



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Oxidación avanzada para la eliminación de contaminantes emergentes en agua: evaluación como agua de riego pre y post tratamiento

Oxidación avanzada para a eliminación de contaminantes emerxentes na auga: evaluación como auga de rego pre e post tratamento

Advanced oxidation for the elimination of emerging contaminants in water: evaluation as irrigation water before and after treatment

Mario Pedreira Díaz

Curso: 2020 – 2021. Convocatoria: Junio

Director Académico: Federico Pomar Barbeito

ÍNDICE

Resumen.....	2
Abstract.....	2
Palabras clave.....	2
1. Introducción.....	3
2. Objetivos.....	5
3. Material e métodos.....	6
3.1. Especies objeto de estudio.....	6
3.1.1. <i>Brassica rapa</i> L.	6
3.1.2. <i>Lolium perenne</i> L.	6
3.2. Tratamiento de aguas.....	7
3.3. Ensayos de germinación.....	8
3.4. Ensayos en planta.....	8
3.4.1. Tratamiento general.....	8
3.4.2. Medida de la capacidad fotosintética.....	9
3.4.3. Medida de fenoles solubles totales.....	9
4. Resultados.....	11
4.1. Ensayos de germinación.....	11
4.1.1. <i>Brassica rapa</i> L.	11
4.1.2. <i>Lolium perenne</i> L.	14
4.2. Ensayos en planta.....	16
4.2.1. Medida de la capacidad fotosintética.....	16
4.2.1.1. <i>Brassica rapa</i> L.	16
4.2.1.2. <i>Lolium perenne</i> L.	18
4.2.2. Medida de fenoles solubles totales.....	20
4.2.2.1. <i>Brassica rapa</i> L.	20
4.2.2.2. <i>Lolium perenne</i> L.	21
5. Discusión.....	22
6. Conclusiones/Conclusions.....	24
7. Bibliografía.....	25

RESUMEN

En este estudio se evalúa el uso de aguas residuales y de los contaminantes diquat y glifosato como agua de riego pre y post tratamiento, de una especie de interés comestible, *Brassica rapa*, y de una especie de interés ornamental, *Lolium perenne*. Varias de las disoluciones preparadas han sido tratadas con fotólisis, fotocátalisis y adsorción sobre fotocatalizador.

Se realizaron ensayos de germinación para establecer la viabilidad de las semillas y su capacidad germinativa en contacto con las disoluciones ya tratadas. También se llevaron a cabo ensayos en plantas adultas regadas durante una semana con las disoluciones preparadas, con el objetivo de medir la capacidad fotosintética y cantidad de fenoles totales en las hojas de ambas especies.

ABSTRACT

This study evaluates the use of residual waters and the contaminants diquat and glyphosate as irrigation water before and after treatment, of one species of edible interest, *Brassica rapa*, and one species of ornamental interest, *Lolium perenne*. Some of the prepared solutions were treated with photolysis, photocatalysis and adsorption on photocatalyst.

Germination assays were made to establish the viability of the seeds and their germinative capacity in contact with the pretreated solutions. Assays on adult plants irrigated with the prepared solutions for a week were also made, aiming to measure the photosynthetic capacity and total phenol quantity of the leaves of both species.

PALABRAS CLAVE: *Brassica rapa*, *Lolium perenne*, aguas residuales, diquat, glifosato, ensayo de germinación, capacidad fotosintética, fenoles solubles totales

1. Introducción

De la precipitación que cae sobre la tierra (aproximadamente 110 000 km³, excluyendo océanos, según la FAO) más de la mitad se pierde por evapotranspiración de los bosques, 5% se usa en la agricultura de secano y el resto (43 000 km³ cada año) constituye los recursos renovables del agua (lagos, ríos y acuíferos). Se estima que en los últimos 35 años se duplicó la cantidad de agua dulce usada para la satisfacción de demandas humanas, que actualmente consta de la mitad del agua dulce disponible económicamente.

El aumento de la población mundial y el cambio climático son factores que incrementan una potencial escasez de agua; en el último par de décadas se ha disminuido más de un 20% la cantidad de agua dulce disponible por persona. Más de 4.4 billones de personas viven en lugares con baja disponibilidad de agua, principalmente en zonas de agricultura asiáticas.

En las últimas décadas el porcentaje de uso de agua global superó más del doble del crecimiento poblacional; de similar forma, en el último siglo la extracción de agua global se incrementó 1.7 veces más rápido que la población. Aunque la mayoría del agua extraída sea devuelta al medio natural, es posible que su calidad haya sido degradada.

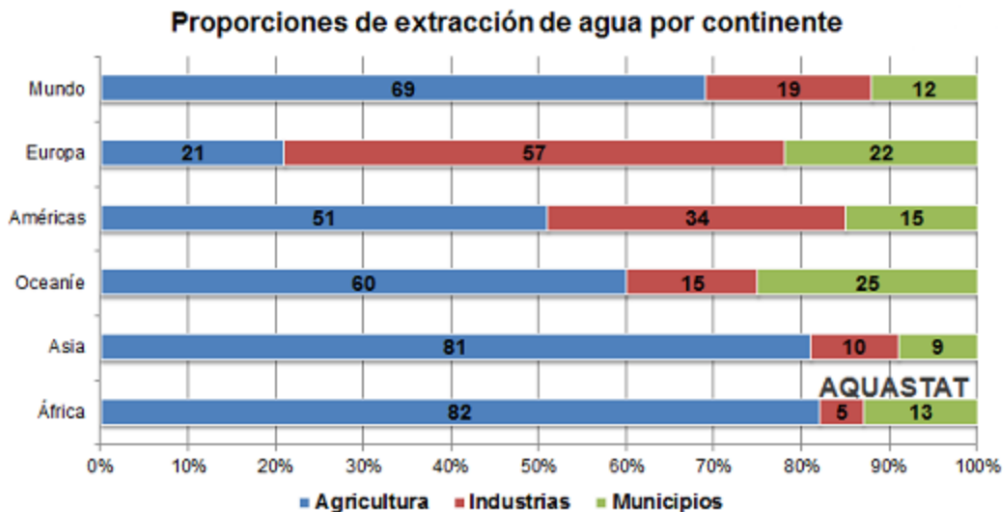


Figura 1.-Tomado de la web oficial de la FAO

(<http://www.fao.org/aquastat/es/overview/methodology/water-use>)

La agricultura a nivel mundial supone casi el 70% de las extracciones de agua, siendo mucho menor en países desarrollados que en aquellos no desarrollados

(en los que se puede alcanzar hasta un 95%). En Europa se usa un porcentaje muy bajo de agua extraída para agricultura, lo cual se debe a que predomina la agricultura de secano, estando presente un 85% de la agricultura de regadío en el sur del continente (Portugal, España, Francia, Italia y Grecia). En España la agricultura de regadío consiste en más de la mitad de la agricultura total del país.

El agua usada para la agricultura puede ser natural (agua de lluvia, lagos, ríos y acuíferos) o reutilizada (aguas residuales de origen urbano o industrial). El origen principal del agua de regadío es natural, por lo que se debe promover el reciclado del agua e investigar nuevos métodos más efectivos en su depuración.

Las aguas residuales de origen industrial presentan partículas en suspensión, coliformes, aceites, grasas, arenas, sustancias químicas, etc. Para su devolución a un cauce en el medio natural o reutilización de estas se deberán seguir una serie de tratamientos en su depuración. Los sólidos de mayor tamaño, grasa y arena se eliminan por filtración en el pretratamiento, así como la aireación de las aguas con el objetivo de reducir los compuestos orgánicos volátiles presentes en las mismas.

