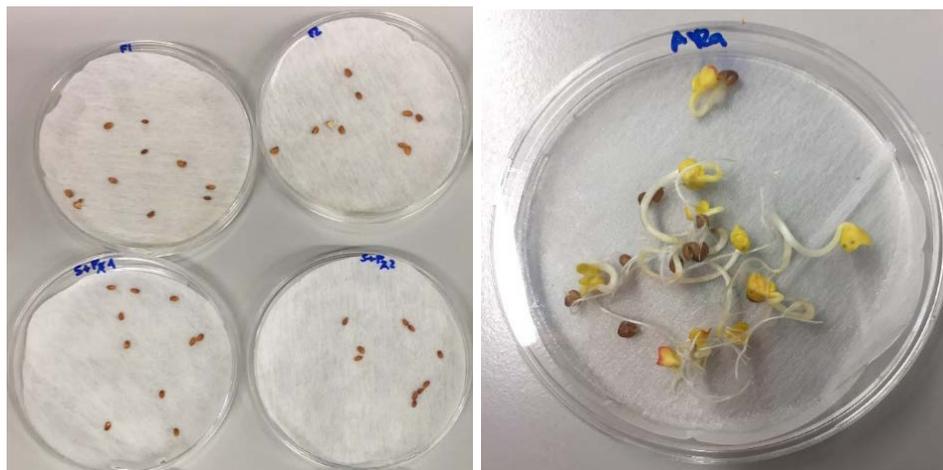


Figura 6. Metodología Índice de Germinación a) Semillas impregnadas con el extracto de la muestra; b) Semillas germinadas

4. RESULTADOS

4.1 Puesta en marcha y optimización del método de pretratamiento de las muestras sólidas

En primer lugar, se realizan unos ensayos para evaluar el crecimiento de la bacteria *E.coli* en distintos medios de cultivo. En ocasiones, se ha observado que no es equivalente utilizar un medio de cultivo u otro para la determinación microbiológica en muestras de fango, por este motivo, se va a estudiar que medio de cultivo resulta de mayor interés para la detección de las bacterias objeto de estudio en las muestras sólidas de las que se dispone. Para este caso, se emplean tres medios de crecimiento que son: MacConkey Agar, TBX Agar, CCA Agar y el ensayo del número más probable (NMP) que nos servirá para comprobar que no se detectan falsos positivos. En todos los medios se emplea el mismo tipo de muestra sólida a las que se aplica el mismo método de pretratamiento.

La tabla 5 muestra los resultados de concentración de *E.coli* en cada medio de cultivo. Tal y como muestra la tabla 5, la bacteria prolifera en todos los medios de cultivo, pero con alguna disimilitud. En concreto, existe una diferencia de un orden de magnitud entre los valores promedio de concentración determinados con el TBX y los demás medios y el NPM. Se comprueba que las diferencias podrían llegar a ser destacables entre las determinaciones con diferentes medios de cultivo y entre métodos.

Tabla 5. Ensayos de pretratamiento de la muestra para el análisis microbiológico

<i>Concentración de E.coli</i>	
Medio de cultivo	Valores promedio
<i>MacConkey Agar</i>	1,5E+03 UFC/g
<i>TBX Agar</i>	1,0E+04 UFC/g
<i>CCA Agar</i>	2,3E+03 UFC/g
<i>NMP</i>	3,6E+03 NMP/g

En cuanto a los otros dos medios, se comprueba que presentan similitudes en la detección de la bacteria. Cabe destacar, que los medios de cultivo empleados poseen componentes para inhibir el crecimiento de otras bacterias y que en ocasiones podrían limitar el crecimiento de la bacteria objeto de estudio si se encuentra parcialmente dañada. Algunos estudios destacan que se produce un efecto sinérgico entre el daño celular y la composición de medios, lo que implica un efecto inhibitor adicional, especialmente notable en MacConkey Agar. (Valero et al., 2017)

Se escoge como medio de cultivo CCA Agar, ya que además de detectar la presencia de *E.coli* también lo hace de Coliformes totales.

Además de los ensayos para determinar el medio de cultivo a emplear, se realizan ensayos en el que se prueban dos métodos para la extracción de las enmiendas sólidas.

El primero, consiste en la trituración mecánica de la mezcla durante 5 minutos en una bolsa estéril de homogenización con un mortero (figura 8 del apartado 3.4.2.1). La mezcla está formada por aproximadamente 10 gr de enmienda y 90 ml de agua de disolución estéril. Tras este tiempo, se obtiene el extracto con el que se realizarán las disoluciones seriadas.

En el segundo método de extracción, la mezcla, constituida en la misma proporción que en el primer caso, se agita durante media hora con ayuda de una placa de agitación y un imán. A continuación, se realizan las disoluciones seriadas.

Se emplearon tres tipos de muestras sólidas distintas, procedentes de las pilas situadas en Tudela en las que se están llevando a cabo los ensayos del proceso de compostaje en diferentes instalaciones (Anexo A). Además se utiliza también una muestra de fango de depuradora que se ha sometido a un secado previo, aunque en este caso ninguno de los métodos fue suficiente para lograr una disolución completa de la muestra por lo que en caso de tener muestras con ese elevado grado de sequedad, deberán someterse a una hidratación previa.

La tabla 6 muestra las concentraciones de coliformes totales y *E.coli* determinados en las muestras de compost tras las extracciones con los diferentes métodos. Se puede observar que las diferencias entre ambos métodos no son destacables. Debido a esto, para los experimentos posteriores se emplea el primer método por su simplicidad.

Tabla 6. Optimización del pretratamiento (extracción sólido-líquido) de una muestra sólida

	Microorganismos	Trituración mecánica (UFC/g)	Agitación (UFC/g)
Muestra compost A	<i>E.coli</i>	8,4E+02	1,5E+03
	<i>Coliformes totales</i>	1,0E+03	1,9E+03
Muestra compost B	<i>E.coli</i>	9,8E+04	3,0E+05
	<i>Coliformes totales</i>	1,5E+05	3,6E+05

4.2 Control de parámetros microbiológicos y físico-químicos durante el estudio de aplicación agrícola de las enmiendas

4.2.1 Análisis del agua de riego

En las tablas 7 y 8 se muestran los resultados promedio de la caracterización físico-química y microbiológica, respectivamente, del agua de riego utilizada para regar el suelo en el que se han aplicado las enmiendas y cultivado el maíz.

Tabla 7. Caracterización físico-química del agua de riego

Muestra Agua	
pH	8,0
Temperatura (°C)	26,0
Conductividad (µS/cm)	22,0
DQO (mg O₂/l)	14,5

Tal y como puede apreciarse en la tabla 7, según los datos de conductividad y DQO, la muestra contiene una baja concentración de sales y materia orgánica.

En cuanto a la caracterización microbiológica, como se ha comentado con anterioridad (apartado 3.4.2), además de los análisis realizados en el laboratorio de la Universidad de Zaragoza (UZ) (Tabla 8), las muestras también se analizaban en Eolisa Laboratorios (Tabla 9) con el objeto de tener un análisis externo que sirva de verificación de los análisis.

Tabla 8. Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego en la UZ

Muestra Agua	
Coliformes totales	<1,0E+03
<i>Escherichia coli</i>	<1,0 E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	<1,0E+03

Tabla 9. Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego (Lab. Eolisa)

Muestra Agua	
Coliformes totales	0
<i>Escherichia coli</i>	0

Así, apoyándonos en estos resultados, se puede confirmar que el agua analizada no supone un aporte destacado de microorganismos al suelo cultivado.

4.2.2 Aplicación de las enmiendas orgánicas en el suelo

4.2.2.1 Muestreo inicial

Se realiza una caracterización físico-química y microbiológica de suelo y fertilizantes previa al abonado. Los resultados se muestran en las tablas 10, 11, 12, 13, 15, 16 y 17.

En cuanto al suelo, los resultados obtenidos son de una de las dos filas en las que se divide el terreno (figura 5, apartado 3.2).

La tabla 10 muestra la caracterización físico-química del suelo arcilloso antes de ser abonado (análisis enviado por INTIA).

Tabla 10. Caracterización físico-química del suelo arcilloso (M_suelo) antes de ser abonado (INTIA)

	M_suelo	
	0-30 cm	30-60 cm
Humedad residual (%)	1,7	1,7
Arena Gruesa (2-0,2 m) (%)	5,2	3,3
Arena Media (0.2-0.1 m) (%)	6,5	6,0
Arena Fina (0.1-0.05 m) (%)	11,0	10,2
Limos gruesos (0.05-0.0) (%)	12,5	11,9
Limos finos (0.02-0.002) (%)	31,7	31,2
Arcillas (<0.002 mm) (%)	33,1	37,3
pH agua (1:2,5)	8,4	8,5
pH KCl 1M (1:2,5)	7,4	7,5
Mat. Orgánica oxidable (%)	1,9	1,6
Fosforo (P2O5) (mg/Kg)	9,6	6,3
Potasio (K2O) (mg/Kg)	285,4	241,0
Nitrógeno Total (%)	0,1	0,1
Relación C/N	7,7	7,5
Carbonatos Totales (%)	33,2	31,8
Caliza activa (%)	8,7	9,2
C.E. (1:1) (dS/m)	0,5	0,4

Como se puede observar en la tabla 10, el suelo analizado es de textura franca, de pH neutro-alcálico, no salino y sin problemas de toxicidad específica de cloruros. Presenta niveles bajos en fósforo (P) disponible y nitrógeno (N) total, y altos en potasio (K) intercambiable. El contenido en materia orgánica oxidable es alto y puede deberse a su desbrozado tras la recolección anterior.

Algunos estudios detallan que las plantas cultivadas en general presentan su mejor desarrollo en valores de pH cercanos a la neutralidad, ya que en estas condiciones los elementos nutritivos están más fácilmente disponibles y en un equilibrio más adecuado (Fuentes Aguilar, 1971; Soriano Soto, 2018).

Por otro lado, se seleccionan dos muestras compuestas de suelo cuarteadas pertenecientes a las dos filas de la parcela (figura 5, apartado 3.2) y se realiza la caracterización microbiana previa al abonado obteniendo los siguientes resultados (tablas 11 y 12).

