

# **ESTUDIO DEL EFECTO DEL USO DE DOS TIPOS DE AGUA DE RIEGO EN UN CULTIVO DE *Lactuca sativa* L.**

Trabajo final de grado

Ingeniería Agroambiental i del Paisaje

Autora: Rocío Pérez Carrascal

Tutora: Dra. Nuria Cañameras Riba

Septiembre 2021

## Resum

És probable que el consum d'aigua dolça es torni insostenible, sobretot per al sector agrícola que representa a nivell mundial el sector amb més demanda i consum d'aigua (70% de les extraccions). En conseqüència, una reutilització eficaç de l'aigua residual regenerada esdevé un repte imprescindible. La presència de xenobiòtics i patògens en la reutilització de les aigües regenerades per a reg fa que aquests puguin afectar al medi ambient. Per disminuir l'acumulació d'aquests contaminants en el sòl, en el cultiu, i en les aigües subterrànies, es poden emprar diferents tecnologies per la seva presència en les aigües de reg, entre d'elles l'osmosi directa.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat avaluar els efectes de la utilització de diferents tipus d'aigües en el creixement i desenvolupament, contingut de clorofil·les, nitrats, carbohidrats, lípids i proteïnes en un cultiu d'enciam varietat meravella.

L'assaig s'ha realitzat en una parcel·la d'Agropòlis (Parc-UPC, Viladecans). S'han utilitzat dos tipus d'aigua de reg. Una procedent del dipòsit que recull aigua de pou de la finca (majoritàriament aigua de pluja) i l'altre de la corredora C-33 (aigua de canal). L'aigua del canal és una barreja de diferents tipus d'aigua (regenerada, escolament, drenatge i pluja). Durant el temps de cultiu es va avaluar l'evolució del nombre de fulles i la longitud de la fulla més llarga. Després de la collita es va quantificar la biomassa, i el contingut clorofil·lic i de nitrats. En els laboratoris de centre d'investigació IDAEA-CISC, es va determinar el contingut de carbohidrats, lípids i proteïnes.

No s'han observat diferències significatives en el desenvolupament i creixement de les plantes regades amb els dos tipus d'aigua; tampoc es van apreciar diferències en la síntesi de clorofil·les. En el cas del contingut de nitrats i proteïnes si que es van observar diferències significatives segons el tractament aplicat, sent les plantes regades amb aigua de pou les que van acumular una major concentració. En el cas del contingut de carbohidrats i lípids no es van presentar diferències significatives segons el tractament aplicat.

## Resumen

Es probable que el consumo de agua dulce se vuelva insostenible, sobre todo para el sector agrícola que representa a nivel mundial el sector con más demanda y consumo de agua (70% de las extracciones). En consecuencia, una reutilización eficaz del agua residual regenerada se convierte en un reto imprescindible. La presencia de xenobióticos y patógenos en la reutilización de las aguas regeneradas para riego hace que éstos puedan afectar al medio ambiente. Para disminuir la acumulación de estos contaminantes en el suelo, en el cultivo, y en las aguas subterráneas, se pueden emplear diferentes tecnologías para reducir su presencia en las aguas de riego, entre ellas la ósmosis directa.

El objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar los efectos de la utilización de diferentes tipos de aguas en el crecimiento y desarrollo, contenido de clorofilas, nitratos, carbohidratos, lípidos y proteínas en un cultivo de lechuga variedad maravilla.

El ensayo se realizó en una parcela de Agròpolis (Parque-UPC, Viladecans). Se han utilizado dos tipos de agua de riego. Una procedente del depósito que recoge agua de pozo de la finca (mayoritariamente agua de lluvia) y el otro de la corredera C-33 (agua de canal). El agua del canal es una mezcla de diferentes tipos de agua (regenerada, esorrentía, drenaje y lluvia). Durante el tiempo de cultivo se evaluó la evolución del número de hojas y la longitud de la hoja más larga. Después de la cosecha se cuantificó la biomasa, y el contenido clorofílico y de nitratos. En los laboratorios de centro de investigación IDAEA-CISC, se determinó el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas.

No se han observado diferencias significativas en el desarrollo y crecimiento de las plantas regadas con los dos tipos de agua; tampoco se apreciaron diferencias en la síntesis de clorofilas. En el caso del contenido de nitratos y proteínas, si se observaron diferencias significativas según el tratamiento aplicado, siendo las plantas regadas con agua de pozo las que acumularon una mayor concentración. En el caso del contenido de carbohidratos y lípidos no se presentaron diferencias significativas según el tratamiento aplicado.

## Abstract

The consumption of fresh water is likely to become unsustainable, especially for the agricultural sector, which represents the sector with the highest demand and consumption of water worldwide (70% of withdrawals). Consequently, efficient reuse of reclaimed wastewater becomes an essential challenge. The presence of xenobiotics and pathogens in the reuse of reclaimed water for irrigation means that these can affect the environment. To reduce the accumulation of these pollutants in the soil, in the crop, and in groundwater, different technologies can be used to reduce their presence in irrigation water, including direct osmosis.)

The main objective of this work has been to evaluate the effects of the use of different types of water on growth and development, content of chlorophylls, nitrates, carbohydrates, lipids and proteins in a cultivation of marigold lettuce.

The essay was carried out on a plot in Agròpolis (Parque-UPC, Viladecans). Two types of irrigation water have been used. One from the reservoir that collects well water from the farm (mostly rainwater) and the other from the C-33 slide (channel water). Canal water is a mixture of different types of water (reclaimed, runoff, drainage, and rain). During the cultivation time, the evolution of the number of leaves and the length of the longest leaf were evaluated. After harvest the biomass, and the chlorophyll and nitrate content were quantified. In the laboratories of the IDAEA-CISC research center, the content of carbohydrates, lipids and proteins was determined.