El tratamiento primario consiste en la eliminación de sólidos en suspensión. Mediante flotación se pueden retirar aceites, grasas y espumas en la superficie; la sedimentación o decantación se usa para separar los sólidos de mayor densidad que caen al fondo por gravedad; la floculación o coagulación consiste en la adición de sustancias químicas que reaccionen con las partículas coloidales en suspensión, de forma que el producto obtenido precipite para facilitar su separación; también se puede usar una filtración en un medio poroso con un tamaño de partícula determinado, con el objetivo de reducir al máximo las partículas presentes en suspensión.

El tratamiento secundario se usa para la degradación de la materia orgánica en disolución mediante procesos aeróbicos y anaeróbicos. Los sistemas aerobios consisten en tanques en los que se burbujea oxígeno, los cuales presentan un lecho bacteriano, lodos activos o filtros verdes. En cuanto a los sistemas anaeróbicos, los tanques se encuentran cerrados para evitar la entrada de oxígeno, de forma que las bacterias anaerobias produzcan la fermentación de la materia orgánica.

Por último, el tratamiento terciario se usa para eliminar agentes patógenos, de los cuales las bacterias fecales suelen ser las más frecuentes. En esta etapa se puede clorar el agua, aplicar radiación ultravioleta como el método más eficaz para eliminar microorganismos, usar ósmosis inversa o intercambio iónico.

Además de los métodos comentados anteriormente se siguen investigando otros que permitan un mayor porcentaje de depuración, como la fotocatálisis.

Los beneficios del uso de agua reciclada como riego constan de la presencia de nutrientes y materia orgánica que favorezca el crecimiento de las plantas, su disponibilidad durante todo el año y el aumento de la disponibilidad de agua dulce limpia para cubrir otras necesidades al reducir su porcentaje de uso en el riego

En determinadas partes de países industrializados como Australia donde hay escasez de agua, el uso de agua reciclada para riego es una solución más económica que la desalinización de agua marina o importación de agua dulce. En Sydney se usan aproximadamente 3.8 GL de agua reciclada con el fin de regar parques, praderas, campos de golf y de otros deportes; en Australia, del agua reciclada total en 2009-2010 se usó un 37% en agricultura.

Este TFG desarrollado en el área de Fisiología Vegetal está coordinado con el TFG QF_11: "Oxidación avanzada para la eliminación de contaminantes emergentes en agua", desarrollado en el área de Química Física, en el cual fueron tratadas aguas residuales de vertidos industriales en A Coruña.

2. Objetivos

En este trabajo se estudia la viabilidad del uso de aguas residuales en presencia de contaminantes emergentes, comparando varios tratamientos, como agua de riego de dos especies comúnmente cultivadas en Galicia: *Brassica rapa* o nabo y *Lolium perenne* o ryegrass inglés. Se estudia la capacidad de germinación de las semillas, así como la capacidad de fotosíntesis y cantidad de fenoles totales de plantas adultas regadas con las diferentes disoluciones ya preparadas.

Ambas especies cultivadas tienen amplia distribución; mientras que *Brassica rapa* se trata de una especie comestible, de interés para la alimentación humana y animal, *Lolium perenne* es una gramínea ampliamente cultivada en

praderas de todo el mundo con interés forrajero y ornamental. También presentan una rápida germinación y crecimiento, además de tratarse de cultivos poco exigentes, lo cual favorece su estudio.

3. Material y métodos

3.1. Especies objeto de estudio

3.1.1. *Brassica rapa* L.

Planta de la familia Brassicaceae y género Brassica, el cual comprende unas 35 especies de distribución principalmente mediterránea, especialmente en el suroeste de esta región. Varias de las especies son de gran importancia económica en el consumo humano.

Se trata de una planta anual o bienal de raíz napiforme, cuyos tallos ramificados pueden alcanzar 1.5 m. Las hojas caulinares son alternas, ásperas y rugosas. Presenta inflorescencia de racimos con 15-50 flores amarillas. Es de ciclo invernal, floreciendo desde principios de primavera hasta finales de verano. Fruto silicuas bivalvas, lineales, cilíndricas, de 5-6 cm de largo. Semillas globosas en hilera, de color castaño-rojizo a negro.

Habita en cultivos, bordes de caminos y pastos. Es una especie nativa del Mediterráneo este y central, hasta Irán y la península Arábiga, aunque actualmente se encuentra distribuida por gran parte del mundo.

3.1.2. *Lolium perenne* L.

Planta de la familia Poaceae y género Lolium, que consta de 8 especies euroasiáticas. Se cultiva de forma ornamental en céspedes y en pastos para forraje.

Es una hierba cespitosa perenne de 10-80 cm de altura, con tallos lisos. Las hojas son alternas, con limbo plano y lígula membranosa. Como inflorescencia presenta espiguillas hermafroditas con 3-10 flores. El fruto se trata de una cariopsis.

Habita principalmente praderas de secano, extendiéndose su cultivo por la mayoría de las regiones templadas del mundo; es nativa de Europa.

3.2. Tratamiento de aguas

En el TFG QF_11 (Oxidación avanzada para la eliminación de contaminantes emergentes en agua) se trataron aguas residuales de origen industrial, con contaminantes emergentes añadidos, mediante fotólisis, fotocátalisis y adsorción. Se trabajó con glifosato y diquat añadidos a las aguas residuales, en la concentración recomendada para el uso de cada uno [diquat (1 g/L) y glifosato (3.6 g/L)] y en diluciones 1/100, todo ello en las aguas residuales. Las disoluciones de aguas residuales, glifosato (36 mg/L) y diquat (10 mg/L) fueron sometidas a un proceso de fotólisis realizado en el siguiente montaje:

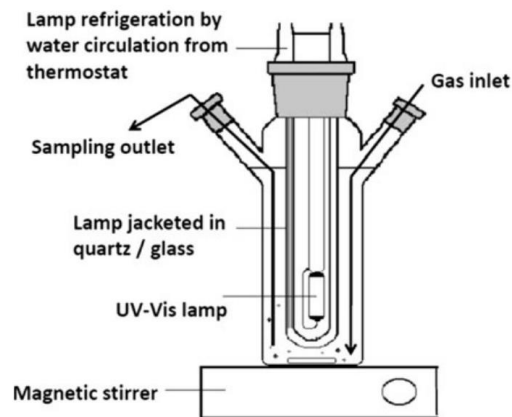


Figura 2.-Montaje de fotólisis

Una lámpara UV-Vis con refrigeración interna de agua se introduce en un reactor en el que se añade la disolución a tratar, el cual presenta una barra magnética que remueve la disolución debido a la placa agitadora que se sitúa bajo el reactor. Se deja actuar con la lámpara encendida ($\lambda = 254 \text{ nm}$) durante 3 horas.

Además, se prepararon pellets de un fotocatalizador sólido de composición 80% TiO_2 y 20% arcilla de Ecuador, el cual actúa especialmente bien en la adsorción del diquat. Para ello, en un bol se añade una cantidad conocida del fotocatalizador y una disolución de diquat (10 mg/L); si se deja actuar durante unas 3 horas bajo el sol se produce una fotocátalisis completa del diquat presente en la disolución, mientras que si actúa 3 horas en oscuridad se produce la adsorción de aproximadamente 2/3 de la cantidad de diquat en disolución.

3.3. Ensayos de germinación

Se realizaron ensayos de germinación con semillas de *Brassica rapa* y *Lolium perenne*. Para ello, primero se autoclava todo el material necesario: pinzas, placas, papel de filtro, puntas de micropipeta y botes con agua de grifo.