Tabla 11. Caracterización microbiológica (UFC/g de muestra seca) del suelo en la UZ

	Muestra S_1	Muestra S_2
Coliformes totales	9,6E+03	2,9E+02
<i>Escherichia coli</i>	<7,9E+01	<8,9E+01
<i>Enterococcus sp.</i>	1,7E+02	<8,9E+01

Tabla 12. Caracterización microbiológica del suelo en Eolisa

Muestra Suelo_1	
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)	<1,0E+01
<i>Salmonella</i> spp. / 25 g	Ausencia

En el laboratorio de la universidad de Zaragoza se realizaron los análisis para detectar la concentración de las bacterias Coliformes totales, *E.coli* y *Enterococos* como pueden comprobarse en la tabla 11. La presencia de estos indicadores microbiológicos en el suelo es baja siendo el valor promedio de la concentración de Coliformes totales de 10^3 UFC/g la que mayor concentración presenta, por lo que puede asegurarse que el suelo inicialmente contiene una concentración no muy elevada de los mismos.

Por otro lado, no se detecta *Salmonella* spp. en las muestras estudiadas y la concentración de *C. perfringens* es inferior al límite de detección del método.

Las tablas 13 y 15 muestran los resultados de la caracterización físico-química inicial de las enmiendas.

Tabla 13. Caracterización inicial físico-química del compost (L.Alfaro)

M_compost	
pH	8,5
Conductividad (μS/cm)	3210,0
Materia seca (% sms)	77,6
Materia orgánica (% sms)	44,1
N total (% N)	1,7
P total (mg/kg)	0,9
Potasio (mg/kg)	1,4
C_{org}/N_{total}	15,5

El compost procedente de FORSU posee un pH neutro-básico y salinidad elevada. La concentración de materia orgánica oxidable es alta. Los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio no alcanzan las necesidades nutricionales de cultivo (Tabla 14) por lo que será necesario añadir otros compuestos. La relación C/N es menor de 20 (Tabla 13), cumpliendo con lo establecido en el RD 506/2013 (Anexo B).

Tabla 14. Necesidades nutricionales del maíz (Miguel et al., 2019)

Necesidades	Maíz
Nitrógeno	24,7-30,0 (kg t ⁻¹)
Fósforo	10,2-12,3 (kg t ⁻¹)
Potasio	20,7-25,2 (kg t ⁻¹)
Agua de riego	6000-7500 m ³ Ha ⁻¹

Tabla 15. Caracterización inicial físico-química del fango (L.Alfaro)

M_fango	
pH	7,6
Conductividad (μS/cm)	6300
Materia seca (% sms)	13
DQO	1100
N-NH₃ (%)	3
N total (% N)	18
P total (mg/kg)	4

El fango presenta un porcentaje alto en contenido de nitrógeno (proteína bruta), pero un valor bajo en cuanto a la presencia de fósforo. El pH es neutro y se aprecia un gran contenido salino. La cantidad de materia orgánica es elevada (Tabla 15).

La tabla 16 muestra los resultados promedio de la caracterización microbiológica del fango y compost antes de mezclarse con el suelo.

Tabla 16. Caracterización microbiológica (UFC/g muestra seca) de fango y compost previa al abonado

	Muestra Fango	Muestra Compost
Coliformes totales	3,1E+05	8,2E+04
<i>Escherichia coli</i>	2,4E+05	1,1E+04
<i>Enterococcus sp.</i>	2,0E+06	4,3E+04

De igual modo que en el caso de suelo, las muestras para determinar las bacterias *Clostridium perfringens* y *Salmonella spp.* se envían a laboratorios Eolisa, obteniéndose los resultados recogidos en la tabla 17.

Tabla 17. Caracterización microbiológica de las enmiendas orgánicas en Eolisa

	Muestra Fango	Muestra Compost
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)	1,0E+05	<1,0E+01
<i>Salmonella spp.</i> / 25 g	Ausencia	Ausencia

Como se puede observar en la tabla 16, las concentraciones de las bacterias son superiores a las determinadas en el suelo, siendo la mayor en *Enterococcus sp.* para el fango y Coliformes totales para el caso del compost, aunque en este último todas presentan el mismo orden de magnitud. La diferencia en *Clostridium perfringens* es bastante notable entre las muestras de fango y compost, probablemente debido a la diferente intensidad de los tratamientos con relación a la eliminación de patógenos. Este tipo de bacteria es más exigente en este aspecto debido a que se puede esporular y presentar mayor resistencia a los tratamientos térmicos. En relación con estudios anteriores realizados por el grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental en condiciones experimentales similares (López Martín, 2017), la concentración de bacterias en el suelo de este trabajo de investigación es mucho menor, de hasta tres

órdenes de magnitud menos en el caso de coliformes totales. Al contrario de lo que sucede para la muestra de fango, en la que los valores de concentración presentan bastante similitud por ejemplo para *Enterococcus* sp. y *C.perfringens*. Esta comparación puede observarse a través de la tabla 18. Tanto la muestra de fango como la de compost dan negativo en presencia de *Salmonella* spp. en 25 gramos.

Tabla 18. Comparación resultados con estudios anteriores (UFC/g) (López Martín, 2017)

	M_Sueloi	M_Suelo i Tesis	M_Fangoi	M_Fango i Tesis
Coliformes totales	9,6E+03	1,3E+06	3,1E+05	3,7E+03
<i>Escherichia coli</i>	<7,9E+01	2,0E+03	2,4E+05	2,2E+03
<i>Enterococcus</i> sp.	1,7E+02	1,3E+03	2,0E+06	1,0E+06
<i>Clostridium perfringens</i>	<1,0E+01	1,0E+03	1,0E+05	2,2E+05
<i>Salmonella</i> spp. / 25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

4.2.2.2 Muestreo tras 5 semanas desde el abonado

Pasadas cinco semanas desde el abonado, se realiza un segundo muestreo. En este caso se analizan el suelo sin enmiendas, las mezclas formadas por ambas enmiendas con el suelo y la parte de la parcela que ha sido abonada únicamente con fertilizante inorgánico.

Así, los datos físico-químicos obtenidos para este caso son los que se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Caracterización físico-química tras 5 semanas desde el abonado (UZ)

Muestra Suelo	
5 semanas	
pH	7,6
Temperatura (° C)	28,4
Conductividad (µS/cm)	1400
DQO (mg O₂/l)	130
Muestra Suelo+Inorg. (SI)	
5 semanas	
pH	7,9
Temperatura (° C)	25,9
Conductividad (µS/cm)	1300
DQO (mg O₂/l)	120
Muestra Suelo+Compost1 (SC1)	
5 semanas	
pH	7,9
Temperatura (° C)	26
Conductividad (µS/cm)	1400
DQO (mg O₂/l)	87
Muestra Suelo+Compost2 (SC2)	
5 semanas	
pH	7,9

Caracterización físico-química tras 5 semanas desde el abonado (UZ) (Continuación)

Temperatura (° C)	25,7
Conductividad (µS/cm)	1400
DQO (mg O ₂ /l)	140
Muestra Suelo+Fango1 (SF1)	
5 semanas	
pH	8
Temperatura (° C)	25,4
Conductividad (µS/cm)	1400
DQO (mg O ₂ /l)	140
Muestra Suelo+Fango2 (SF2)	
5 semanas	
pH	7,7
Temperatura (° C)	25,7
Conductividad (µS/cm)	1400
DQO (mg O ₂ /l)	260

Las muestras correspondientes a la mezcla del suelo con los abonos orgánicos se analizan por duplicado en ambos casos (físico-químico y microbiológico), una determinación por cada calle en la que se ha aplicado cada enmienda.

Si se comparan los resultados de la tabla 19 con los de las tablas 10, 13 y 15, se observa que tras cinco semanas de la aplicación no se perciben diferencias físico-químicas en las muestras salvo por el incremento de la materia orgánica (medida como DQO).

En cuanto a la evolución de la concentración microbiológica, tras cinco semanas de abonado, relacionando las tablas 11, 16 y 20, se observa que en el suelo ha aumentado la carga bacteriológica en un orden de magnitud para las tres bacterias analizadas. En el caso de la mezcla de suelo y fango, la concentración de *E.coli* y *Enterococcus sp.* ha disminuido en un orden de magnitud para la primera y hasta dos en el caso de la segunda. El nivel de coliformes totales se mantiene similar a los valores previos al abonado (Tabla 16). Para la mezcla suelo y compost, de igual modo que para el caso del fango, la concentración de *E.coli* y *Enterococcus sp.* ha disminuido, pero en esta ocasión en un orden de magnitud con respecto al primer análisis. Los coliformes totales se mantienen en el mismo orden de magnitud. Para el caso del fertilizante inorgánico, se observa que sus niveles de carga se encuentran en el mismo orden de magnitud que los del suelo en este ensayo.

Tabla 20. Caracterización microbiológica (UFC/g) de las muestras tras 5 semanas de abonado (UZ)

Muestra\Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	Coliformes totales	<i>Enterococcus sp.</i>
Muestra Suelo	<6,0E+02	3,6E+04	6,0E+02
Muestra SF1	3,1E+04	5,6E+05	3,2E+04
Muestra SF2	3,0E+04	5,7E+05	3,2E+04

**Caracterización microbiológica (UFC/g) de las muestras tras 5 semanas de abonado (UZ)
(Continuación)**

Muestra SC1	<3,8E+03	3,1E+04	3,8E+03
Muestra SC2	3,0E+04	7,3E+04	4,1E+03
Muestra SI	6,2E+02	1,1E+04	3,7E+02

4.2.2.3 Muestreo tras 9 semanas de abonado

Los análisis de suelo, mezclas, fertilizantes inorgánico y fango se muestran en las tablas 21 y 22, tras 9 semanas de abonado.

Tabla 21. Caracterización físico-química de las muestras tras 9 semanas de abonado

M_S 9 semanas	
pH	7,75
Temperatura (° C)	26,3
Conductividad (µS/cm)	1900
DQO (mg O₂/l)	270
M_F 9 semanas	
pH	7,55
Temperatura (° C)	25,7
Conductividad (µS/cm)	6300
DQO (mg O₂/l)	1100
M_SI 9 semanas	
pH	7,73
Temperatura (° C)	26
Conductividad (µS/cm)	1600
DQO (mg O₂/l)	150
M_SC1 9 semanas	
pH	8,04
Temperatura (° C)	26,3
Conductividad (µS/cm)	2100
DQO (mg O₂/l)	180
M_SC2 9 semanas	
pH	8,01
Temperatura (° C)	26
Conductividad (µS/cm)	2300
DQO (mg O₂/l)	190
M_SF1	

Caracterización físico-química de las muestras tras 9 semanas de abonado (Continuación)

9 semanas	
pH	7,93
Temperatura (° C)	25,5
Conductividad (µS/cm)	1700
DQO (mg O₂/l)	140
M_SF2	
9 semanas	
pH	7,93
Temperatura (° C)	26
Conductividad (µS/cm)	2800
DQO (mg O₂/l)	140

En esta ocasión, es posible realizar el análisis a la muestra de fango (muestra M_F) al encontrarse restos sobre la superficie del suelo (Figura 16).