No significant differences have been observed in the development and growth of the plants watered with the two types of water; There were no differences in the synthesis of chlorophylls either. In the case of the content of nitrates and proteins, significant differences were observed according to the applied treatment, being the plants irrigated with well water those that accumulated a higher concentration. In the case of carbohydrate and lipid content, there were no significant differences according to the treatment applied.

## Sumario

|  |           |
|--|-----------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>                                       | <b>13</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                       | <b>15</b> |
| 1.1. Interés de la utilización de agua regenerada.....       | 15        |
| 1.2. Marco legislativo .....                                 | 16        |
| 1.3. Contaminantes emergentes.....                           | 18        |
| 1.4. Agua regenerada destinada al riego .....                | 19        |
| 1.5. Ósmosis directa aplicada a la regeneración de agua..... | 21        |
| 1.6. Antecedentes y motivaciones del trabajo. ....           | 22        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | <b>26</b> |
| 2.1. Objetivo general .....                                  | 26        |
| 2.2. Objetivos específicos .....                             | 26        |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>                                 | <b>28</b> |
| 3.1. Localización del experimento.....                       | 28        |
| 3.1.1. Parcela experimental del cultivo.....                 | 29        |
| 3.1.2. Laboratorios .....                                    | 29        |
| 3.2. Material vegetal .....                                  | 29        |
| 3.3. Características del suelo.....                          | 30        |
| 3.4. Fertilizantes .....                                     | 32        |
| 3.5. Tratamientos y diseño del experimento.....              | 32        |
| 3.5.1. Tratamientos .....                                    | 32        |
| 3.5.2. Dosificación de fertilizante mineral .....            | 33        |
| 3.5.3. Sistema de riego.....                                 | 33        |
| 3.5.4. Distribución de los tratamientos y repeticiones.....  | 36        |
| 3.6. Gestión del experimento.....                            | 37        |
| 3.7. Evaluación del desarrollo del cultivo .....             | 40        |
| 3.7.1. Número de hojas.....                                  | 40        |
| 3.7.2. Longitudes .....                                      | 40        |
| 3.8. Biomasa .....   | 41        |
| 3.8.1. Peso fresco .....                                     | 41        |
| 3.8.2. Peso seco .....                                       | 41        |
| 3.8.3. Contenido de agua .....                               | 42        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.9.      | Determinación de clorofilas.....   | 43        |
| 3.10.     | Determinación de nitratos.....   | 44        |
| 3.11.     | Determinación de carbohidratos y lípidos.....  | 46        |
| 3.11.1.   | Preparación de las muestras.....   | 46        |
| 3.11.2.   | Extracción de carbohidratos y lípidos.....   | 47        |
| 3.11.3.   | Cuantificación del contenido de carbohidratos y lípidos.....                                   | 48        |
| 3.12.     | Contenido de proteínas.....  | 48        |
| 3.12.1.   | Preparación de homogeneización y fraccionamiento de tejidos.....                               | 49        |
| 3.12.2.   | Ensayo de cuantificación Bradford de proteína.....   | 52        |
| 3.12.3.   | Cuantificación de proteínas.....   | 56        |
| 3.13.     | Tratamiento estadístico.....   | 56        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>59</b> |
| 4.1.      | Número total de hojas y longitud de hoja más larga.....  | 59        |
| 4.2.      | Biomasa.....   | 61        |
| 4.2.1.    | Peso fresco.....   | 62        |
| 4.2.2.    | Peso seco.....   | 62        |
| 4.2.3.    | Contenido hídrico.....   | 62        |
| 4.3.      | Contenido clorofílico.....   | 64        |
| 4.3.1.    | Determinación del contenido total en clorofilas según el tratamiento.....                      | 64        |
| 4.3.2.    | Determinación del contenido en clorofilas según la posición de la hoja.....                    | 65        |
| 4.3.3.    | Determinación del contenido en clorofilas según la posición de la hoja entre tratamientos..... | 68        |
| 4.4.      | Contenido nitratos.....  | 71        |
| 4.5.      | Contenido de carbohidratos y lípidos.....  | 72        |
| 4.6.      | Contenido de proteínas.....  | 73        |
| <b>5.</b> | <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>77</b> |
| 5.1.      | Biomasa.....   | 77        |
| 5.2.      | Contenido de clorofilas.....   | 78        |
| 5.3.      | Contenido nitratos.....  | 78        |
| 5.4.      | Contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas.....   | 79        |
|           | <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>82</b> |
|           | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>84</b> |

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| Referencias bibliográficas .....  | 84         |
| Bibliografía complementaria ..... | 100        |
| <b>ANEXOS</b> .....               | <b>102</b> |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-1.</b> Planta de osmosis directa, situada en la parcela. Fuente: IDAEA- CSIC. _____   | 24 |
| <b>Figura 3-1</b> Parcela experimental del cultivo. Fuente: Elaboración propia _____  | 28 |
| <b>Figura 3-2.</b> Plantel <i>Lactuca sativa</i> L. var. Maravilla. _____   | 29 |
| <b>Figura 3-3.</b> Distribución de los tratamientos en cada subparcela experimental de cultivo. Fuente: Elaboración propia. _____                       | 36 |
| <b>Figura 3-4.</b> Distribución de las plantas de lechuga en cada subparcela. Fuente: Elaboración propia. _____   | 37 |
| <b>Figura 3-5.</b> Localización de las plantas seleccionadas para evaluar la evolución del cultivo (rectángulo rojo). Fuente: Elaboración propia. _____ | 40 |
| <b>Figura 3-6.</b> Biomasa al final del cultivo _____   | 41 |
| <b>Figura 3-7.</b> Determinación del peso seco con la balanza Sartorius BP 310 S de 0,001 g de resolución. _____  | 42 |
| <b>Figura 3-8.</b> Determinación de clorofila de la hoja exterior mediante el OPTI-SCIENCES CCM -200 plus. _____  | 43 |
| <b>Figura 3-9.</b> Medidor de nitratos LAQUAtwin-NO3-11. _____  | 45 |
| <b>Figura 3-10.</b> Extracción de la savia para medición nitratos. _____  | 45 |
| <b>Figura 3-11.</b> Muestras más réplicas para contenido carbohidratos y lípidos. _____   | 46 |
| <b>Figura 3-12.</b> Sistema, mediante nitrógeno y placa de calor, empleado en la evaporación de los filtros y tubos. _____                              | 48 |
| <b>Figura 3-13.</b> Preparación del Phosphate buffer y ajuste de pH. _____  | 49 |
| <b>Figura 3-14.</b> Preparación muestras con N2 líquido para homogeneizar. _____  | 50 |