Se usaron placas Petri cuadradas de 14 cm de lado, para las cuales se cortaron 3 trozos de papel de filtro a medida que actuará como sustrato. En el papel superior introducido en cada placa se dibuja una cuadrícula con 25 cuadrados, en cada uno de los cuales se depositará una semilla para su siembra.

Antes de la siembra, las semillas fueron desinfectadas en una disolución de lejía al 1% durante 10 minutos agitadas con una barra magnética; pasados los 10 minutos se lavaron con agua destilada y se procedió a la siembra sobre el papel de filtro ya introducido en las placas.

El riego se hizo con varias disoluciones: agua (control), aguas residuales, aguas residuales fotolizadas 3h, glifosato (3.6 g/L), glifosato (36 mg/L), glifosato (36 mg/L) fotolizado 3h, diquat (1 g/L) diquat (10 mg/L), diquat (10 mg/L) fotolizado 3h, diquat (10 mg/L) fotocatalizado 3h y diquat (10 mg/L) adsorbido sobre fotocatalizador tras 3h. Se hicieron 3 réplicas de cada disolución usada en el riego, de forma que cada tratamiento consta de 75 semillas totales.

En el momento de la siembra se empaparon los papeles con unos 10 mL de la disolución; a partir de entonces cada 3 días se regaron con 4 mL. Las placas con las semillas ya sembradas se introdujeron en una cámara con luz artificial y una temperatura ambiente de 25-30°C. El número de semillas germinadas se tomó cada día durante 1 mes.

3.4. Ensayos en planta

3.4.1. Tratamiento general

Un semillero con tarros individuales de 4 cm de lado y 7 cm de alto se rellenó con una mezcla de turba/vermiculita 2:1 preparada anteriormente. En cada hueco individual se sembraron 3-5 semillas de *Brassica rapa*; el semillero se colocó sobre una bandeja, se subió a una terraza bajo el sol y se regaron con agua de grifo.

De forma similar, 4 macetas de 13 cm de diámetro y 17 cm de alto se rellenaron con la mezcla de turba/vermiculita 2:1 ya preparada. En cada

maceta se sembraron un puñado de semillas de *Lolium perenne*; las macetas también se subieron a la terraza y fueron regadas con agua de grifo.

Estas especies sembradas se dejaron crecer durante unas 4 semanas, tiempo tras el cual se procedió a regarlas con las mismas disoluciones que en los ensayos de germinación: agua (control), aguas residuales, aguas residuales fotolizadas 3h, glifosato (3.6 g/L), glifosato (36 mg/L), glifosato (36 mg/L) fotolizado 3h, diquat (1 g/L), diquat (10 mg/L), diquat (10 mg/L) fotolizado 3h, diquat (10 mg/L) fotocatalizado 3h y diquat (10 mg/L) adsorbido sobre fotocatalizador tras 3h.

Las hierbas adultas de *Lolium perenne* se separaron en 11 macetas para llevar a cabo los riegos por separado; entonces cada maceta fue regada con 40 mL de cada una de las disoluciones preparadas y otros 40 mL cada dos días durante una semana.

Las plantas de *Brassica rapa* se separaron en 11 grupos de 4 para su riego. Cada grupo de 4 plantas fue regado con unos 12 mL (3 mL por cada planta) de cada disolución por separado, volviendo a regar con aproximadamente 12 mL cada dos días durante una semana.

3.4.2. Medida de la capacidad fotosintética

Transcurrida la semana, las plantas se colocaron en un lugar oscuro durante 24 horas, tiempo tras el cual se tomaron medidas de fluorescencia de las hojas evitando en lo posible la incidencia de luz externa sobre las mismas antes de la medida.

Para ello, se tomaron los valores de la tasa de transporte de electrones (ETR) y del rendimiento cuántico del PSII mediante un fluorómetro de clorofila portátil (PAM-2100 de marca WALTZ). Se tomaron 10 medidas por cada tratamiento midiendo diferentes hojas en cada caso, obteniendo curvas en función del incremento de la intensidad lumínica (PAR) cada 12 segundos (10, 60, 120, 150, 210, 310, 440, 600, 850, 1250 y 1860 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$).

3.4.3. Medida de fenoles solubles totales

Después de realizar las medidas de fluorescencia de las hojas se cortan la mitad de las hojas de cada maceta de *Lolium perenne*. Se hace lo mismo con todas las hojas de *Brassica rapa* que hay de cada tratamiento. Se pesan las

hojas en fresco, tras lo cual se introducen en una estufa a 37°C durante 24 horas para llevarlas a sequedad. Entonces se toman los pesos en seco.

Para comenzar la extracción de fenoles se muelen 100 mg de hojas de cada tratamiento por separado en un mortero con 5 mL de metanol al 80%, obteniendo una disolución que se pasa a un tubo de ensayo de 20 mL y se añaden 5 mL de agua destilada. Se preparan réplicas por triplicado de cada tratamiento.

Los tubos se calientan en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos. Entonces se trasvasa cada disolución a un matraz para evitar el paso de tejido vegetal; el matraz se conecta a un rotavapor para evaporar el metanol, en un baño de 40°C (no se debe superar esta temperatura para evitar la degradación de los fenoles).

Pasados unos 25-30 minutos se evapora el metanol y queda el agua, momento en que se añade a la disolución acuosa unos 5 mL de acetato de etilo. Se agita y se deja reposar; se observan 2 fases; la fase superior (acetato de etilo con fenoles, menos denso que el agua) se recoge con una pipeta y se pasa a un matraz Erlenmeyer de 100 mL.

Para eliminar posibles restos de agua se añade Na_2SO_4 anhidro en exceso y se deja reposar un minuto. Entonces se filtra la disolución a un matraz y se evapora a sequedad en un rotavapor; es un proceso rápido, dura unos 5 min. El sólido obtenido se redisuelve en 1 mL de metanol que se recoge y se guarda en un tubo Eppendorf.

Para la medición espectrofotométrica de los fenoles se utiliza el método de Folin-Ciocalteu. Para ello, se preparan las réplicas y dos blancos en los cuales se sustituye la muestra por el solvente (metanol). En tubos Eppendorf se mezclan 750 μL de agua, 50 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 50 μL de la muestra, disolución que se deja incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Pasados los 3 minutos se añaden a cada tubo 150 μL de una disolución de Na_2CO_3 al 20% previamente preparada. Tras esta adición, se tapan los tubos con papel de aluminio y se dejan incubando durante 2 horas en oscuridad. Pasado ese tiempo, se trasvasa cada disolución a una cubeta en la que se medirá la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro.

Por otra parte, se prepara una recta patrón de ácido ferúlico. Para ello se preparan disoluciones de 0, 5, 10, 50, 100, 200, 400 mg/L, las cuales se tratarán por el método de Folin-Ciocalteu como se ha descrito anteriormente, sustituyendo la muestra por cada disolución de ácido ferúlico en cada caso. Se mide la absorbancia a 760 nm.

4. Resultados

4.1. Ensayos de germinación

4.1.1. *Brassica rapa* L.

Los ensayos de germinación se realizaron en placas cuadradas con papel de filtro como sustrato. En la figura 3 se observan las plántulas germinadas tras dos semanas a partir de la siembra; en A se ve una réplica de las semillas control (regadas con agua de grifo) y B se trata de una réplica de semillas regadas con aguas residuales. Mientras que las plántulas control no presentaron síntomas de problemas en la germinación, en la placa regada con aguas residuales se observa que se han desarrollado hongos; esto ocurre en la mayor parte de las placas con aguas residuales que no han sufrido fotólisis, pues este proceso elimina por completo los microorganismos en la disolución.