Figura 7. Resto de fango sobre la superficie del suelo tras 9 semanas desde el abonado

Tal y como muestra la tabla 21, se observa un aumento del pH y de la materia orgánica disponible para todas las muestras, en comparación con las muestras tomadas tras 5 semanas de su abonado (tabla 19).

La tabla 22 muestra los resultados relativos a los parámetros microbiológicos analizados.

Tabla 22. Caracterización microbiológica (UFC/g) tras 9 semanas desde el abonado

Muestra\Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	Coliformes totales	<i>Enterococcus sp.</i>
Muestra Suelo	5,4E+02	6,4E+04	<3,8E+02
Muestra SF1	<2,7 E+04	2,9E+04	<3,5E+03
Muestra SF2	<2,4E+04	1,9E+04	3,6E+03
Muestra SC1	<3,8E+03	8,8E+03	<5,7E+02
Muestra SC2	<3,8E+03	5,8E+03	<5,7E+02
Muestra SI	5,7E+02	1,3E+03	<5,7E+02
Muestra F	2,0E+04	9,6E+04	2,0E+05

Por otro lado, tal y como muestra la tabla 22, en general la concentración bacteriana de las muestras tras 9 semanas de abonado disminuye respecto a la concentración tras 5 semanas (tabla 20).

Si se analiza de forma separada cada una de las muestras, se tiene que para el suelo, los valores relativos a su concentración bacteriana se mantienen en el mismo orden de magnitud. En el caso de las mezclas, tanto la de suelo-fango como la de suelo-compost, experimentan el mismo cambio que consiste en una ligera disminución para la bacteria *E.coli* y de hasta un orden de magnitud en el valor promedio para las otras dos (Coliformes totales y *Enterococcus sp.*). Para el abono inorgánico, solo se cuantifica una disminución de concentración para el grupo de bacterias coliformes totales, manteniéndose las otras en el mismo rango.

La densidad bacteriana se reduce un orden de magnitud para cada microorganismo en la muestra de fango respecto a sus valores iniciales (tabla 16). Algunos autores plantean que su aplicación al suelo en terrenos de uso agrícola o forestal consigue la eliminación de los patógenos o sustancias tóxicas que puedan quedar en el fango tras los tratamientos empleados en las EDARs, mediante la luz solar y la absorción de nutrientes de las plantas. (Sillero Moreno, 2017)

4.3 Propiedades fitotóxicas y madurez de las enmiendas: estudio de Índice de Germinación

4.3.1 Optimización del método Índice de Germinación

Primeramente, para la puesta en marcha y optimización del método Índice de Germinación (IG) y usando las referencias encontradas en la biografía disponible se realizan tres ensayos con otras muestras que no son las de aplicación como enmiendas al suelo experimental.

Para el primer ensayo, se seleccionan 3 muestras (fango secado en cámara solar, y dos muestras distintas de compost), además del blanco (agua destilada). Para el segundo ensayo se utiliza compost de FORSU (que se encuentra madurando), fango de depuradora previamente secado en cámara solar y los fangos deshidratados procedentes de dos depuradoras de dos municipios de Navarra que se tratan mediante digestión aerobia y digestión anaerobia. Posteriormente se harán las determinaciones de las muestras recogidas tras la aplicación de las enmiendas en suelo agrícola.

El ensayo consiste en añadir 13,5 ml de agua por gramo de muestra seca. Para diluir este extracto se mantiene en agitación durante 30 minutos (Tortosa, 2013). Tras esto, se filtra. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados Índice de germinación primer ensayo

Muestras	IG (%) Agua Destilada (AD)
Fango	0,0
Muestra de compost A	53,5
Muestra de compost B	11,3

Como puede apreciarse a través de la tabla 23, los resultados que se obtienen apenas mejoran el blanco (agua destilada). Esto se debe a que según la tabla 4 (apartado 3.4.3) el grado de toxicidad de las muestras es alto y por ello no hay mejora en el aporte nutricional a las semillas por parte de las enmiendas aplicadas. Además, cabe destacar que para que las semillas germinasen se necesitaron 72 horas, en vez de las 48 horas que marcaba la biografía seleccionada. A las 24 horas de la introducción de las semillas en las estufas, el cambio es inapreciable. Por ello se dejan otras 48 horas más para obtener resultados.

Tras esto, se decide utilizar el protocolo de analítico elaborado por parte del CEIT IK4 (Esteban, 2018) junto con la bibliografía consultada como se ha explicado con anterioridad en la metodología (apartado 3.4.3). Así, para un segundo experimento se obtienen los resultados recogidos en la tabla 24.

Tabla 24. Resultados Índice de germinación segundo ensayo

Muestras	IG (%) AD	IG (%) Suelo
Fango secado	4,2	3,6
Fango digestión aerobia	4,9	4,3
Fango digestión anaerobia	0,0	0,0

En este análisis, se opta por no realizar un filtrado del extracto tras los 30 minutos de agitación. Pero para posteriores análisis se desecha este método puesto que la presencia de sólidos dificulta mucho la medición de la longitud de las raíces. (Figura 17)



Figura 8. Muestra del ensayo IG sin filtrar

En este tercer ensayo se siguen los pasos descritos en la metodología obteniendo los siguientes resultados. En este caso, además de la comparación con el agua destilada y el suelo, se añade la turba comercial como se ha comentado anteriormente en la metodología (apartado 3.4.3) para tener tres componentes que pueden considerarse como blancos a la hora de expresar los resultados.

Tabla 25. Resultados Índice de germinación tercer ensayo

Muestras	IG (%) AD	IG (%) Suelo	IG (%) Turba
Compost	84,9	99,6	41,5
Fango secado	1,4	1,6	0,7
Fango digestión aerobia	0,2	0,2	0,1
Fango digestión anaerobia	1,6	1,9	0,8

Como puede comprobarse a través de la tabla 25, las muestras de fango presentan valores bajos según la clasificación (Tabla 4, apartado 3.4.3), lo que implica que la posible presencia de sustancias que inhiben la germinación y/o el crecimiento es debido a que el fango no ha alcanzado la madurez necesaria para ser altamente efectivo como enmienda. Entre los tres tipos de blanco utilizados: agua destilada, suelo y turba, las dos primeras presentan resultados similares. El fango de digestión aerobia muestra peores resultados que el de digestión anaerobia o secado, aun así, en principio aplicar estas enmiendas a las semillas no supone una mejora respecto a los blancos, ya que ninguna es superior al 100%. Para el caso del compost se observa que los resultados parecen indicar la madurez de la muestra, ya que muestra resultados similares en al menos dos de los tres casos.

4.3.2 Aplicación de las enmiendas al terreno: estudio de Índice de Germinación

El siguiente ensayo que se realiza se corresponde con las muestras recogidas en el segundo muestreo (5 semanas después del abonado). La tabla 26 muestra los resultados de los ensayos del índice de germinación en las muestras recogidas tras 5 semanas del abonado. Se recogen muestras puntuales de fango y compost que consiguen aislarse en el propio terreno y muestras compuestas de suelo al que se ha aplicado compost y suelo al que se ha aplicado fango. También se cogen muestras del agua de riego empleada (Tabla 26).

Tabla 26. Resultados Índice de germinación segundo muestreo

Muestras	IG (%) AD	IG (%) Suelo	IG (%) Turba
Fango	15,3	14,8	11,8
Compost	91,5	88,7	70,7
Agua riego	72,4	70,2	55,9
SC1	131,7	127,6	101,7
SF1	105,3	102,0	81,3
SC2	143,9	139,4	111,1
SF2	189,3	183,4	146,2

La muestra de fango aislada sigue mostrando niveles bajos que evidencian que no ha alcanzado la madurez. En el compost, se mantienen valores semejantes al caso anterior (apartado 4.3.1) presentando mejoras en el caso de la turba como blanco. Para el caso del agua, comprobamos que no tiene ningún aporte microbiológico (tabla 8, apartado 4.2.1) pero que tampoco sirve como estimulante o aporte mineral en el crecimiento de las semillas. Para la mezcla suelo-compost sí que puede apreciarse su poder como fitonutriente, de acuerdo con la tabla 4 de clasificación del apartado 3.4.3. De igual modo ocurre con la mezcla suelo-fango cuya unión resulta muy ventajosa para el crecimiento de las raíces. Cabe destacar que la mezcla de suelo y fango presenta resultados más dispares entre las dos calles y para los diferentes blancos que la mezcla de suelo y compost. Esto es debido a que el compost se mezcla y se esparce mejor que

el fango, que se ve menos homogeneizado por lo que puede haber mayor variación entre calles.

Tras 9 semanas de abonado, se realiza el tercer muestreo y por consiguiente, se examina también el nivel de toxicidad que presentan las muestras a través del ensayo IG y cuyos resultados se muestran en la tabla 27. En este caso, y tras encontrar artículos relacionados, se hace el examen también con rábanos (*Raphanus sativus*) además de con berro de jardín (*Lepidium sativum*) para comprobar si los resultados pueden variar porque la semilla fuera sensible a otros factores de la enmienda. (García-Alvear et al., 2015; Tam et al., 1994).

Tabla 27. Resultados Índice de germinación tercer muestreo *Lepidium sativum*

Muestras	IG (%) AD	IG (%) Suelo	IG (%) Turba
Fango	94,0	164,7	155,8
SI	64,6	113,1	107,0
SC1	70,1	122,9	116,2
SC2	55,8	97,7	92,4
SF1	44,6	78,1	73,9
SF2	79,9	139,9	132,4

En este caso, se puede observar en la tabla 27 como el fango ha completado su proceso de maduración y es un fitoestimulante tanto para el suelo como para la turba; en cuanto al blanco, mejora poco su nivel de efectividad. En el caso del fertilizante inorgánico, se considera que al alcanzar el 100% es una sustancia fitoestimulante para dos de los tres blancos (suelo y turba). Para el caso de las mezclas, el nivel de toxicidad no puede confirmarse. Aunque en el ensayo anterior el resultado fue mejor, esto puede deberse a factores externos como la climatología o crecimiento propio del maíz. Solo para la muestra suelo-fango2 y sobre el suelo y la turba se advierte su característica fitoestimulante que podría ser debido a una absorción más rápida por parte de las plantas.