---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 3-15.</b> Homogenización muestras con Polytron VDI 12. _____  | 51 |
| <b>Figura 3-16.</b> Muestras homogenizadas para centrifugar y Centrifuge 5424. _____  | 52 |
| <b>Figura 3-17.</b> Albúmina de suero bovino (BSA) Sigma - A4503 y Bradford Sigma - B6916 _____   | 53 |
| <b>Figura 3-18.</b> Microplacas con reactivo Bradford de pozo (A) y de canal (B), para lectura de absorbancia a 595nm. _____  | 55 |
| <b>Figura 4-1.</b> Evolución del número total de hojas (A) y longitud de hoja más larga (B), en el cultivo de lechuga, según el tratamiento aplicado (pozo y canal). _____  | 60 |
| <b>Figura 4-2.</b> Diagrama de valores individuales del número total de hojas (A) y longitud de hoja más larga (B), en el cultivo de lechuga, según el tratamiento aplicado (pozo y canal). _____   | 61 |
| <b>Figura 4-3.</b> Diagrama de caja de peso fresco (A), peso seco(B) y del contenido hídrico (C) en lechuga, según tratamiento el tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal.) _____                                 | 64 |
| <b>Figura 4-4.</b> Diagrama de caja del contenido de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y total en lechuga, según el tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal). _____   | 65 |
| <b>Figura 4-5.</b> Diagrama de caja del contenido de clorofila <i>a</i> (A), clorofila <i>b</i> (B) y clorofila total (C), según posición de hoja de lechuga y el tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal). _____ | 68 |
| <b>Figura 4-6.</b> Diagrama de caja del contenido de clorofila <i>a</i> (A), clorofila <i>b</i> (B) y clorofila total (C), según posición de lechuga entre tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal). _____        | 70 |
| <b>Figura 4-7.</b> Contenido de nitratos en lechuga, según tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal). _____  | 71 |
| <b>Figura 4-8.</b> Diagrama de intervalos del porcentaje de contenido en carbohidratos (A) y lípidos (B) en lechuga, según el tratamiento aplicado, con el nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal). _____                                     | 73 |

**Figura 4-9.** Gráfica de recta resultante de BSA para determinar ecuación de segundo grado \_\_\_\_ 73

**Figura 4-10.** Línea de tendencia obtenida a partir de la recta resultante de BSA. \_\_\_\_\_ 74

**Figura 4-11.** Diagrama de intervalos del contenido de proteínas en lechuga, según tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal). \_\_\_\_\_ 75

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 3.1.</b> Características principales del suelo de las subparcelas de cultivo. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A. _____                    | 31 |
| <b>Tabla 3.2.</b> Dosis de los fertilizantes usados en el experimento. Fuente: Elaboración propia _____  | 33 |
| <b>Tabla 3.3.</b> Analítica del agua depósito-pozo. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A. _____   | 34 |
| <b>Tabla 3.4.</b> Analítica del agua de canal. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A. _____  | 35 |
| <b>Tabla 3.5.</b> Concentración Antibióticos (ng/L). LOD (limit of detection): 0.5 ng/L. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A. _____                  | 35 |
| <b>Tabla 3.6</b> Cronología de las actividades realizadas durante el experimento. Elaboración propia. _____  | 38 |
| <b>Tabla 3.7.</b> Estándares BSA. _____  | 53 |
| <b>Tabla 3.8.</b> Concentraciones de ajuste de proteína para el ensayo Bradford. _____   | 54 |
| <b>Tabla 3.9.</b> Disposición en la microplaca para ensayo Bradford de agua de pozo _____  | 54 |
| <b>Tabla 3.10.</b> Disposición en la microplaca para el ensayo Bradford de agua de canal. _____  | 55 |
| <b>Tabla 4.1.</b> Número total de hojas y longitud de la hoja más larga en cultivo de lechuga, según tratamiento aplicado (pozo y canal) _____       | 59 |
| <b>Tabla 4.2.</b> Biomasa final y contenido hídrico en lechuga, según el tratamiento aplicado (agua de pozo y agua de canal). _____                  | 63 |
| <b>Tabla 4.3.</b> Contenido total de clorofilas en lechugas, según el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal). _____                    | 65 |
| <b>Tabla 4.4.</b> Contenido de clorofila $a$ , según posición de la hoja de la lechuga y tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal). _____ | 66 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 4.5.</b> Contenido de clorofila <i>b</i> , según la posición de la hoja de la lechuga y el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).  | 66 |
| <b>Tabla 4.6.</b> Contenido de clorofila total, según la posición de la lechuga y el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).                 | 67 |
| <b>Tabla 4.7.</b> Contenido de clorofila <i>a</i> según posición de la hoja de lechuga entre los tratamientos aplicados. (agua de pozo y agua de canal)    | 69 |
| <b>Tabla 4.8.</b> Contenido de clorofila <i>b</i> , según posición de la hoja de lechuga entre los tratamientos aplicados. (agua de pozo y agua de canal). | 69 |
| <b>Tabla 4.9.</b> Contenido de clorofila total, según posición de la hoja de lechuga entre los tratamientos aplicado. (agua de pozo y agua de canal).      | 69 |
| <b>Tabla 4.10.</b> Contenido de nitratos en lechugas, según el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).                                       | 71 |
| <b>Tabla 4.11.</b> Contenido de carbohidratos y lípidos en lechuga, según tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal)                             | 72 |
| <b>Tabla 4.12.</b> Contenido de proteínas en lechuga, según tratamiento aplicado (agua de pozo y agua de canal).   | 74 |