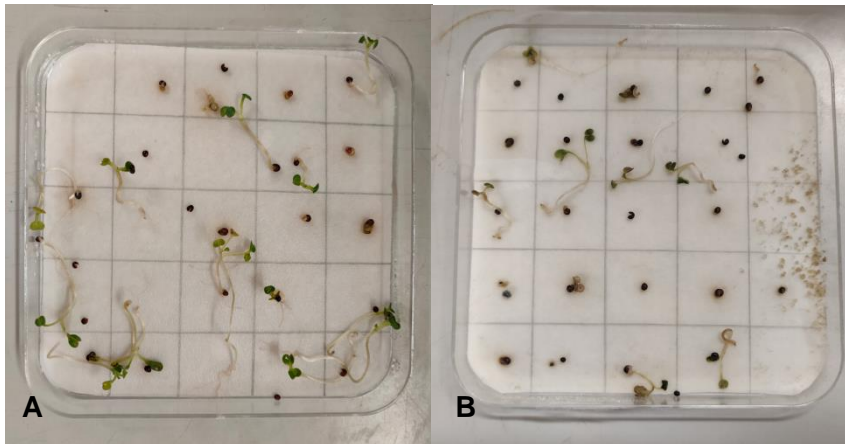


Figura 3.-Placas sembradas con *B. rapa* pasados 14 días desde la siembra: regadas con agua (A) y regadas con aguas residuales (B).

Tras la siembra de las semillas en las placas Petri, se contabilizaron diariamente aquellas que germinaron hasta el día 23, día en el cual germinó la

última semilla de *Brassica rapa*. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de semillas germinadas en cada tratamiento (Tabla 1). Además de las placas mostradas en la tabla se prepararon 3 réplicas con diquat (1 g/L), en las cuales no germinó ninguna semilla.

Tabla 1. Efecto de la presencia de aguas residuales y aguas tratadas en la germinación de semillas de *Brassica rapa*

Porcentaje de germinación en función del día a partir de la siembra										
Días	A	AR	ARF	GC	G	GF	D	DF	DFC	DAD
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	1.3	0.0	1.3	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
3	2.7	6.7	5.3	6.7	2.7	4.0	0.0	4.0	4.0	0.0
4	6.7	13.3	10.7	6.7	5.3	4.0	0.0	4.0	5.3	2.7
5	12.0	21.3	20.0	12.0	5.3	5.3	5.3	4.0	16.0	10.7
6	30.7	26.7	28.0	14.7	17.3	16.0	9.3	13.3	21.3	14.7
7	40.0	29.3	32.0	22.7	24.0	26.7	10.7	22.7	26.7	20.0
8	44.0	33.3	34.7	32.0	34.7	28.0	14.7	26.7	32.0	26.7
9	58.7	40.0	38.7	33.3	44.0	41.3	18.7	29.3	34.7	32.0
10	64.0	46.7	45.3	38.7	48.0	49.3	20.0	30.7	37.3	33.3
11	64.0	49.3	49.3	41.3	49.3	50.7	20.0	30.7	42.7	34.7
12	65.3 ^A	53.3 ^B	56.0 ^B	41.3 ^C	52.0 ^B	53.3 ^B	21.3 ^D	32.0 ^E	45.3 ^C	36.0 ^E
13	65.3	54.7	57.3	46.7	54.7	56.0	24.0	32.0	48.0	38.7
14	68.0	61.3	62.7	50.7	56.0	58.7	24.0	33.3	53.3	40.0
15	69.3	62.7	62.7	50.7	58.7	62.7	24.0	36.0	60.0	42.7
16	73.3	62.7	64.0	50.7	62.7	64.0	24.0	37.3	61.3	44.0
17	73.3	64.0	66.7	50.7	66.7	65.3	25.3	37.3	62.7	44.0
18	73.3	68.0	68.0	50.7	68.0	66.7	25.3	37.3	66.7	46.7
19	73.3	70.7	69.3	50.7	70.7	68.0	25.3	37.3	68.0	46.7
20	73.3	70.7	70.7	50.7	70.7	68.0	25.3	37.3	69.3	48.0
21	77.3	72.0	70.7	50.7	70.7	68.0	25.3	37.3	69.3	48.0
22	80.0	72.0	70.7	50.7	70.7	68.0	25.3	37.3	69.3	48.0
23	80.0 ^A	73.3 ^B	70.7 ^B	50.7 ^C	70.7 ^B	68.0 ^B	25.3 ^D	37.3 ^E	69.3 ^B	48.0 ^C

A: Agua; **AR:** Agua residual; **ARF:** Agua residual fotolizada 3h; **GC:** glifosato (3.6 g/L); **G:** glifosato (36 mg/L); **GF:** glifosato (36 mg/L) fotolizado 3h; **D:** diquat (10 mg/L); **DF:** diquat (10 mg/L) fotolizado 3h; **DFC:** diquat (10 mg/L) fotocatalizado 3h; **DAD:** diquat (10 mg/L) adsorbido sobre fotocatalizador tras 3h. Las letras situadas como superíndices indican una diferencia estadísticamente significativa si son distintas entre sí, mientras que la misma letra agrupa los valores que no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Con el objetivo de comprobar si los porcentajes de germinación de los diferentes tratamientos utilizados presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, se realiza una prueba ANOVA unidireccional. En las tablas de los porcentajes de germinación (Tabla 1 y Tabla 2) se establecen los distintos grupos con letras en los superíndices de los valores de un día concreto en función de si ofrecen diferencias estadísticamente significativas o no.

Tabla 2. Test ANOVA realizado con los datos del porcentaje de germinación de *B. rapa* 12 días tras la siembra

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	212.8	9	23.64	15.76	8.69E-05	3.02
Within Groups	15	10	1.5			
Total	227.8	19				

Tabla 3. Test ANOVA realizado con los datos del porcentaje de germinación de *B. rapa* 23 días tras la siembra

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	543.5	9	60.39	45.29	2.35E-11	2.39
Within Groups	26.67	20	1.33			
Total	570.17	29				

Pasados 12 días (Tabla 1) tras la siembra se observa que las semillas control son las que presentan un mayor porcentaje de germinación, seguidas de aquellas con aguas residuales y glifosato (36 mg/L). Aquellas regadas con diquat (10 mg/L) tienen un bajo porcentaje de germinación, excepto al emplear la disolución fotocatalizada, que ya no presenta prácticamente nada de diquat. Tras 23 días germinaron todas las semillas, manteniéndose una relación similar de porcentajes germinados que hace 11 días. Cabe destacar que el diquat fotocatalizado fue el que más aumentó su porcentaje de germinación, aproximándose a aquellos de las aguas residuales y glifosato.

Según los datos se observa que el diquat es el contaminante que más afecta a la germinación de *B. rapa*, mientras que el glifosato casi no le afecta a bajas concentraciones del mismo. A mayores concentraciones de estos contaminantes, se ha visto que no han germinado las semillas en presencia de diquat (1 g/L), mientras que la mitad sí han germinado en presencia de glifosato (3.6 g/L). Las disoluciones fotolizadas no afectan en gran medida respecto a aquellas no fotolizadas, excepto en el caso del diquat, pues se redujo 1/3 de la cantidad de este con la fotólisis.

4.1.2. *Lolium perenne* L.

En la figura 4 se pueden observar los ensayos de germinación llevados a cabo con semillas de *L. perenne* y regados con agua. En la fotografía B se observa cómo todas las semillas están germinadas dos semanas tras la siembra. Por otra parte, al contrario que *B. rapa*, en ninguna placa sembrada con *L. perenne* se observó crecimiento fúngico.