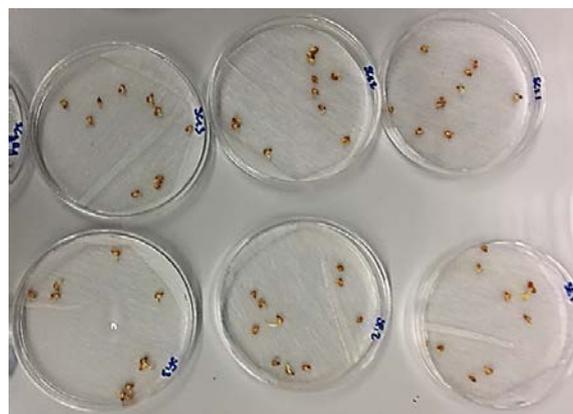


Figura 9. Semillas tras 24 horas de incubación

Para el rábano, el proceso seguido durante el ensayo es el mismo y se describe en la metodología (apartado 3.4.3).

Tabla 28. Resultados Índice de germinación tercer muestreo *Raphanus sativus*

Muestras	IG (%) Blanco	IG (%) Suelo	IG (%) Turba
Fango	318,3	150,2	290,4
SI	162,1	76,5	147,9
SC1	140,2	66,2	127,9
SC2	149,8	70,7	136,7
SF1	229,7	108,4	209,6
SF2	101,4	47,8	92,5

Con este método se observan mejores resultados que con el anterior, ya que todas las muestras presentan la característica de fitonutriente sobre cualquier matriz. Este hecho puede deberse al mayor tiempo de permanencia en estufa o a la humedad en la placa. También podría ser que las semillas de rábano sean menos sensibles a algunos compuestos que sí resultan perjudiciales para el berro (Luo et al., 2018) (Figura 19).



Figura 10. Semillas de rábano germinadas tras 120 horas de incubación

5. CONCLUSIONES

De los ensayos para la optimización del pretratamiento de muestras sólidas se deduce que:

1. Las bacterias indicadoras presentes en las muestras y que están parcialmente dañadas pueden no detectarse correctamente en medios que presentan inhibidores de crecimiento de otros microorganismos como MacConkey Agar. La detección de Coliformes totales además de *E.coli* como ocurre en el caso de CCA Agar permite obtener un análisis más completo de la contaminación microbiológica de la muestra.
2. Para la extracción sólido líquido, se opta por el método de trituración mecánica por su mayor sencillez y rapidez al no obtener diferencias notables entre las dos propuestas estudiadas.

De los resultados obtenidos mediante el control físico-químico y microbiológico de las muestras de suelo, compost, fango, mezclas suelo-compost y suelo-fango, fertilizante inorgánico y agua de riego se extraen las siguientes conclusiones parciales:

1. Las propiedades beneficiosas de los fangos son evidentes debido a la elevada concentración de materia orgánica en todas las muestras recogidas durante el estudio. El suelo abonado presenta una mayor concentración de materia orgánica disponible que al inicio.
2. La concentración microbiológica a lo largo de las semanas de muestreo disminuye para todos los indicadores bacterianos estudiados y en general en todas las muestras analizadas.
3. No se detecta *Salmonella spp.* en ninguna de las muestras analizadas.
4. En el agua de riego analizada las bacterias indicadoras están en bajas concentraciones por lo que se supone que no es un aporte de contaminación microbiológica al suelo agrícola.
5. Se produce un descenso del pH en el suelo abonado que permite que las raíces de las plantas puedan asimilar mejor los nutrientes y minerales contenidos en él (Universidad de Oviedo, 2019). A su vez, aumenta la conductividad.

De la evaluación del grado de madurez de las enmiendas a través del ensayo Índice de germinación se obtiene que:

1. Como se ha consultado a través de la bibliografía y comprobado durante el estudio, las semillas de berro son más sensibles para evaluar la fitotoxicidad que otras semillas empleadas en este tipo de determinaciones (Luo et al., 2018).
2. El ensayo permite evaluar diferentes matrices e identificar la presencia de componentes o concentraciones de componentes poco beneficiosos en las enmiendas y su evolución durante el estudio. El bioensayo resulta una determinación eficaz, sencilla y económica para la detección de la fitotoxicidad y madurez en las enmiendas.
3. Se considera la opción de seguir realizando ensayos en investigaciones futuras.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J., ... Cunhaqueda, C. (2015). Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Management*, 40(276), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.027>
- Alvarenga, P., Palma, P., Mourinha, C., Farto, M., Dôres, J., Patanita, M., & Cunhaqueda, C. (2017). Recycling organic wastes to agricultural land as a way to improve its quality: A field study to evaluate benefits and risks. *Waste Management*, 61, 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.01.004>
- Bernstad, A., Schott, S., Wenzel, H., & Jansen, C. (2016). Identification of decisive factors for greenhouse gas emissions in comparative life cycle assessments of food waste management: an analytical review. *Journal of Cleaner Production*, 119, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.01.079>
- Carter, M. R. (1993). Soil sampling and methods of analysis. Lewis Publishers, p.1262 ISBN 9780849335860
- Cerda, A., Artola, A., Font, X., Barrena, R., Gea, T., & Sánchez, A. (2018). Bioresource Technology Composting of food wastes: Status and challenges. *Bioresource Technology*, 248, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.133>
- Climate-Data. (2019). Datos climatológicos terreno experimental. Retrieved from <https://es.climate-data.org/europe/espana/comunidad-foral-de-navarra/artajona-886120/>
- Esteban, M. (2018). Protocolo analítico de Test de Germinación para la determinación de fitotoxicidad de aguas y residuos líquidos, p. 2. San Sebastián, Spain: CEIT-IK4.
- Europeo, P. *Working Document on Sludge. 3rd Draft*. ENV.E.3, 27 de abril (2000).
- Europeo, P. *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land Final Report Part I: Overview Report*, ENV.G.4/ETU/2008/0076r (2003).
- Europeo, P. *Working document : sludge and biowaste*. ENV.C.2, septiembre (2010).
- Fuentes Aguilar, L. (1971). Interpretación y análisis de suelos. *Investigaciones Geográficas*, 1(4). <https://doi.org/10.14350/rig.58865>
- Fundación Ecoloc. (2019). Economía Circular. Retrieved from <https://www.ecolec.es/informacion-y-recursos/economia-circular/>
- García-Alvear, N., & Abad-Terán, M. (2015). Análisis preliminar de la fitotoxicidad del material particulado sedimentable de la zona urbana de Cuenca. *Maskana*, 6(1), 95–105. <https://doi.org/10.18537/mskn.06.01.08>
- García-Serrano, P., Lucena, J. J., López Bellido, L., Primo-millo, E., & García-Escudero Domínguez, E. (2009). *Guía práctica de fertilización racional de los cultivos en España* (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Ed.).
- Gobierno de España. (2019). Lodos de depuración de aguas residuales. Retrieved from <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>

- Gobierno de Navarra. (2018). No Title. Retrieved from http://www.navarra.es/home_es/Navarra/272+Municipios/entidad.htm?IdEnt=2951
- Gondim-Porto, C., Platero, L., Nadal, I., & Navarro-García, F. (2016). Fate of classical faecal bacterial markers and ampicillin resistant bacteria in agricultural soils under Mediterranean climate after urban sludge amendment. *Sci. Total Environ*, 565, 200–210.
- Hitzl, M., Mendez, A., & Renz, M. (2018). *Journal of Environmental Chemical Engineering Making hydrochar suitable for agricultural soil : A thermal treatment to remove organic phytotoxic compounds*. 6(May), 7029–7034. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.10.064>
- INE. (2019). Infografía tratamiento final de residuos en España. Retrieved from https://ine.es/infografias/infografia_residuos.pdf
- INTIA. (2019). Retrieved from <https://www.intiasa.es/web/es>
- Lang, N. L., & Smith, S. R. (2007). Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of E.Coli in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6), 2122-2131, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03490.x>.
- López, A. (2018). Estudio de investigación sobre la aplicación de tecnologías de compostaje , en el tratamiento de residuos orgánicos para su valorización agronómica. *Informe de seguimiento* (Universidad de Zaragoza).
- López, A., Gómez, J., Sarasa, J., Miguel, N., Labadía, J., & Ormad, M. P. (2019). Estudio de la evolución de la calidad microbiológica de los suelos abonados con fangos de EDAR (Universidad de Zaragoza).
- López Martín, A. (2017). Evaluación de tecnologías en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental. *Tesis Doctoral*, p.247 (Universidad de Zaragoza). <https://doi.org/ISSN 2254-7606>
- Luo, Y., Liang, J., Zeng, G., Chen, M., Mo, D., Li, G., & Zhang, D. (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>
- Luo, Y., Liang, J., Zeng, G., Li, X., Chen, M., Jiang, L., ... Chen, X. (2019). Evaluation of tetracycline phytotoxicity by seed germination stage and radicle elongation stage tests : A comparison of two typical methods. *Environmental Pollution*, 251, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.005>
- M. Zucconi, F. Pera, A. Forte, M. de B. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *BioCycle* 2, 54–57.
- Miguel, N., López, A., Sarasa, J., Gómez, J., & Ormad, M. P. (2019). Aplicación de fangos de depuradora en suelos agrícolas: evolución de indicadores microbiológicos de contaminación. *Congreso XXXVI Jornadas Nacionales de Ingeniería Química (Zaragoza, Spain)*, Libro de resúmenes p. 143-144, ISBN: 978-84-16723-69-0.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, G. de E. (2010). Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España. *Guía*, p. 137,

IBSN: 978-84-491-0956-0

- Mosteo, R. (2019). TEMA 1. Gestión de Residuos. In *Asignatura Ingeniería del Medio Ambiente*. Universidad de Zaragoza.
- Pergola, M., Persiani, A., Palese, A. M., Meo, V. Di, Pastore, V., Adamo, C. D., & Celano, G. (2018). *Composting: The way for a sustainable agriculture* ☆. *123*(December 2016), 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.016>
- Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado, 164, de 10 de julio de 2013.
- 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 262, de 1 de noviembre de 1990.
- Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. Boletín Oficial del Estado 142, de 14 de junio de 2013.
- Romero, A.J., Robles, C.A., Ruíz, R.A., López, E., Sedeño, J.E., & Rodríguez, A. (2014). Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del río Chalma. *Internacional de contaminación ambiental*, *30*(3), 307–316.
- Sarasa, J. (2018). Gestión de residuos. In *Asignatura Gestión de Residuos* Universidad de Zaragoza.
- Schwarz, K. R., Sidhu, J. P. S., Pritchard, D. L., Li, Y., & Toze, S. (2014). Decay of enteric microorganisms in biosolid-amended soil under wheat (*Triticum aestivum*) cultivation. *Water Res.*, *59*, 187–201.
- Singh, R. P., & Agrawal, M. (2008). *Potential benefits and risks of land application of sewage sludge*. *28*, 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.010>
- Soriano Soto, M. D. (2018). pH del suelo. In *Asignatura Producción Vegetal*. Universidad Politècnica de València.
- Tam, N., & Tiquia, S. (1994). Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique. *Resources, Conservation and Recycling*, *11*(1–4), 261–274.
- Tortosa, G. (2008). Compostaje. Conceptos básicos. Retrieved from <http://www.compostandociencia.com/2008/09/definicion-de-compostaje-html/>
- Tortosa, G. (2013). Índice de Germinación de Zucchini. Retrieved from <http://www.compostandociencia.com/2013/12/test-de-zucchini-o-indice-de-germinacion-de-un-compost-html/>
- Universidad de Oviedo. (2019). Prpiedades físico-químicas del suelo y su relación con los movimientos del agua. Seminario: *Departamento de Biología de Organismos y Sistemas*. (Universidad de Oviedo).
- Valero, P., Giannakis, S., Mosteo, R., Ormad, M. P., & Pulgarin, C. (2017). Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment. *Chemical Engineering Journal*, *313*, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.126>

7. ANEXOS

A. Descripción de las instalaciones para el proceso de compostaje

El proceso de compostaje se lleva a cabo en dos instalaciones diferentes: pilas de compostaje que pueden ser estáticas aireadas o volteadas.