## Acrónimos

|        |  |
|--------|--|
| AR     | Agua residual  |
| EDAR   | Estación depuradora de agua residual   |
| EEABB  | Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona                                    |
| PPCP's | Medicamentos y productos para el cuidado personal  |
| OI     | Ósmosis inversa  |
| FO     | Ósmosis directa  |
| R-O    | Riego agua osmotizada  |
| R-P    | Riego agua finca (depósito-pozo)   |
| R-C    | Riego agua canal   |
| EDTA   | Ácido etilendiaminotetraacético  |
| BSA    | Albúmina de suero bovino   |
| MilliQ | Agua re-filtrada   |
| DWASP  | “Decision support-based approach for sustainable water reuse application in agricultural production” |

## Agradecimientos

Este Trabajo de Final de Grado ha contado con la inestimable colaboración de algunas personas a las que debo agradecer sinceramente su aportación.

Un especial agradecimiento merece el trabajo de la Dra. Nuria Cañameras. Su tenaz dedicación, continuo impulso, por ayudarme durante toda la realización y corrección de mi trabajo, son un modelo a seguir.

También debo expresar mi gratitud a la Dra. Nuria Carazo por su apoyo en la realización de la parte experimental en campo. Agradecer a todo el equipo del Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua del (CSIC), en especial a las Técnicas Yolanda Rodríguez por su colaboración en la extracción de carbohidratos y lípidos y Alicia Cano su inestimable colaboración y ayuda en la extracción de proteínas.

A los Sres. Miquel Massip y Daniel Fenero, les agradezco sus esfuerzos y dedicación en el mantenimiento de la parcela experimental situada en la finca de “Agròpolis” (UPC).

Por último, me gustaría agradecer a todas mis amistades por toda la ayuda y apoyo que me han dado durante este proceso. Debo tener un recuerdo, a mis padres, hermana y sobrinos, pero en especial a mi pareja por su paciencia y aliento durante el tiempo invertido en este trabajo.

**INTRODUCCIÓN**

---

# 1. Introducción

## 1.1. Interés de la utilización de agua regenerada.

En los países áridos y semiáridos, los impactos del cambio climático añaden una presión adicional a los ya difíciles desafíos de la gestión del agua. Es probable que el consumo de agua dulce se vuelva insostenible y se exija la necesidad de una reutilización eficaz del agua residual regenerada. Casi la mitad de la población mundial vivirá en áreas de alto estrés hídrico para 2030 (FAO, 2013).

La demanda de agua crece cada vez más debido al aumento de la población, mientras que la oferta hídrica se mantiene igual por el cambio climático. A nivel mundial el sector con más demanda y consumo de agua es el sector agrícola en torno a un 70% de las extracciones de agua, principalmente en la producción de alimentos y fibras y en el procesado de productos agrícolas (FAO- AQUASTAT, 2012). La falta de recursos hídricos provenientes de acuíferos y de aguas superficiales provocada principalmente por lluvias insuficientes o irregulares y también por un aumento de la demanda ha dado paso a un gran impulso estas últimas décadas en el reciclaje de aguas residuales domésticas y municipales para el riego agrícola y de espacios verdes (O'Connor et al., 2008; Calderón-Preciado et al., 2011, 2012; Zalacaín et al., 2019), especialmente, en el sur de Europa (Bixio et al., 2006), siendo España uno de los países pioneros y destacado en reutilización (Mujeriego, 1990, 2007; Melgarejo et al., 2015).

La reutilización del agua regenerada debería tenerse en cuenta como parte de las políticas de gestión integrada de los recursos hídricos en una zona precisa, no obstante, sus estándares de calidad deberían ser adecuados a su reutilización (directa e indirecta). La calidad del agua sería necesario que se adaptara continuamente a las necesidades de los usuarios (Mujeriego, 2007; Comisión Europea, 2015; WWAP, 2019).

Uno de los obstáculos con el que se enfrenta la reutilización del agua regenerada es la incertidumbre sobre la calidad de ésta y la desinformación de los beneficios que puede aportar (Mujeriego, 2007; Comisión Europea, 2015). Por ello, el 25 de mayo de 2020, aparece un nuevo reglamento del Parlamento europeo considerado suficientemente flexible para facilitar el uso de esta agua y por tanto elevar el grado de confianza entre la ciudadanía y las autoridades del agua (DOUE, 2020).



A pesar de ello, la reutilización del agua regenerada se ve, normalmente, gobernada por motivos económicos (DOUE, 2020). Aunque, es mucho más barata que el agua de primer uso (agua potabilizada), sugiere un problema relacionado con la disponibilidad financiera de los gobiernos, a fin de dotar de las infraestructuras necesarias (red de alcantarillado, mejora de los tratamientos de depuración en las EDAR, tratamiento de regeneración y red de distribución de las AR), y su capacidad analítica. En otras palabras, hay países desarrollados con un alto nivel económico y con capacidad analítica para poder generar agua regenerada y establecer todos los controles necesarios para su reutilización, pero hay otros que debido a su baja capacidad financiera no lo pueden abarcar (WWAP, 2019; DOUE, 2020). Además, hay que tener también presente, que, dependiendo de su origen, las aguas regeneradas pueden presentar conductividades eléctricas demasiado elevadas para ser utilizadas sin realizar un cuarto tratamiento (tipo ósmosis o electrodiálisis reversible) para reducir la presencia de sales, lo que conlleva un incremento del coste del agua (Baeza et al., 2012).

Sin embargo, su importancia está aumentando mundialmente derivado de la problemática, cada vez más evidente, de la escasez y calidad de los recursos hídricos. Incluso, hay diferentes países que están optando para potabilizar agua a partir de agua regenerada (Lafforgue y Lenouvel, 2015; Coloma, 2020; Radcliffe y Page, 2020), ya que el desarrollo de nuevas tecnologías vinculadas a la regeneración del agua depurada, cada vez más fiables y eficientes lo permiten (Asano, 1987; Mujeriego, 2013).