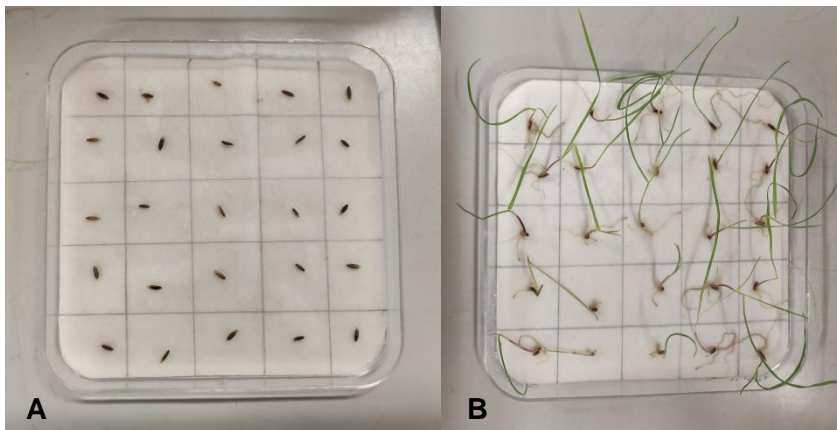


Figura 4.-Placa sembrada con *L. perenne* y regada con agua: día de la siembra (A) y 14 días a partir de la misma (B).

Los datos del porcentaje de germinación se extienden hasta el día 12 tras la siembra (Tabla 2), cuando germinó la última semilla, de forma que *L. perenne* ha germinado casi el doble de rápido que *B. rapa*. También fueron preparadas réplicas regadas con glifosato (3.6 g/L) y diquat (1 g/L), de las cuales no germinó ninguna semilla.

Tabla 4. Efecto de la presencia de aguas residuales y aguas tratadas en la germinación de semillas de *Lolium perenne*

Porcentaje de germinación en función del día a partir de la siembra									
Días	A	AR	ARF	G	GF	D	DF	DFC	DAD
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0
2	14.7	14.7	16.0	1.3	4.0	0.0	0.0	22.7	1.3
3	36.0	33.3	29.3	14.7	16.0	2.7	1.3	56.0	8.0
4	57.3	57.3	50.7	29.3	29.3	9.3	9.3	82.7	16.0
5	76.0	82.7	77.3	56.0	57.3	13.3	16.0	82.7	24.0
6	90.7 ^A	94.7 ^B	94.7 ^B	86.7 ^C	80.0 ^D	20.0 ^E	25.3 ^E	84.0 ^C	34.7 ^F
7	92.0	94.7	94.7	88.0	85.3	26.7	32.0	86.7	41.3
8	93.3	96.0	96.0	89.3	88.0	33.3	33.3	89.3	44.0
9	94.7	97.3	96.0	92.0	90.7	36.0	37.3	93.3	45.3
10	97.3	97.3	96.0	92.0	92.0	40.0	40.0	93.3	48.0
11	97.3	97.3	96.0	92.0	92.0	40.0	44.0	93.3	50.7
12	97.3 ^A	97.3 ^A	96.0 ^A	92.0 ^B	92.0 ^B	40.0 ^C	44.0 ^C	93.3 ^B	53.3 ^D

A: Agua; **AR:** Agua residual; **ARF:** Agua residual fotolizada 3h; **G:** glifosato (36 mg/L); **GF:** glifosato (36 mg/L) fotolizado 3h; **D:** diquat (10 mg/L); **DF:** diquat (10 mg/L) fotolizado 3h; **DFC:** diquat (10 mg/L) fotocatalizado 3h; **DAD:** diquat (10 mg/L) adsorbido sobre fotocatalizador tras 3h. Las letras situadas como superíndices indican una diferencia estadísticamente significativa si son distintas entre sí, mientras que la misma letra agrupa los valores que no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tal y como se explicó anteriormente, se realizó una prueba ANOVA unidireccional con el objetivo de determinar diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos en un día concreto.

Tabla 5. Test ANOVA realizado con los datos del porcentaje de germinación de *L. perenne* 6 días tras la siembra

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1484.96	8	185.62	151.8712	6.37E-15	2.51
Within Groups	22	18	1.22			
Total	1506.96	26				

Tabla 6. Test ANOVA realizado con los datos del porcentaje de germinación de *L. perenne* 12 días tras la siembra

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	919.85	8	114.98	100.14	2.5E-13	2.51
Within Groups	20.67	18	1.148			
Total	940.519	26				

Pasados 6 días (Tabla 2) se observa que las únicas semillas que tienen problemas en la germinación son aquellas en presencia de diquat, exceptuando el riego con glifosato (1 g/L), en el cual no germinó ninguna semilla.

Pasados 12 días, cuando germina la última semilla, se observa que las semillas regadas con aguas residuales y el control presentan porcentajes de germinación muy elevados, seguidos de cerca por aquellas con glifosato (36 mg/L) y el diquat fotocatalizado.

Aunque el glifosato (3.6 g/L) impide la germinación de *L. perenne*, no afecta tanto a *B. rapa*, mientras que diquat (1 g/L) impide la germinación de ambas especies.

4.2. Ensayos en planta

4.2.1. Medida de la capacidad fotosintética

Según el patrón de las curvas de fotosíntesis-irradianza en función de ETR, las plantas regadas con los contaminantes emergentes presentan bloqueos en el transporte de electrones. Tanto en el caso de *B. rapa* como *L. perenne*, las plantas regadas con diquat (1 g/L) y glifosato (3.6 g/L) presentaban hojas en proceso de secado, de forma que no se pudieron obtener valores de las curvas de fotosíntesis con los pulsos de saturación aplicados en el fluorómetro.

4.2.1.1. *Brassica rapa* L.

En el caso de *B. rapa* (Figura 5) se observa que el tratamiento con agua residual presenta una tasa transporte de electrones superior al control, mientras que el riego del agua residual fotolizada no varía en gran medida respecto al control. Como era esperable, el diquat fotocatalizado también

presenta una tasa similar al control, pues el diquat de la disolución se eliminó por completo durante el proceso de fotocátalisis.

Las plántulas regadas con glifosato presentan valores de ETR más bajos en general, aunque aún son superiores a aquellas tratadas con diquat. Como el diquat adsorbido sobre fotocatalizador sólo presenta un tercio del diquat de la disolución de diquat (10 mg/L) no tratada, este no afecta en gran medida a la tasa de transporte electrónica.