A.1. Pila estática aireada

Se forman pilas de entre 4-6 m³. En la figura A1 se puede observar una de ellas.



Figura A1. Pila estática aireada; b) Sistema de aireación mediante canales

La aireación tiene lugar mediante tres canales instalados en el suelo con 12 orificios por los que se distribuye el aire aportado por una soplante. Esta motorizada para evitar temperaturas elevadas en la pila. La temperatura se controla mediante sondas que transfieren la información a un ordenador cada 5 minutos. Para ajustar la humedad el riego se realiza por goteo.

A.2. Pila volteada

Las pilas, de igual modo que para las estáticas, son de entre 4-6 m³. La aireación se lleva a cabo mediante el volteo de las pilas que se realiza con una pala de unos 30 litros de capacidad. El riego se realiza mediante manguera. La temperatura se controla por sondas conectadas a un ordenador. El ordenador almacena valores cada 5 minutos. (Andrea López, 2018)



Figura A2. Pilas volteadas

B. Límites fijados en el RD 506/2013 para aplicación agrícola de compost a partir de FORSU

Esta información aparece recogida dentro del Anexo I, grupo 6, del Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. (Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, 2013)

ENMIENDA ORGÁNICA: COMPOST

- *Información sobre la forma de obtención y los componentes esenciales:*
 - Producto higienizado y estabilizado, obtenido mediante descomposición biológica aeróbica (incluyendo fase termofílica) , bajo condiciones controladas, de materiales orgánicos biodegradables del Anexo IV, recogidos separadamente.
- *Contenido mínimo en nutrientes (porcentaje en masa). Información sobre la evaluación de los nutrientes. Otros requisitos:*
 - Materia orgánica total: 35%
 - Humedad máxima: 40%
 - C/N < 20
 - No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos.
 - El 90% de las partículas pasarán por la malla de 25 mm.
- *Otras informaciones sobre la denominación del tipo o del etiquetado*
 - pH
 - Conductividad eléctrica
 - Relación C/N
 - Humedad mínima y máxima
 - Materias primas utilizadas
 - Tratamiento o proceso de elaboración
- *Contenido en nutrientes que debe declararse y garantizarse. Formas y solubilidad de los nutrientes. Otros criterios*
 - Materia orgánica total
 - C orgánico
 - N total (si supera el 1%)
 - N orgánico (si supera el 1%)
 - N amoniacal (si supera el 1%)
 - P₂O₅ total (si supera el 1%)
 - K₂O total (si supera el 1%)
 - Ácidos húmicos
 - Granulometría

C. Descripción de los tratamientos para el fango

Los lodos consisten en una mezcla de agua y sólidos separada del agua residual. Se generan como resultado de las distintas etapas de depuración de las aguas residuales (Figura A3). Según los datos del Registro Nacional de Lodos, en España se producen anualmente alrededor de 1.200.000 toneladas (en materia seca, m.s.) de estos lodos de depuradora. (Gobierno de España, 2019)

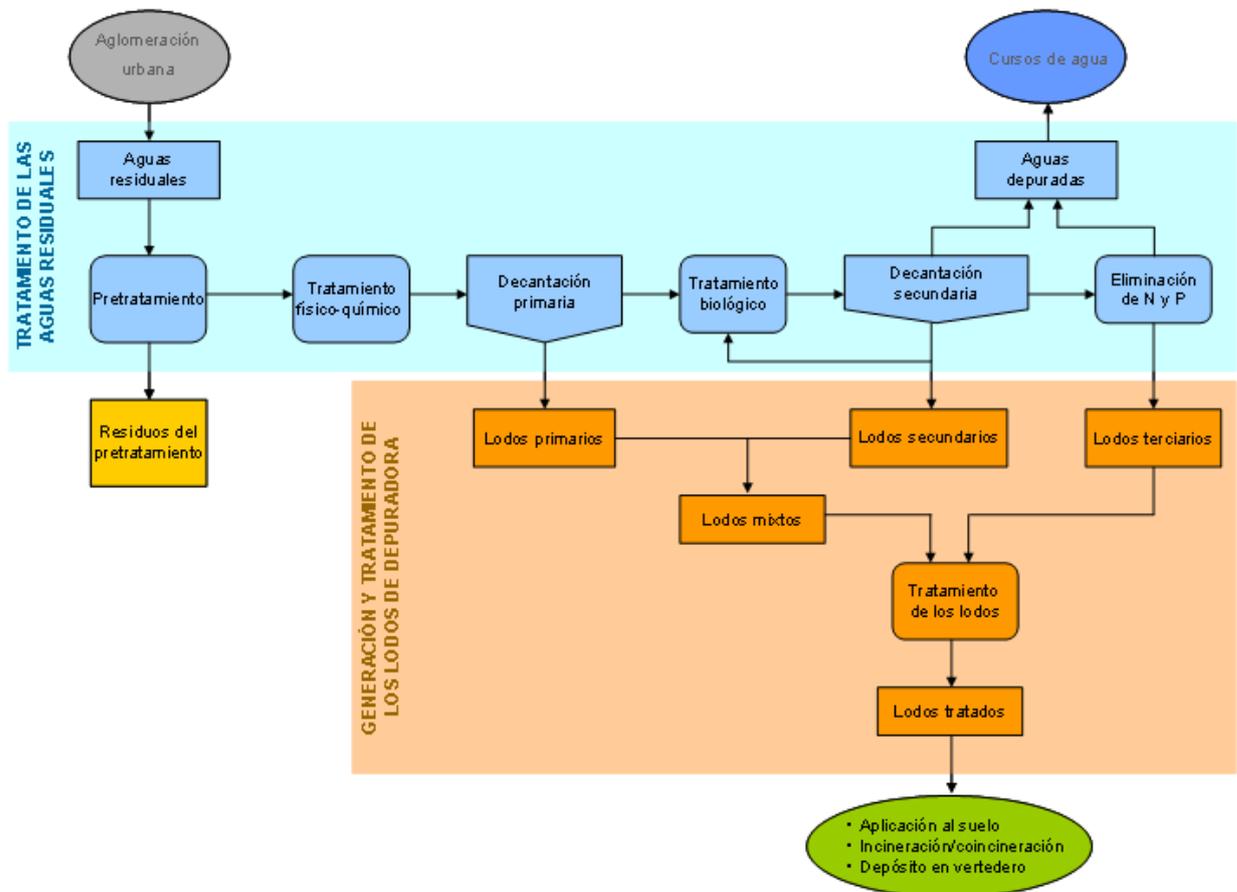


Figura A3. Esquema de generación y tratamiento de lodos (Gobierno de España, 2019)

Los fangos se caracterizan por ser un residuo extremadamente líquido (más de un 95% de agua). Su composición es variable y depende de la carga de contaminación del agua residual inicial y de las características técnicas de los tratamientos llevados a cabo en las aguas residuales. Los tratamientos del agua 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 (N), fósforo (P) y potasio (K) y en menor cantidad calcio (Ca), magnesio (Mg) y otros micronutrientes esenciales para las plantas) y otras con potencial contaminante como los metales pesados, entre ellos cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn), los patógenos, y los contaminantes orgánicos (Gobierno de España, 2019; Ministerio de Medio Ambiente, 2010). Las propias características del fango (olor, elevada cantidad de materia volátil,

presencia de microorganismo patógenos...) imposibilitan que pueda ser utilizado sin ser sometido a una serie de tratamientos previos. Los fangos suelen estabilizarse para reducir su volumen y disminuir así los periodos de olor; se consideran estables cuando se ha reducido aproximadamente el 40 % de materia volátil.

Generalmente, las tecnologías de tratamiento de fangos se agrupan en procesos de acondicionamiento, concentración, conversión y deshidratación (López Martín, 2017).

C.1. Espesamiento

Este método es empleado para aumentar el contenido en sólidos en el fango por eliminación de la parte líquida del mismo. En la figura A4 se puede observar el tanque donde se lleva a cabo.



Figura A4. Tanque para el espesamiento de fangos

C.2. Digestión aerobia termófila autosostenida

La Digestión Aerobia Termófila Autosostenida (ATAD) se puede llevar a cabo sin fuentes externas de calor utilizando el calor desprendido durante la oxidación microbiana de la materia orgánica para el calentamiento del fango. El proceso precisa de un aislamiento adecuado de los reactores. Teóricamente, el fango alimentado debe contener más de un 3% de sólidos para soportar el proceso en condiciones óptimas. Presenta algunas ventajas como el efecto de pasteurización debido a la temperatura y el pH, la alta tasa de estabilización, la conservación del nitrógeno y por ello mayor recuperación del valor del fango como fertilizante y la posibilidad de recuperación del calor en bajos tiempos de retención. Las desventajas están relacionadas con las características menos ventajosas para la deshidratación mecánica del fango digerido. La figura A5 muestra un digester ATAD.