En la Unión Europea, el agua regenerada se puede utilizar para la reutilización no potable: riego, refrigeración industrial, descarga de inodoros, recarga de acuíferos y para aumentar los caudales de los ríos y arroyos (FAO- AQUASTAT, 2012).

Algunos estados miembros de la UE, especialmente los que experimentan escasez de agua, han publicado su propio marco legislativo o directrices para las aplicaciones de reutilización del agua. En España se publicó el Real Decreto (RD/1620/2007) de obligado cumplimiento en la reutilización de agua regenerada.

## **1.2. Marco legislativo**

El marco normativo de la reutilización se compone de diferentes niveles (Unión Europea, Estado español y Generalitat de Cataluña). La reutilización de aguas residuales depuradas puede conllevar

diversos riesgos para la salud humana y el medio ambiente por eso son requeridas normativas que reduzcan estos riesgos. Para minimizar dichos riesgos es necesario que el agua a reutilizar cumpla con determinados parámetros que garanticen una adecuada calidad.

- Legislación comunitaria

La **Directiva 91/271/CEE** del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (DOCE, 1991). Compromete a los Estados miembros a velar para que las multitudes urbanas dispongan de un sistema de colectores adecuado y de un tratamiento apropiado de las aguas residuales urbanas.

La **Directiva 2000/60/CE**, del Parlamento y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se estableció una actuación en el ámbito de la política de aguas, ordena una estrategia para combatir la contaminación de las aguas (DOCE, 2000).

- Legislación española

**Real Decreto 907/2007**, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica (BOE, 2007). En este RD se establece que la planificación hidrológica se guiará por criterios de sostenibilidad en el uso del agua mediante la gestión integrada, la protección a largo plazo de los recursos hídricos, y la prevención del deterioro del estado de las aguas, a fin de satisfacer las demandas e incrementar las disponibilidades de recurso.

**Real Decreto 1620/2007**, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas (BOE, 2007). Por medio de este RD, el Gobierno dió cumplimiento al mandato contenido en el artículo 109 del texto refundido de la Ley de Aguas y estableció la regulación reglamentaria para facilitar el acceso y uso de las aguas regeneradas.

- Legislación catalana

**Decreto 84/2007**, de 3 de abril, de adopción de medidas excepcionales y de emergencia en relación con la utilización de los recursos hídricos (DOGC, 2007).

### 1.3. Contaminantes emergentes.

Durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de contaminantes químicos con una extendida presencia en las aguas residuales industriales y municipales, desarrollando métodos efectivos para su eliminación. Los fenoles y sus derivados clorados son probablemente los contaminantes orgánicos más importantes presentes en las aguas residuales de origen industrial. Los desechos humanos, materiales orgánicos, son de los contaminantes más importantes presentes en las aguas residuales de origen municipal, por lo que su presencia en el medio ambiente se ha regulado mediante diferentes disposiciones legislativas (Matamoros et al., 2012).

Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de técnicas analíticas más sensibles ha permitido alertar de la presencia de otros compuestos, potencialmente peligrosos, denominados emergentes. Dentro de este grupo de contaminantes emergentes se pueden encontrar productos farmacéuticos, aditivos plásticos, drogas ilegales y productos cosméticos y de perfumería, que en su mayoría no están legislados. Además, muchas de estas sustancias son utilizadas en grandes cantidades y están presente en muchos materiales y productos de consumo masivo (Almarcha et al., 2011).

Estas sustancias se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí lo es la preocupación por las posibles consecuencias de la misma, ya que el conocimiento sobre su presencia e impacto en el medio ambiente es relativamente escaso. Además, se trata de compuestos cuya elevada producción y consumo provoca su continua introducción en el medio ambiente, por lo que no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrovic et al., 2003).

- Productos farmacéuticos y productos de higiene personal:
- Pesticidas y sus productos de degradación o transformación
- Productos desinfectantes
- Aditivos de las gasolinas
- Detergentes
- Toxinas de algas y cianobacterias

- Compuestos organometálicos
- Compuestos organofosforados

En este TFG queremos destacar los PPCP's, ya que son compuestos biológicamente activos, persistentes y algunos de ellos producen reconocidas afecciones al sistema endocrino. Se caracterizan por ser sustancias químicas de moléculas complejas, con diferentes grupos funcionales y con propiedades fisicoquímicas y biológicas (Gracia-Lor et al., 2012, Wu et al., 2015).

Estos productos se utilizan, principalmente, para mejorar la calidad de la vida de los humanos y de los animales. Una parte de los ingredientes activos son absorbidos, pero el otro gran parte eliminan prácticamente sin metabolizarse a través de la orina o las heces. Además, en el caso de los productos de higiene personal, un exceso puede ser eliminado directamente a las aguas grises (Heberer et al., 2002 a,b; Williams-Nguyen et al., 2016; Christou et al., 2017).

Los productos farmacéuticos pueden ser clasificados de diferentes maneras, según su estructura química, su tipo de acción o su espectro de actividad. Atendiendo el comportamiento de estos productos en las EDAR, clasifican los fármacos en (Jørgensen y Halling-Sørensen, 2000; Pérez et al., 2017):

- Fármacos o metabolitos de los mismos que son mineralizados por los microorganismos, por ejemplo, la aspirina.
- Fármacos o metabolitos que son más o menos persistentes en la EDAR. Una parte de la sustancia puede ser retenida en el barro dependiente de su capacidad para disolverse en la grasa, de las interacciones iónicas o de la presencia de determinados grupos funcionales. Si posteriormente este barro se utiliza como abono, estos compuestos pueden dispersarse en los medios de cultivo.
- Fármacos o metabolitos muy polares que no son mineralizados por los microorganismos ni retenidos en el barro. Son los que más fácilmente llegan a los ambientes acuáticos.