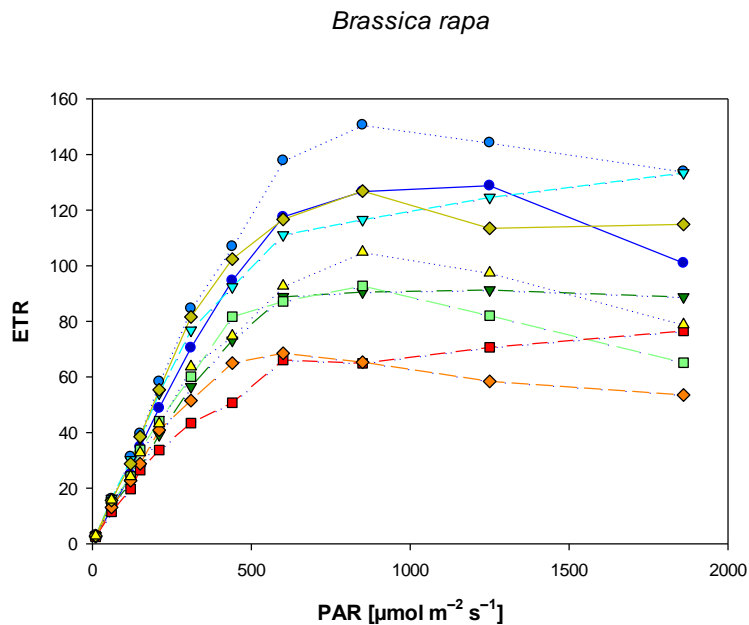


Figura 5.-Valores de ETR obtenidos tras los ensayos de fluorescencia realizados a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de hojas de *B. rapa*. Ver leyenda en la figura 6

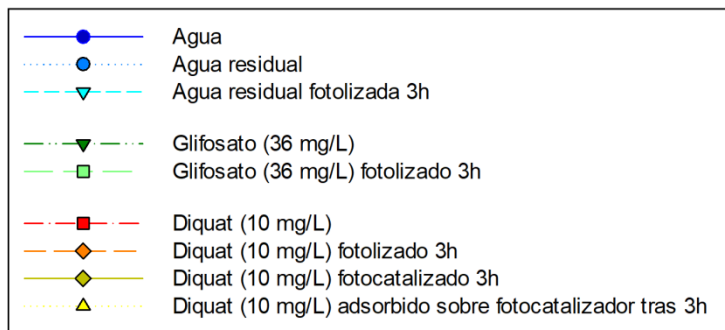


Figura 6.-Leyenda de los tratamientos utilizados en las medidas de la capacidad fotosintética

En el caso de las medidas del rendimiento cuántico del fotosistema II en *B. rapa* (Figura 7), las similitudes y diferencias entre los distintos tratamientos son similares a las medidas anteriores de ETR; las aguas residuales y el diquat fotocatalizado son similares al control, mientras que los tratamientos con diquat presentan los valores más bajos del rendimiento cuántico PSII y las plantas regadas con glifosato se sitúan bajo el control y sobre los tratamientos con diquat.

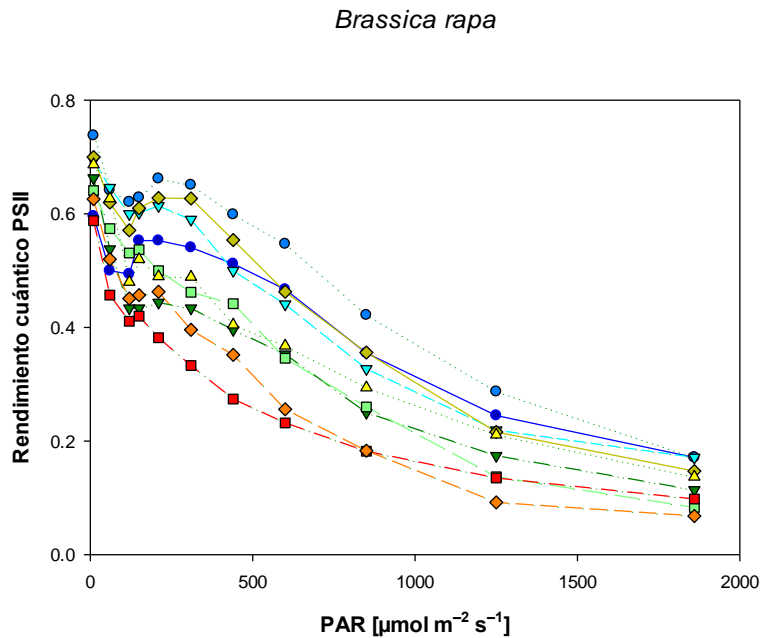


Figura 7.-Valores de Φ_{PSII} obtenidos tras los ensayos de fluorescencia realizados a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de hojas de *B. rapa*. Ver leyenda en la figura 6

4.2.1.2. *Lolium perenne* L.

En cuanto a *L. perenne* (Figura 8), la tasa de transporte de electrones de las hierbas regadas con aguas residuales se aproxima más al control, al igual que las tratadas con diquat fotocatalizado.

En este caso el diquat (10 mg/L) también es el que más bloquea la tasa de transporte electrónica, seguido por el glifosato (36 mg/L). Los tratamientos con el diquat y glifosato fotocatalizados no afectan en gran medida en este caso, comparado con *B. rapa*.

Lolium perenne

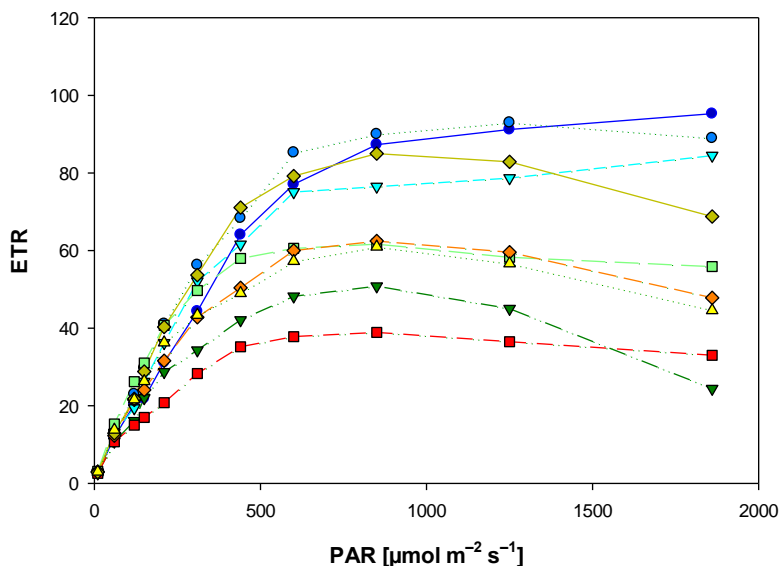


Figura 8.-Valores de ETR obtenidos tras los ensayos de fluorescencia realizados a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de hojas de *L. perenne*. Ver leyenda en la figura 6

Por otra parte, las medidas del rendimiento cuántico del fotosistema II de *L. perenne* (Figura 9) presentan una relación entre los distintos tratamientos similar a las medidas de ETR vistas anteriormente.

De esta forma, como es esperable, el riego con aguas residuales y el diquat fotocatalizado presenta valores de rendimiento cuántico PSII que se aproximan a los del control, además del glifosato fotocatalizado y del diquat adsorbido en fotocatalizador. Las disoluciones de riego que más afectan a esta medida son el diquat y el glifosato no tratados, pues reducen los valores de la curva del rendimiento cuántico PSII en mayor medida, especialmente el diquat.

Lolium perenne

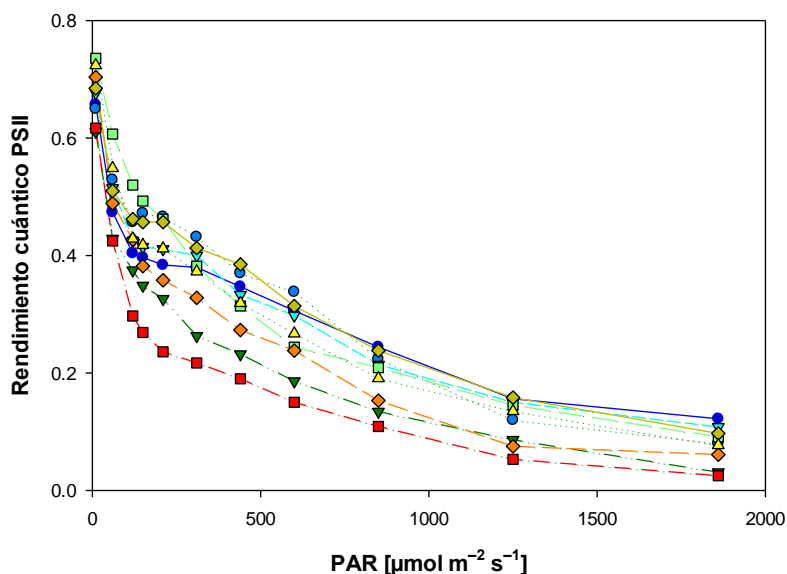


Figura 9.-Valores de Φ_{PSII} obtenidos tras los ensayos de fluorescencia realizados a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de hojas de *L. perenne*. Ver leyenda en la figura 6

4.2.2. Medida de fenoles solubles totales

Tras la extracción de fenoles de las hojas de plantas adultas regadas 7 días con cada tratamiento, y la realización del método Folin-Ciocalteu para medir las absorbancias de las disoluciones a 760 nm, se cuantificó la concentración de fenoles solubles totales extrapolando de una recta patrón realizada con ácido ferúlico.