Figura A5. Digestor ATAD

En el proceso de digestión se generan espumas por la desestabilización del fango relacionado con la rotura de las bacterias presentes a esa temperatura de operación. Las espumas generadas se suelen recircular para aprovechar el oxígeno, las bacterias y el sustrato presente en las mismas. (López Martín, 2017)

C.3. Deshidratación centrífuga

Este proceso permite reducir el contenido de humedad de los fangos digeridos. El sobrenadante se recircula de nuevo a la cabecera de la planta. Tanto la superficie para su instalación como el coste de su inversión es menor que para otros sistemas de deshidratación. (López Martín, 2017)

C.4. Secado solar

Este tipo de tratamiento es totalmente automático. En este tipo de proceso se consigue secar el fango entorno a un 85%, reduciendo así, los costes asociados a su gestión.

El invernadero posee un sistema de volteo que proporciona un secado uniforme en todo el lodo. Este método hace que se pueda desplazar por todo el área del invernáculo sin la intervención de ningún operario.

Se monitorizan agentes claves que intervienen en el proceso como son humedad, temperatura y radiación solar, entre otros, para gestionar de manera adecuada la ventilación adaptándola a las necesidades actuales del fango.

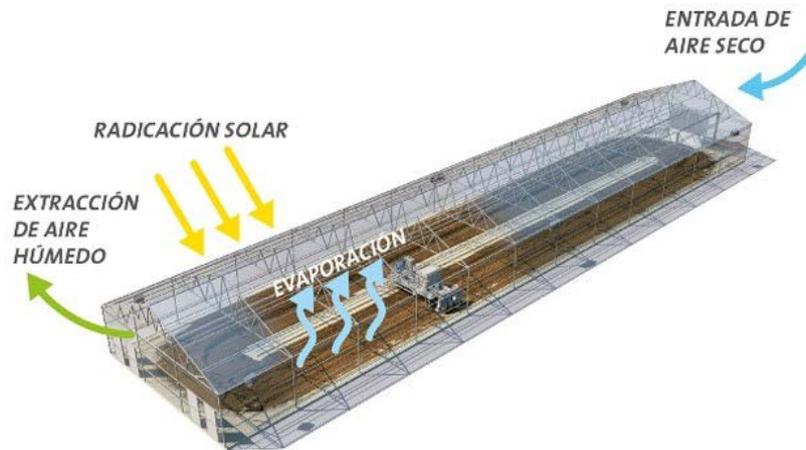


Figura A6. Esquema de funcionamiento invernadero para el secado solar de fangos
(Interempresas S.L.U., 2016)

C.5 Descripción de la planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR)

El procedimiento de depuración de las aguas residuales en esta EDAR es de tratamiento de desbaste y decantación primaria y tratamiento secundario con biofiltros en doble etapa y decantación secundaria. La figura A7 muestra el plano esquemático de la planta así como una vista real de la misma

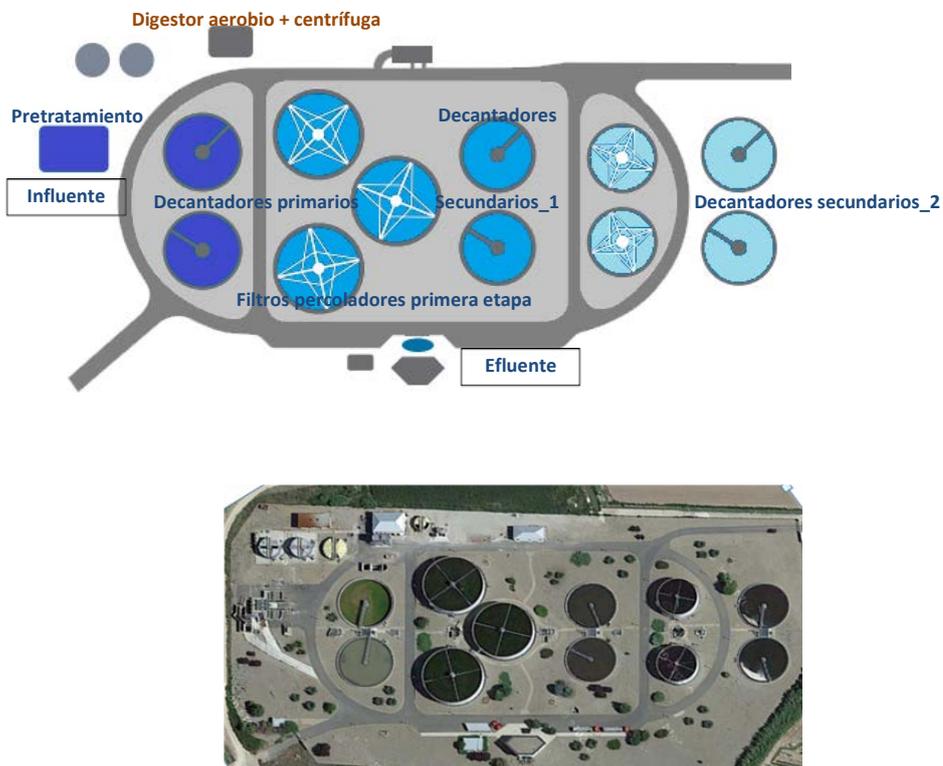


Figura A7. Dibujo esquemático de la EDAR y vista real

En la tabla A1 se detallan los datos de diseño y de tratamiento, tanto de caudal como de carga. En la tabla A2, se muestran los valores medios de caudal (Q) y tiempo de retención θ_h de los procesos que constituyen la línea de tratamiento. Además, se incluye el dato de gramos de fango por habitante equivalente y día (López Martín, 2017).

Tabla A1. Caudal de carga de diseño y valores reales medios de tratamiento en la EDAR

PARÁMETRO	VALOR
Caudal de diseño (m ³ /d)	22000
Caudal tratado medio (m ³ /d)	22100
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	6900
Carga media tratada (kg DBO ₅ /d)	5000

Tabla A2. Parámetros operacionales de la EDAR

PARÁMETRO	VALOR
Q influente (m ³ /d)	20100
Q salida decantador primario (m ³ /d)	20000
Q salida decantador secundario_1 (m ³ /d)	20000
Q salida decantador secundario_2 (m ³ /d)	20000
Q fangos tratados (m ³ /d)	70
Sequedad fangos tratados (%)	3
Qrecirculación centrífuga (m ³ /h)	11
θ_h decantador primario (h)	6
θ_h decantador secundario_1 (h)	4
θ_h filtros percoladores y decantador secundario_2(h)	4
θ_h digestor aerobio (d)	5
g fango por habitante equivalente y día	25,4

C.6 Aplicación de fangos de EDAR en agricultura

La aplicación de fangos en agricultura viene siendo una práctica común en nuestro país. Según datos oficiales del Registro Nacional de Lodos aproximadamente el 80 % de los lodos generados se ha destinado a su uso en el sector agrario. Lo que permite reducir su depósito en vertedero o incineración contribuyendo con la política comunitaria de “fin de residuos” (Gobierno de España, 2019).

Además, está demostrado, que los suelos abonados con lodos pueden presentar mayor rendimiento de los cultivos que los suelos bien fertilizados. Y que a largo plazo, las propiedades del suelo mejoran su calidad (Alvarenga et al., 2017; Singh et al., 2008).

Es por ello, que el control en la aplicación del fango en agricultura, unido a una mayor exigencia en los tratamientos de estos, tiene como objetivo evitar la propagación de microorganismos patógenos. Debido a este motivo, resulta extremadamente importante realizar estudios de supervivencia de estos microorganismos en el suelo, una vez que se ha incorporado el fango.

Los estudios a escala real que se plantean este seguimiento y control son pocos. Asimismo, existe gran disparidad destacable entre los resultados y conclusiones obtenidos. Estas grandes diferencias se deben principalmente a la variación en las condiciones experimentales, las propiedades agronómicas, la heterogeneidad de las muestras, la climatología, el periodo de análisis o el tipo de fango (Gondim-Porto et al., 2016; Lang et al., 2007; Schwarz et al., 2014).

D. Valores límite para la aplicación de fangos en suelos agrícolas

Los valores que se detallan a continuación son un extracto del Anexo IA e IB pertenecientes al RD 1310/1990

Tabla A3. Valores límite de metales en fangos y suelo, según RD 1310/1990

	PARÁMETRO	UNIDADES	Suelos con pH<7	Suelos con pH>7
ANEXO IA Valor límite de concentración de metales pesados en los suelos	Cadmio	mg/kg materia seca	1	3,0
	Cobre		50	210,0
	Níquel		30	112,0
	Plomo		50	300,0
	Zinc		150	450,0
	Mercurio		1	1,5
	Cromo		100	150,0
ANEXO IB Valor límite de concentración de metales pesados en los lodos destinados a su utilización agraria	Cadmio	mg/kg materia seca	20	40
	Cobre		1000	1750
	Níquel		300	400
	Plomo		750	1200
	Zinc		2500	4000
	Mercurio		16	25
	Cromo		1000	1500

Se detallan los criterios microbiológicos recogidos en diferentes guías y normas dentro de la UE.

Tabla A4. Criterios de calidad para microorganismos en lodos (Europeo, 2000, 2003, 2010)

NORMA O CRITERIO DE CALIDAD				
REFERENCIA	INDICADOR MICROBIOLÓGICO	VALOR	UNIDADES	TRATAMIENTO
Documento de trabajo, UE, 2000	<i>E.coli</i>	Reducción 6 log hasta $<5 \cdot 10^2$	UFC/g base húmeda	Tratamiento avanzado
	<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	50 g base húmeda	
	<i>E.coli</i>	Reducción 2log	UFC/g base húmeda	Tratamiento convencional
Propuesta de Directiva, UE, 2003	<i>E.coli</i>	$<1 \cdot 10^3$ o reducción 99.99%	UFC/g base seca	Tratamiento avanzado
	Huevos <i>Ascaris</i>	Ausencia	-	
	<i>Clostridium perfringens</i>	$<3 \cdot 10^3$ esporas	1 g base seca	
	<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	50 g base húmeda	Tratamiento convencional
	<i>E.coli</i>	$<5 \cdot 10^5$	UFC/g base húmeda	
Documento de trabajo UE 2010	<i>E.coli</i>	$<5 \cdot 10^5$	UFC/g base húmeda	No especificado
	<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	25-50 g base húmeda	

E. Metodología analítica. Parámetros microbiológicos

E.1 Protocolo de trabajo en el laboratorio de microbiología del grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental

En el presente documento se muestra el protocolo de trabajo en un laboratorio de microbiología con el objetivo de favorecer las condiciones de trabajo en el mismo

Acceso al laboratorio:

El acceso al laboratorio queda restringido al personal autorizado.