#### **1.4. Agua regenerada destinada al riego**

La carencia de agua en las zonas agrícolas áridas o semiáridas hace que cada vez más se opte, en diferentes países, para utilizar aguas regeneradas para irrigar los cultivos (Bixio et al., 2006; Milano et al., 2012; Hurtado et al., 2016; Christou et al., 2017; Chekli et al., 2017). Además, estos tipos de

aguas representan, generalmente, un beneficio para los cultivos, ya que producen un volumen de agua disponible constante y que aportan importantes cantidades de nutrientes esenciales (Mujeriego, 1990; Calderón-Preciado et al., 2012; Comisión Europea, 2015; Romero-Trigueros et al., 2017; Poustie, 2020; Takeuchi y Tanaka, 2020).

Las plantas de tratamiento de agua residual no permiten la eliminación completa de todos los agentes contaminantes (químicos y microbiológicos) y, por tanto, la transmisión de estos agentes aún es una posibilidad cuando estas aguas se utilizan para regar (Ebele, 2017; Poustie, 2020).

El nivel de contaminación está directamente relacionado con el grado de contacto del agua con las personas, el tipo, la calidad y la fiabilidad de los procesos de tratamiento. Es evidente que la exposición a microorganismos patógenos y sustancias tóxicas es más elevada que en aguas no contaminadas con agua residual y, por esta razón, el objetivo de la regeneración debería ser minimizar los peligros sanitarios y mantenerlos dentro de un nivel aceptable, reduciendo al mínimo la exposición de estos agentes (Hurtado et al., 2017 a,b; Grenni et al., 2018; Ding et al., 2020; Takeuchi y Tanaka, 2020).

De modo que, la presencia de xenobióticos y patógenos en la reutilización de las aguas regeneradas para riego hace que estos afecten las matrices ambientales, como el aire, las aguas subterráneas, el suelo y las plantas (Kinney et al., 2006; Watkinson et al., 2009; Christou et al., 2017; Owino et al., 2020). Este hecho podría representar cierto peligro cuando los cultivos son consumidos o entran en contacto con los animales o las personas (Fatta-Kassinos et al., 2011; Tanoue et al., 2012; Wu et al., 2012; Dodgen et al., 2015, Christou et al., 2017). La sorción y el aumento del contenido de materia orgánica en el suelo son factores importantes para determinar la exposición de las plantas a los xenobióticos, aunque, también dependerá de las condiciones del suelo. En cuanto a los cultivos se acumulan principalmente en las hojas y las raíces, y en menor cantidad en los frutos, los brotes o en los tallos (Hurtado et al., 2017; Poustie et al., 2020).

Además, hay que tener presente que el riego puede llevar asociada una percolación profunda, y, en consecuencia, parte del agua lixiviada llegaría al freático. Por lo tanto, también llegarán a las aguas subterráneas elementos nutritivos, elementos traza, compuestos orgánicos y microorganismos patógenos (Fatta-Kassinos et al., 2011; Romero-Trigueros et al., 2017).

Hay que tener presente, que el número de microorganismos patógenos y los contaminantes químicos presentes en el agua regenerada ha ido disminuyendo a lo largo de los años, ya que las nuevas tecnologías permiten esta disminución

Como ya se ha mencionado anteriormente (apartado 1.1), una problemática que conlleva a menudo la utilización de las AR para regar es su elevada conductividad eléctrica, la cual puede ocasionar en zonas de precipitación limitada una concentración excesiva de sales en el suelo a medio o largo plazo. Este hecho representaría una degradación del suelo y conllevaría una pérdida de rendimiento agrícola (Bunani et al., 2015, Nicolás et al., 2016; Suwaileh et al., 2019).

## 1.5. Ósmosis directa aplicada a la regeneración de agua

Los procesos de ósmosis directa (“Forward osmosis”) han adquirido una reciente importancia a nivel industrial debido a sus económicas e inocuas condiciones de operación en comparación con otras tecnologías de membrana y de separación. Principalmente se ha ido desarrollando debido a la necesidad de obtener nuevos métodos de desalinización de agua y tratamiento de aguas residuales más económicos y viables (Zhao et al., 2012).

La ósmosis directa (FO) utiliza un gradiente de presión osmótica entre la disolución de arrastre, que es la concentrada en el soluto responsable de la presión osmótica y por tanto la que mayor presión osmótica tiene, y la de alimento (diluida) como fuerza impulsora para producir el flujo de agua a través de una membrana semipermeable. De esta manera el agua fluye de forma natural desde la disolución alimento hacia la disolución de arrastre, obteniéndose una disolución de arrastre diluida al final del proceso sin necesidad de aplicar ninguna presión externa a parte de la necesaria para mover el fluido a través de la membrana, es aquí donde yace la principal ventaja de la FO frente a otras tecnologías de membrana convencionales como la ósmosis inversa (OI) (Phillip et al., 2010).

Este ahorro de energía es el que hace a la FO una tecnología de separación por membrana muy interesante en diversos casos:

- Tratamiento de agua residual
- Desalación de agua de mar
- Procesado de alimentos
- Industria farmacéutica

- Generación de energía mediante un proceso de ósmosis por presión retardada

Dentro de este campo, hay diversas situaciones donde aplicar un sistema de FO. Por ejemplo, en la concentración de las aguas residuales diluidas procedentes de la industria. Otro ejemplo, es la concentración de los lixiviados producidos por vertederos. La FO es un sistema eficiente en este caso para separar los sólidos totales disueltos, compuestos orgánicos, metales pesados y nitrógeno del agua. También se emplea para la concentración de líquidos provenientes de la digestión de lodos (Cath et al., 2006).

## **1.6. Antecedentes y motivaciones del trabajo.**

Este trabajo forma parte de un proyecto europeo PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) titulado "Decision support-based approach for sustainable water reuse application in agricultural production". El código de referencia del proyecto es: 2018-SECTION1-W1, y el acrónimo a emplear DSWAP, liderado por Agricultural Research Organization (Israel). Con la participación total de 10 grupos más de países mediterráneos.