4.2.2.1. *Brassica rapa* L.

En el caso de *B. rapa* (Figura 10), como era esperable, las plantas regadas con aguas residuales presentan una concentración similar de fenoles solubles totales al control; la concentración en el caso del diquat fotocatalizado es ligeramente menor, aunque superior al resto de tratamientos con diquat.

Tal y como se vio en los otros ensayos, el diquat (1 g/L) es el que más afecta a esta especie, presentando la menor concentración de fenoles solubles con diferencia; el glifosato (3.6 g/L) también afecta a la producción de fenoles por parte de la planta, aunque en menor medida que el diquat. Las disoluciones de glifosato (36 mg/L) afectan levemente a la producción de fenoles.

Concentración de fenoles solubles totales en hojas tratadas de *Brassica rapa*

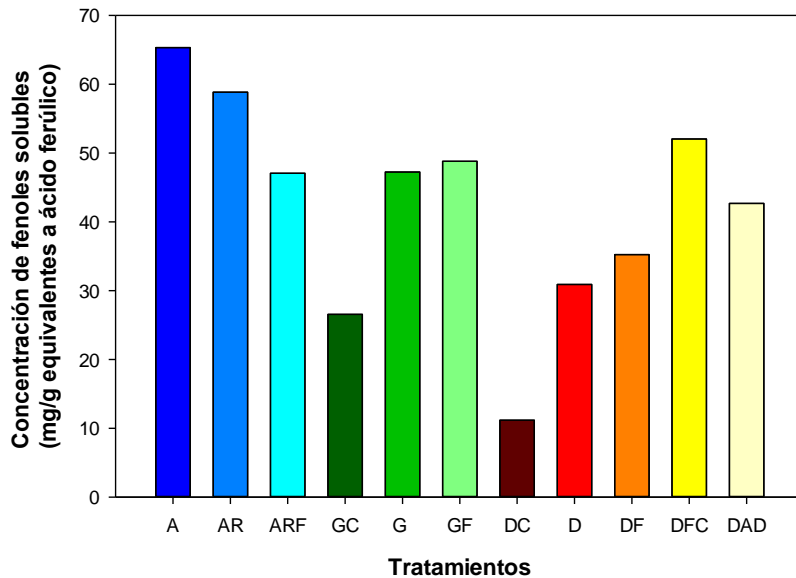


Figura 10.-Comparación de la concentración de fenoles solubles totales (mg/g equivalentes a ácido ferúlico) presente en las hojas de *B. rapa* de los distintos tratamientos. Ver leyenda en la figura 11

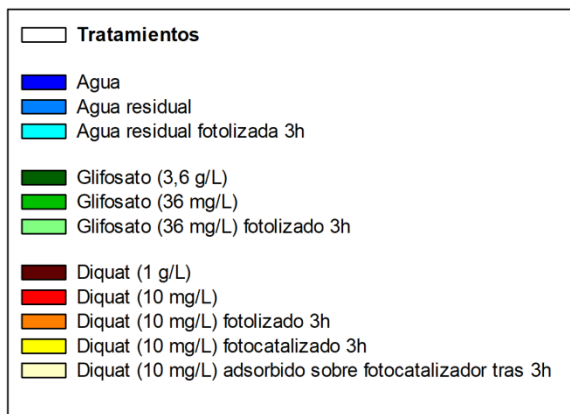


Figura 11.-Leyenda de los tratamientos utilizados en las medidas de fenoles solubles totales

4.2.2.2. *Lolium perenne* L.

La concentración de fenoles solubles en el caso de *L. perenne* (Figura 12) es bastante similar a *B. rapa* en proporción, aunque presenta una menor concentración en general; en este caso las disoluciones de glifosato (3.6 g/L) y

diquat (1 g/L) afectan en menor medida a la producción de fenoles, así como el resto de las disoluciones de diquat (10 mg/L).

La concentración de fenoles solubles totales en las plantas tratadas con el diquat fotocatalizado se aproxima más a la del control y aguas residuales.

Concentración de fenoles solubles totales en hojas tratadas de *Lolium perenne*

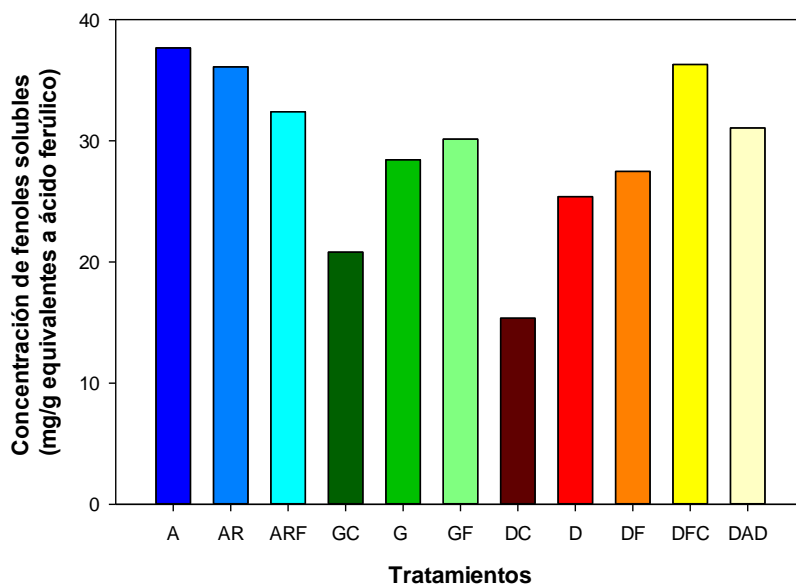


Figura 12.-Comparación de la concentración de fenoles solubles totales (mg/g equivalentes a ácido ferúlico) presente en las hojas de *L. perenne* de los distintos tratamientos. Ver leyenda en la figura 11

5. Discusión

Puesto que las plántulas recién germinadas requieren primero de sus reservas de almidón y pronto necesitan una fuente de energía fotosintética, herbicidas como el diquat, que actúa inhibiendo la fotosíntesis, afectan en gran medida a la germinación y posterior crecimiento de las plántulas (L. Kelly et al., 2012).

La aplicación de glifosato a plantas de *Avena fatua* redució la producción de semillas de forma notable, inhibiendo su producción al aplicar 1.76 kg de glifosato por hectárea; aplicando esa misma concentración en semillas de esta planta, se inhibió de forma significativa su germinación (Shuma et al., 1995).

Por otra parte, el efecto estimulante en la germinación por parte de glifosato en bajas concentraciones (0-30 mg/L) fue estudiado en plantas de tomate, demostrando un aumento en el estímulo de crecimiento del hipocótilo y de la radícula (Sajida et al., 2020).