Higiene en el laboratorio:

1. En el laboratorio de microbiología queda totalmente prohibido comer, beber y fumar, así como el almacenamiento de comida y bebida. Además, hay que evitar llevarse a la boca objetos (bolígrafos, lapiceros, etc.), así como tocarse ojos y nariz
2. El uso de bata, guantes y gafas de seguridad queda bajo la responsabilidad de cada uno de los miembros del personal. Sin embargo, se debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con material potencialmente infeccioso. Por lo tanto, se recomienda el uso de guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos. No se abandonará la zona de trabajo con los guantes puestos, ni se tocará el teléfono, ordenador, material de oficina, etc. Además se recomienda el uso de guantes cuando se vaya a utilizar material estéril. Las condiciones de limpieza en el laboratorio de microbiología tienen que ser exigentes con el fin de evitar una posible contaminación tanto de las personas como del material de trabajo.
3. Las mesas de escritorio no son mesas de laboratorio, por lo que se evitará el uso de material contaminante sobre las mismas.

Esterilización del material:

1. El material de vidrio (botellas, vasos de precipitado, erlenmeyers, tubos de ensayo, etc.) previamente lavados se someterá a un proceso de esterilización en el autoclave previo a su posterior uso en el trabajo en el laboratorio.
2. El material de vidrio se recubrirá con papel de aluminio con el objetivo de que no entre agua en el interior durante el proceso de autoclavado.
3. Los miembros del laboratorio tienen que comprobar que hay material disponible para que el resto del grupo pueda seguir su experimentación. Así será fundamental que todos nos encarguemos de rellenar las cajas de puntas, los botes de spreaders, de eppendorf, etc cuando se observe que estos se acaban.
4. Con el objetivo de que los miembros del laboratorio sepan si el material está estéril o no, todo el material se etiquetará con cinta adhesiva de autoclave. En dicha cinta aparecen unas líneas negras una vez que el proceso de esterilización ha terminado. Todo material que no tenga dicha etiqueta será considerado como NO ESTÉRIL y por tanto podrá retirarse.
5. El material de trabajo usado que haya estado en contacto con microorganismos patógenos debe ser sometido a un proceso de autoclavado y a un posterior

lavado con agua, y jabón. Así cada uno debe ser responsable del material que usa y encargarse de dejarlo limpio en el mismo día para que el resto de los miembros del laboratorio puedan utilizarlo en caso de necesidad. En el caso de que no pueda ser autoclavado el mismo día, este material se depositará en la zona destinada para material pendiente de esterilización.

6. Todo el material desechable que haya sido usado y haya estado en contacto con microorganismos (puntas, placas Petri, spreaders, etc.) se depositará en las bolsas especiales de autoclave. Cuando un miembro del laboratorio observe que una de estas bolsas se encuentra llena, deberá meterla en el autoclave intentando evitar la acumulación de residuos microbiológicos en el laboratorio. Una vez el proceso de esterilización ha concluido la basura se puede depositar en el cubo de residuos habitual.
7. El vidrio roto se depositará en el recipiente adecuado habiendo sometido a un proceso de autoclavado previo si este ha estado en contacto con gérmenes patógenos.
8. Queda terminantemente prohibido mezclar el material esterilizado con el material usado, así de este modo una punta de pipeta usada no puede ser devuelta a su caja o no se pueden mezclar tubos eppendorf usados con los esterilizados en el mismo bote.
9. El material utilizado sólo podrá abrirse cerca de un mechero Bunsen o en el interior de la campana de flujo laminar con el fin de evitar la contaminación del mismo. En caso de que no haya sido así, deberá volver a someterse a un proceso de esterilización.
10. La mesa de trabajo del laboratorio deberá limpiarse exhaustivamente con alcohol una vez se termine de trabajar de esta forma evitaremos expandir los gérmenes.

Frigorífico:

El tamaño del frigorífico del laboratorio es limitado y por lo tanto hay que tratar de guardar lo necesario el tiempo necesario. De este modo trataremos de seguir estas pautas:

1. Las muestras que entren en el frigorífico deben estar perfectamente etiquetadas. Una vez analizadas se mantendrán en la nevera por un tiempo nunca superior a una semana excepto en aquellos casos en los que se requiera durante más tiempo. De este modo todas aquellas muestras que se consideren llevan demasiado tiempo en el frigorífico podrán ser retiradas.
2. En aquellos casos en los que sea necesario congelar una muestra, esta se guardará en el arcón congelador y nunca en el congelador del frigorífico.
3. El congelador del frigorífico se reserva única y exclusivamente para la conservación de cepas bacterianas, reactivos y hielo.
4. Las muestras que ya hayan sido analizadas deberán ser sometidas a autoclavado antes de verterlas al fregadero o al cubo de la basura.
5. El almacenaje de placas Petri con medio de cultivo en el frigorífico se realizará en cajas o en las bolsas en las que se embalan las propias placas. Las placas deberán ser etiquetadas con el objetivo de poder identificar en cada momento y por cualquier miembro del laboratorio de qué medio de cultivo se trata.

6. Se intentará que las placas no permanezcan más de 15 días en la nevera sin ser utilizadas puesto que estas tienden a degradarse y a contaminarse.
7. Queda totalmente prohibido mezclar en el mismo envase placas utilizadas con placas sin utilizar, de este modo evitaremos la contaminación de las placas nuevas.
8. Las placas de cultivo joven y puro de una bacteria deberán cerrarse con parafilm y deberán estar perfectamente etiquetada con el nombre de la bacteria y la fecha de siembra.
9. Se establecerá una clasificación de baldas en el frigorífico, depositándose el material más contaminante en la parte baja del mismo, y el material limpio y estéril en la parte superior. De este modo evitaremos que posibles goteos o derrames contaminen el material estéril.
10. Se podrán guardar en el frigorífico placas sembradas que queden pendiente de conteos o cualquier otra acción, pero su tiempo de permanencia en el frigorífico no será superior a 3 – 4 días.
11. Todos los miembros del laboratorio deberán encargarse de mantener limpio y ordenado el frigorífico con el objetivo de que todos tengamos espacio suficiente para poder usarlo.

Autoclave:

El autoclave es una pieza fundamental en el laboratorio de microbiología puesto que es el encargado de esterilizar todo el material, por lo tanto es necesario seguir una serie de pautas para utilizarlo de forma correcta.

1. Antes de encender el autoclave hay que cerciorarse de que el nivel de agua destilada en su interior supera la rejilla del fondo del mismo. El agua destilada recubre la resistencia del autoclave. En el caso de que el autoclave se quedase sin agua, la resistencia se rompe lo que supone un importante trastorno para el laboratorio tanto a nivel económico como a nivel laboral.
2. El agua del autoclave se sustituirá una vez cada 3 meses para ello simplemente hay que abrir la válvula de drenaje hasta que este se vacía. Una vez vacío se rellena de nuevo con agua destilada arrastrando previamente la suciedad que acumula el fondo del equipo.
3. Intentaremos no ser egoístas y si observamos que hay material acumulado para autoclavar lo autoclavamos aunque no sea nuestro.
4. Las bolsas de basura se introducirán en un cubo y éste en el autoclave. De este modo si la bolsa se rompe, la basura no se esparcirá por el autoclave.
5. Intentaremos no mezclar basura con material que queremos esterilizar para utilizar en el laboratorio. En el caso de que la mezclamos, la basura la depositaremos en el fondo del autoclave y encima el material limpio así evitaremos que un posible desprendimiento de la basura ensucie el material limpio.
6. No dejaremos el autoclave en funcionamiento durante toda la noche pues es peligroso.

Material:

1. Todos los miembros del laboratorio son responsables de comunicar al resto que en el caso de que cierto material esté a cerca de terminarse. De este modo se evitará quedarse sin material.
2. Los pedidos los gestionará la persona asignada por la profesora Ormad a excepción de las bombonas de camping gas. Cualquiera de los miembros del laboratorio puede encargarse de su reposición.

E.2 Consideraciones iniciales

Tabla A5. Material y reactivos para el análisis microbiológico (López Martín, 2017)

MATERIAL	MARCA
Placas Petri estériles $\phi=90\text{mm}$ y $\phi=55\text{mm}$	Gosselin ®
Filtros de membrana estériles	Whatman ®
Embudos de filtración	Millipore ®
Asa de Drigalsky (o asa de vidrio)	-
Pinzas estériles	-
Medios de cultivo deshidratados	Scharlau ®
Suero fisiológico (0.9% NaCl) o agua de peptona	Scharlau ®
Agua desionizada	-

Tabla A6. Instrumentos para llevar a cabo el análisis microbiológico (López Martín, 2017)

INSTRUMENTO	MARCA	MODELO	FUNC.
Autoclave	J.P. Selecta ®	Presoclave III 50	Esterilización
Estufas de cultivo	J.P. Selecta ®	Incudigit 36L y 72L	Cultivo bacteriológico
Cabina de flujo laminar	Cruma	670 FL	Atmósfera estéril
Vortex agitador	Velp Scientifica ®	ZX3	Homogeneización
Rampa de filtración	Millipore ®	Sistema Microfil	Análisis bacteriológico
Contador de colonias	Interscience	Scan 100	Recuento
Micropipetas	Gilson	Pipetman Classic	Medición volúmenes
Mechero Bunsen	-	-	Atmósfera estéril

E.3 Preparación de placas con los medios de cultivo

Tabla A7. Normas de análisis y medios de cultivo empleados para la determinación de microorganismos mediante el recuento en placa (López Martín, 2017)

PARÁMETRO	MÉTODO ESTÁNDAR	REFERENCIA	MEDIO DE CULTIVO
Coliformes totales	UNE EN ISO 9308-1	(ISO y AENOR, 2014)	Chromogenic Coliform Agar (CCA)
	Standard Methods	(Eaton et al., 2005)	
	9215B		
	9215C		
9215D			
<i>Escherichia coli</i>	UNE EN ISO 9308-1	(ISO y AENOR, 2014)	Chromogenic Coliform Agar (CCA)
	Standard Methods	(Eaton et al., 2005)	Agar Glucuronico triptona y bilis (TBX) Agar Maconkey
	9215B		
	9215C		
	9215D		
9222D			
	UNE EN ISO 16649-1:2013	(ISO y AENOR, 2013)	Agar TBX
	ISO 16649-2:2001	(ISO, 2001)	Agar TBX
<i>Enterococcus sp.</i> (<i>Enterococcus faecium</i>)	UNE EN ISO 7899-2	(ISO y AENOR, 2001)	Agar Slanetz&Bartley
	Standard Methods	(Eaton et al., 2005)	Agar Bilis Esculina Azida (para E.faecium)
	9215B		
	9215C		
9215D			

E.4 Método del Número Más Probable (NMP)

Tabla A8. Comprobación de positivos mediante datos tabulados

Número de tubos que dan reacción positiva en las series de tres tubos inoculados con:			NMP/100mL
10 mL	1 mL	0,1 mL	
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100

F. Resultados de laboratorios externos

F.1 Caracterización físico-química

Seguidamente, se añade el informe analítico realizado por INTIA que permite determinar el tipo de suelo en el que se aplican las enmiendas orgánicas. El estudio se realiza en las filas 1,7,13 y 19 en el perfil 0-30 y 30-60 cm de profundidad y siempre antes de la deposición de los abonos por lo que se pueden extrapolar a toda la parcela.