Uno de estos grupos de investigación es el liderado por el Dr. Josep M. Bayona, de "l'Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua" (IDAEA) del CSIC. En este grupo de investigación, desde hace unos años, colaboran profesoras de l'Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona (EEABB). Los experimentos de campo en temas agrícolas se llevan a cabo, principalmente, en la unidad experimental de Agròpolis-Parc UPC.

Muchos son los años de investigación donde el equipo liderado por el Dr. Bayona ha estudiado el impacto de contaminantes orgánicos y elementos traza en cultivos hortícolas, con singular interés a la fertilización orgánica y al riego con aguas que contienen dicho tipo de xenobióticos (Calderón-Preciado et al., 2011a, 2011b, 2013; Hurtado et al., 2016, 2017 a,b; Margenat et al., 2017, 2018,2019, 2020; Matamoros y Franco, 2018; Cerqueira et al., 2019 a,b).

El proyecto DSWAP contempla, por parte del equipo del Dr. Bayona, la responsabilidad del diseño y construcción de una planta piloto de ósmosis directa acompañada de una membrana de nanofiltración que permita reducir al máximo la presencia de xenobióticos con el fin de ser utilizada en agricultura y así mejorar la calidad de las aguas de riego no convencionales (agua regenerada y

otras). El proyecto contemplaba especialmente, la viabilidad de obtener agua de riego libre de antibióticos.

La fabricación de esta planta piloto fue encargada a la empresa APRIA Systems y una vez construida fue colocada en Agròpolis en julio de 2020. La calibración y puesta en funcionamiento corría a cargo del grupo de investigación antes mencionada. En principio, estaba pensado poder realizar estos trabajos durante el verano de 2020.

Las parcelas de Agròpolis pueden ser regadas con dos tipos de agua:

- Fuente externa: agua de riego procedente de una canal (corredora C-33: mezcla de agua regenerada procedente de la EDAR de Gavá-Viladecans, agua de lixiviación, agua de escorrentía y agua de lluvia). Esta agua al proceder de una depuradora transporta metales pesados y contaminantes orgánicos (entre ellos antibióticos).
- Fuente interna: agua de riego procedente de una mezcla entre agua de lluvia y agua de pozo.

Durante varios meses, se estuvo trabajando en la calibración de la planta de ósmosis para poder determinar la solución alimento y así crear un diferencial osmótico con el agua a tratar, en este caso procedía de la corredora C-33. Se propuso que la solución alimento fuera de cloruro potásico, ya que así se podría aprovechar la fuente potásica como abono para los cultivos. Cuanto más se aumenta la concentración salina de la solución alimento, más agua se forma en el depósito y más se rentabiliza el sistema. No obstante, si la solución alimento es muy concentrada puede crear fitotoxicidad en el cultivo por exceso salino. En nuestro caso el cultivo escogido fue lechuga que presenta cierta sensibilidad a las sales. Por ello era importante encontrar una concentración adecuada a expensas de producir menos cantidad de agua.

Después de la instalación, y debido a las elevadas temperaturas registradas en los meses de verano, se desarrollaron algas en los depósitos de la planta piloto. Este percance hizo que todo el proceso de calibración se retrasara. Fueron necesarios varios días para poder eliminar la presencia de algas. Se acordó utilizar bisulfito para evitar la formación de algas, cuando la planta no estuviera en funcionamiento.



La planta presentó problemas de funcionamiento y de calibración. Al poner de nuevo la planta en funcionamiento, surgieron nuevos problemas y se solicitó en varias ocasiones la presencia de los técnicos de la empresa que construyó la planta piloto. Pero, aun así, no se pudo utilizar para una primera campaña de cultivo (correspondiente a este TFG), ya que cuando finalizó este primer ciclo aún estaban pendientes de resolver algunos problemas respecto al funcionamiento de la planta piloto.

Inicialmente en este TFG se quería contrastar la utilización de tres tipos de agua de riego: las dos mencionadas anteriormente más el agua de la C-33 sometida a un tratamiento de ósmosis y membrana de flujo nanofiltrante. Sin embargo, debido a la problemática comentada en los párrafos anteriores sólo se pudo regar el cultivo con dos tipos de agua.



**Figura 1-1.** Planta de osmosis directa, situada en la parcela. Fuente: IDAEA- CSIC.

## **OBJETIVOS**

---

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de final de grado es evaluar dos tipos de aguas de riego (agua de canal y agua de finca) en el crecimiento y desarrollo vegetal, contenido de clorofilas, nitratos, lípidos y carbohidratos y proteínas, en un cultivo de lechuga cv maravilla (*Lactuca sativa* L.).

### 2.2. Objetivos específicos

Para poder alcanzar el objetivo general se definieron diferentes labores de trabajo, relacionadas con el crecimiento y tipo de agua, por ello se fijaron los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar la evolución del crecimiento (número de hojas y longitud de la hoja más larga) del cultivo.
- Evaluar la biomasa producida (peso fresco, peso seco).
- Evaluar el contenido de clorofilas a, b y totales.
- Determinar el contenido de nitratos del cultivo.
- Valorar el contenido de lípidos e hidratos de carbono.
- Valorar el contenido de proteínas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 3. Material y métodos

### 3.1. Localización del experimento

La parte experimental de campo de este trabajo de final de grado fue realizada en una parcela de cultivo (**Fig. 3-1**) ubicada en el “Parc UPC - Agròpolis”, situado en Camí de les Filipines 110 (longitud 2°03\_E, latitud 41°17\_N), en el municipio de Viladecans, comarca del Baix Llobregat. Las determinaciones analíticas fueron realizadas en laboratorios de la Escola d’Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona (EEABB) y del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC).