En los ensayos de germinación se observó que el riego con diquat (1 g/L) no permite la germinación de ninguna semilla, pero con el tratamiento de glifosato (3.6 g/L) la mitad de las semillas de *Brassica rapa* germinó, mientras que no hubo ninguna semilla germinada de *Lolium perenne*. Con estos resultados se puede deducir que las plántulas de *B. rapa* presentan cierta resistencia al glifosato, mientras que ambas especies son sensibles a la presencia de diquat. Esto también se corrobora con el porcentaje de germinación de ambas especies regadas con disoluciones de glifosato y diquat diluidas 1/100, de forma que las semillas tratadas con glifosato germinan de forma similar al control, pero aquellas en presencia de diquat tienen valores mucho más bajos de germinación.

El riego de las disoluciones fotolizadas no presenta gran variación respecto a aquellas no tratadas, pero el uso de la disolución de diquat fotocalizado es muy efectivo, presentando un porcentaje de semillas germinadas similar al control. Estos resultados se deben a que la fotólisis no es un método muy eficaz en la eliminación de contaminantes, mientras que la fotocatalisis sí lo es; esta última requiere de la preparación de un fotocatalizador determinado para el contaminante que deseamos eliminar en cada caso.

En el tratamiento de brotes de *Lagarosiphon major* con diquat, al día 12 de su aplicación los brotes se volvieron necróticos, sin posibilidad de recuperación (L. Kelly et al., 2012).

Las plantas adultas de *B. rapa* y *L. perenne* regadas con diquat (1 g/L) y glifosato (3.6 g/L) sufrieron procesos de necrosis en hojas y tallo tras una semana de riego, lo que imposibilitó su medida en el fluorómetro.

La aplicación de diquat a bulbos de *Allium cepa* causa un descenso de los pigmentos de clorofila a y b en las hojas, así como un descenso en todos los parámetros fisiológicos; el uso de este herbicida debería ser abandonado (Acar, 2021).

El tratamiento de glifosato en *Imperata cylindrical* resulta en un descenso del contenido de clorofila a y b, del rendimiento cuántico PSII y de la tasa de transporte electrónica (Huang et al., 2012).

En las medidas de la capacidad fotosintética de *B. rapa* se observó un gran descenso de los valores de ETR y Φ_{PSII} plantas regadas por glifosato y una bajada aún mayor en el caso del diquat. Las disoluciones fotolizadas no afectaron a las plantas en gran medida respecto a aquellas disoluciones sin tratar en cada caso.

En el caso de *L. perenne*, los tratamientos con diquat y glifosato presentan los valores más bajos de ETR y Φ_{PSII} , pero en esta especie las disoluciones fotolizadas de los contaminantes presentan mayores valores que las disoluciones sin tratar.

Lagos con gran cantidad de *Hydrilla verticillata* se trataron con diquat durante 5 meses, tomando muestras distintos tiempos del tratamiento para la cuantificación de varios ácidos fenólicos, algunos de los cuales no cambiaron en gran medida, pero otros como el ácido cafeico presentaban grandes fluctuaciones. (Woodward et al., 1974).

La concentración de fenoles solubles totales en *B. rapa* y *L. perenne* se ve afectada en mayor medida por el riego con disoluciones de diquat, exceptuando el diquat fotocatalizado, pues esta disolución prácticamente ya no presenta diquat. Los contaminantes más concentrados afectan en mayor medida a la producción de fenoles, especialmente el diquat. Las disoluciones fotolizadas no presentan mucha variación respecto a aquellas no tratadas.

6. Conclusiones

El riego con aguas residuales no afecta a la germinación de semillas de *B. rapa* y *L. perenne*, ni a la producción de fenoles solubles en sus hojas, pero sí se observó en *B. rapa* una tasa de transporte de electrones y rendimiento cuántico del fotosistema II superiores al control, lo que puede deberse a nutrientes que contenga el agua residual.

El diquat es un herbicida que afecta en gran medida a la germinación, capacidad de fotosíntesis y producción de fenoles en ambas especies, mientras que el glifosato afectó en menor medida.

Las disoluciones fotolizadas en general no presentan gran variación respecto a aquellas no tratadas; el diquat fotocatalizado es el tratamiento que produce resultados más similares al control.

Conclusions

Irrigation with residual waters neither affects the germination of *B. rapa* and *L. perenne* seeds, nor the production of soluble phenolic acids in the leaves, but in *B. rapa* it was observed superior electron transfer rate and PSII quantum yield than that of the control. That may be because of nutrients present in residual waters.

Diquat is an herbicide that greatly affects germination, photosynthetic capacity and phenolic acid production in both species, while glyphosate has a lesser effect.

In general, the photolyzed solutions did not present great variation compared to those untreated. Photocatalyzed diquat is the treatment with most similar results to the control solution.

7. Bibliografía

1. El proceso de tratamiento de aguas residuales y eliminación de contaminantes emergentes (2020). Visitada el 24/06/2021 la página web: <https://www.iagua.es/blogs/lander-rodriguez-jorge/proceso-tratamiento-aguas-residuales-y-eliminacion-contaminantes>
2. Descripción del proceso del tratamiento de aguas residuales en las plantas de tratamiento I y II. Visitado el 24/06/2021 el pdf: <https://cmasxalapa.gob.mx/gom/wp-content/uploads/2018/11/DESCRIPCION%20DEL%20TRATAMIENTO-DE-AGUAS-RESIDUALES..pdf>
3. AQUASTAT - Sistema mundial de información de la FAO sobre el agua en la agricultura. Visitada el 24/06/2021 la página web: <http://www.fao.org/aquastat/es/overview/methodology/water-use>

4. Basic information about water reuse (2020). Visitada el 24/06/2021 la página web: <https://www.epa.gov/waterreuse/basic-information-about-water-reuse>
5. Using recycled water for irrigation (2020). Visitado el 24/06/2021 el pdf: <http://www.insidecotton.com/jspui/bitstream/1/2093/2/pn30123.pdf>
6. Rahman M.M., Hagare D., Maheshwari B. (2016) Use of Recycled Water for Irrigation of Open Spaces: Benefits and Risks. In: Maheshwari B., Thoradeniya B., Singh V.P. (eds) *Balanced Urban Development: Options and Strategies for Liveable Cities*. Water Science and Technology Library, vol 72. Springer, Cham.
7. L. Kelly C., E. Hofstra D., De Winton M., P. Hamilton D. (2012). Carophyte germination responses to herbicide application. *J. Aquat. Plant Manage.* 50: 150-154
8. Acar, A. In vivo toxicological assessment of diquat dibromide: cytotoxic, genotoxic, and biochemical approach. *Environ Sci Pollut Res* (2021).
9. Sajida Khan, John L. Zhou, Lei Ren, Amin Mojiri (2020). Effects of glyphosate on germination, photosynthesis and chloroplast morphology in tomato. *Chemosphere*,m Volume 258.
10. Shuma J. M., Quick W. A., Raju M.V.S., Hsiao A. I. (1995). Germination of seeds from plants of *Avena fatua* L. treated with glyphosate. *Weed Res.* 35, 249-255.
11. Huang J Silva, EN Shen, Z Jiang, B Lu H. (2012). Effects of glyphosate on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and physicochemical properties of cogongrass (*Imperata cylindrical* L.). *Plant Omics Journal* 5, 177–183.
12. Woodward R. E., Silver W. S., Mansell R. L. (1974). Herbicide-related changes in phenolic acid content of fieldgrown Hydrilla. *Hyacinth control J.* 12, 35.