Tabla A9. Caracterización físico-química inicial suelo 1 (0-30cm)

Determinación	Resultado	Unidades
Humedad residual	1,67	%
Arena Gruesa	5,24	%
Arena media	6,52	%
Arena fina	11,01	%
Limos gruesos	12,45	%
Limos finos	31,67	%
Arcillas	33,11	%
pH agua	8,43	-
pH KCl	7,43	-
Mat. Org. rica oxidable	1,9	%
P2O5	9,58	mg/kg
K2O	285,4	mg/kg
Nitrógeno total	0,14	%
Relación C:N	7,69	-
Carbonatos totales	33,15	%
Caliza activa	8,68	%
Conductividad eléctrica	0,46	dS/cm

Tabla A10. Caracterización físico-química inicial suelo 2 (30-60cm)

Determinación	Resultado	Unidades
Humedad residual	1,73	%
Arena Gruesa	3,30	%
Arena media	5,97	%
Arena fina	10,23	%
Limos gruesos	11,91	%
Limos finos	31,24	%
Arcillas	37,34	%
pH agua	8,50	-
pH KCl	7,46	-
Mat. Org. rica oxidable	1,63	%
P2O5	6,29	mg/kg
K2O	240,97	mg/kg
Nitrógeno total	0,13	%
Relación C:N	7,47	-
Carbonatos totales	31,81	%
Caliza activa	9,24	%
Conductividad eléctrica	0,43	dS/cm

Tabla A11. Caracterización físico-química inicial suelo 3 (0-30 cm)

Determinación	Resultado	Unidades
Humedad residual	1,72	%
Arena Gruesa	4,30	%
Arena media	4,51	%
Arena fina	8,06	%
Limos gruesos	11,10	%
Limos finos	33,99	%
Arcillas	38,04	%
pH agua	8,50	-
pH KCl	7,48	-
Mat. Org rica oxidable	1,91	%
P2O5	12,90	mg/kg
K2O	282,47	mg/kg
Nitrógeno total	0,15	%
Relación C:N	7,6	-
Carbonatos totales	31,09	%
Caliza activa	10,08	%
Conductividad eléctrica	0,48	dS/cm

F.4 Grado de madurez: índice de germinación

Tabla A12. Resultados IG primer ensayo

02-abr		ÍNDICE GERMINACIÓN (medidas en cm)								
BL		11	12	13	21	22	23	31	32	33
24h	03-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	04-abr	1,3	1,3	0,7	0,7	0,7	0,7	0,5	0,5	0
72h	05-abr	2	1,8	1,8	1,2	1,5	1,4	0,6	0,5	0
F		11	21	31	21	22	23	31	32	33
24h	03-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	04-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72h	05-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V3cribada		11	21	31	21	22	23	31	32	33
24h	03-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	04-abr	0,7	0	0	0,5	0	0	1	1	0
72h	05-abr	2	0	0	1,5	1,4	0	2,3	3,6	2,2
R3cribada		11	21	31	21	22	23	31	32	33
24h	03-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	04-abr	0,4	0	0	0,3	0	0	0	0	0
72h	05-abr	1,5	1,5	0	1,5	1	0	0	0	0

Tabla A13. Resultados IG segundo ensayo

10-abr		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BI1											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	1,2	0,5	0,6	1	0,8	0,7	0,6	0,2	0	0,3
BI2											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0,1	0,3	0,3	0,4	0,2	1	0,6	0,4	0,5
BI3											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,4	0,7	0,2	0,5	0,1	0,5	0,8	0,4
FF1											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0	0	0	0,3	0,5	0,2	0	0	0
FF2											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,2	0,3	0	0	0	0	0	0
FF3											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0
FAR1											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FAR2											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FAR3											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0
S2											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0
S3											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0
SU1											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0,7	0,1	1,1	1	1	0,3	0,2	0,5	0,8
SU2											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,8	1,3	1	1	0,2
SU3											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0,1	0,1	0,2	0,5	1	0,5	0,2	1,5	0,1	0,1
C1											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	2	0,5	1,5	1,8	2,1	1,5	2,5	1,5	1	0
C2											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0	1,6	1,5	0,3	1,4	1,5	2	1,6	1,4
C3											
24h	11-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	12-abr	0	0	1	1,3	1,2	2,5	1,3	1,6	2	0

Tabla A14. Resultados IG tercer ensayo

24-abr		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BI1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	0,8	0,4	0,8	0,5	0,9
BI2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,3	0,3	1,5	0,8	0,3	0,6	1,2	0,2	0,8
BI3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,7	0,6	0,1	0,7	0,8	0,3	0,6	0,9	0,2
T1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	1,2	1	1,3	1,7	1,2	0,5	0,7	1,6	1,2
T2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0	1,4	4,5	1,1	1,4	0,8	0,7	1,7	0,4	0,9
T3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	1,6	1,4	0,6	0,8	0,8	1	1,5	0,6
SU1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	1	0,6	0,3	0,6	1,3	0,4	0,3	0,3	1	0,6
SU2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,9	0,5	0,3	0,4
SU3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	0,1	1,2	0,3	1	0,2	0,3	0,7	0,5
C1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0	0	0	0,3	0,5	0,8	1,1	0,6	0,3	1,5
C2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0	0,1	0,1	0,8	0,5	0,3	0,4	0,7	0,5	1,4
C3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0	0,1	0,1	1,4	0,9	0,7	0,7	0,5	1	0,6
SE1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
SE2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0
SE3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0
F1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
F3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FAR1											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FAR2											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FAR3											
24h	25-abr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	26-abr	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla A15. Resultados IG segundo muestreo

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SC1											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0	0	0,5	0,5	0,9	0,5	1,5	1,6	1	1,5
SC2											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0	0	0,1	0	1,6	2	1,7	1,3	0,3	0,8
SC3											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,1	1,3	0,6	1	0,5	1	1	1	1,2	0,2
TU1											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0	0	0	0,1	0,3	0,3	1,3	1,7	0,6	1,5
TU2											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,1	0,1	0,1	0,2	0,6	0,8	0,7	0,7	1,2	1,5
TU3											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,3	0,6	0,6	0	1,2	1,4	0,8	1	1	1,5
SU1											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1	1,2	0,9	0,4	0,7
SU2											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,1	0,1	0,1	1,5	1	0,8	1,3	1,4	1,2	1,5
SU3											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4
SF1											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0	0,1	0,1	1	1	0,5	0,5	0,7	0,3	1,2
SF2											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0,1	0,1	0,1	0,7	0,8	1,2	0,5	0,7	1,8	1,4
SF3											
24h	21-may	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	22-may	0	0,1	0,1	0,1	0,1	1,3	1	0,3	0,8	1

Tabla A16. Resultado IG tercer muestreo (*Lepidium Sativum*)

05-jun		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BI1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	1	0,8	1,3	0,7	0,5	0,3	0,4	1,1	0,5	0,5
BI2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,5	0,1	0,3	1	1	1	0,6	0,9	0,5	0,5
BI3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	1,1	0,5	0,3	0,7	0	0,3	0,2	1	0,3	0,5
A1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0,2	0,1	0,7	0,3	1,2	0,9	0,5	0,5	0,1
A2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	0	0,5	0,7	0,5
A3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,5	0,7	0,5	0,5	0,7	0,3	0,4	0,7	1
TU1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,6	1	0,4	0,4
TU2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0	0,7	0,1	0,1	0,8	0,7	0,7	1
TU3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0,4	0,6	0,5	0,4	0,1	0,5	0,5	0,4	0,3
SU1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,6	0,7	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3
SU2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,3	0,3	0,3	0	1	0,5	0,2	0,3	1	0,1
SU3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,1	0,6	0,3	1	0,1	0,4	0,5	0,5	0,3
SC1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,1	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	1
SC2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,1	1	0,3	0,8
SC3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	1	0,8	0,8
SF1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	1
SF2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,3	1,1	0,3
SF3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,8	0,4	0,5
SC21											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0,7	0,7	0,6	0,5	0,3	0,2	0,8	0,6
SC22											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,5	0,5	0,6
SC23											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,5	0,6

Estudio de aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR y de compost procedente de la fracción orgánica de residuos urbanos.

SF21											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0,2	0,2	0,2	0,6	0,6	1	0,2	0,7	0,7
SF22											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	1,1	0,8	0,8
SF23											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,8
F1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0	3,4	3,5	1,5	1,2	2	1,8	1,5
F2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	1,2	2	1,8	1,7	1,1	1	0,4	1
F3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0	0	0	0	1	0,3	0,7	0,2
SI1											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	1
SI2											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	0,8	0,6
SI3											
24h	06-jun	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	07-jun	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	1	0,8	0,7	0,4

Tabla A17. Resultados IG tercer muestreo (*Raphanus sativus*)

05-jun		RÁBANOS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SU											
48h	10-jun	7,5	5,5	5	6	4	7,5	2,3	1,5	2,1	5
BL											
48h	10-jun	0	4	2,5	3,7	0,5	1,5	1,5	2,7	2	3,5
TU											
48h	10-jun	0	4,5	1	2,2	2	2	2,1	4,5	1	4,7
SI											
48h	10-jun	5,1	6	2,2	2,3	2,4	6	1	5	1	4,5
SC1											
48h	10-jun	2	2	4,2	3	4,5	2	7	1	4	1
SC2											
48h	10-jun	1,5	0,5	2,5	4,3	3,5	6	3,5	4,5	4	2,5
SF1											
48h	10-jun	4	5,5	6,5	6	7,5	5,8	1,5	5,5	3	5
SF2											
48h	10-jun	2,3	2,7	2	0,5	3	1	1,5	2,5	1,7	5
A											
48h	10-jun	9,2	7,5	6	8,5	7	1,5	2	4,5	2,1	0,8
F											
48h	10-jun	6,7	6,2	9	7,2	7,1	9,2	2,5	6	6,5	9,3