---

**Figura 3-1** Parcela experimental del cultivo. Fuente: Elaboración propia

### 3.1.1. Parcela experimental del cultivo

La parcela destinada para el cultivo de lechugas como se observa en la (Fig. 3-1) tiene ocupada una superficie de 250 m<sup>2</sup>, especificado en el apartado 3.5.4. Dicha parcela está ubicada junto a la planta piloto de ósmosis directa y nanofiltración para el proyecto DSWAP (proyecto PRIMA).

El experimento corresponde a una primera campaña de cultivo de lechuga.

### 3.1.2. Laboratorios

#### IDAEA-CSIC

En los laboratorios del centro de investigación IDAEA-CSIC se realizó la extracción de los carbohidratos, lípidos y proteínas.

#### EEABB

En el laboratorio de producción vegetal de la EEABB (laboratorio 307 del edificio D4), se realizaron gran parte de las determinaciones gravimétricas y nítricas cuantificadas en este trabajo.

## 3.2. Material vegetal

Para la realización de este experimento se empleó como material vegetal *Lactuca sativa* L. variedad Maravilla. El plantel fue adquirido en la empresa de plántulas-Casals Vedri Claudi de Sant Boi de Llobregat.

Se adquirieron tres bandejas de 216 plántulas cada una. De acuerdo con la distribución de los tratamientos y repeticiones realizados en el experimento (apartado 3.5.4) del total de plántulas



---

**Figura 3-2.** Plantel *Lactuca sativa* L. var. Maravilla.

Fuente: Elaboración propia

adquiridas se trasplantaron, inicialmente, 540 (**Fig. 3-2**).

### **3.3. Características del suelo**

Previamente a la plantación de la campaña de cultivo se recogieron varias muestras simples de suelo con las que se elaboró una muestra compuesta analizada por la empresa Eurofins Agroambiental, S.A (**Tabla 3-1**). Los resultados de esta analítica nos indican que en el suelo no hay deficiencias ni de fósforo ni de potasio, por el contrario, como ocurre en muchos suelos de cultivo, el porcentaje de materia orgánica es bajo, también se observan problemas de calcio activo.

**Tabla 3.1.** Características principales del suelo de las subparcelas de cultivo. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A.

| Propiedades básicas                                       | Resultados                | Interpretación                |
|---|---------------------------|-------------------------------|
| Humedad 105°C   | 1.31%                     |                               |
| pH (extracto 1:2,5 H <sub>2</sub> O)                      | 9.0                       | Ligeramente alcalino          |
| Conductividad eléctrica 25°C (extr. 1:5 H <sub>2</sub> O) | 0.19 dS/m                 | No limitante                  |
| Carbono orgánico (C)                                      | 0.58 % s.m.s              |                               |
| Materia orgánica (W&B)                                    | 1.00 % s.m.s              | Bajo                          |
| Carbonato cálcico equivalente                             | 27 % s.m.s                | Muy calcario                  |
| Calcio activo   | 6 %s.m.s                  | Medio, ligeramente clorosante |
| <b>Nutrientes</b>   |                           |                               |
| Nitrógeno Kjeldahl (N)                                    | 0.088 %s.m.s              | Medio-bajo                    |
| Fósforo (P) (Olsen)                                       | 25.8 mg/Kg s.m.s          | Alto                          |
| Potasio (K) (extracto acetato amónico)                    | 387 mg/Kg s.m.s           | Muy alto                      |
| Calcio (Ca) (extracto acetato amónico)                    | 6257 mg/Kg s.m.s          | Alto                          |
| Magnesio (Mg) (extracto acetato amónico)                  | 231 mg/Kg s.m.s           | Normal                        |
| Sodio (Na) (extracto acetato amónico)                     | 62 mg/Kg s.m.s            | Normal                        |
| <b>Relaciones de interés</b>                              |                           |                               |
| Relación Carbono/Nitrógeno                                | 6.6                       |                               |
| Relación Calcio/Magnesio                                  | 27.1                      | Deficiencia de magnesio       |
| Relación Magnesio/Potasio                                 | 0.6                       | Deficiencia de magnesio       |
| Relación Calcio/Potasio                                   | 16.2                      | Adecuado                      |
| <b>Propiedades físicas</b>                                |                           |                               |
| Arcilla < 0.002 mm  | 28.7 %                    |                               |
| Limo total (0.002-0.05 mm)                                | 27.4 %                    |                               |
| Arena total (0.05-2 mm)                                   | 43.9 %                    |                               |
| Textura   | Franco-arcillosa          |                               |
| <b>Micronutrientes</b>                                    |                           |                               |
| Hierro s.m.s  | 103 mg/Kg s.m.s           | Normal                        |
| Cobre (Cu)  | 3.4 mg/Kg s.m.s           | Normal                        |
| Manganeso s.m.s   | 134 mg/Kg s.m.s           | Normal                        |
| Zinc (Zn)   | 5 mg/Kg s.m.s             | Normal                        |
| Molibdeno (Mo)  | Detec.<(1.25) mg/Kg s.m.s |                               |



### 3.4. Fertilizantes

Los fertilizantes empleados en el experimento fueron de dos tipos: mineral y orgánico. Las dosis empleadas se encuentran detalladas en el apartado 3.5.2.

- **Fertilizante orgánico:**
  - Estiércol de oveja: no se dispone de un análisis específico del estiércol usado. No obstante, de acuerdo con el dossier técnico elaborado por el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació (2020) se puede considerar que se trata de un abono con un contenido importante de nitrógeno (9,4 Kg N/m<sup>3</sup>), fósforo (5 Kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>) y potasio (10 Kg K<sub>2</sub>O/m<sup>3</sup>).
- **Fertilizante mineral:**
  - Nitrato amónico (34% N)

### 3.5. Tratamientos y diseño del experimento

#### 3.5.1. Tratamientos

Como se explica en el apartado 3.2. la especie vegetal utilizada fue *Lactuca sativa* L. regada con dos tipos de aguas (canal y finca). Para cada uno de estos dos tratamientos, se establecieron cuatro réplicas, repartidas linealmente y alternas, entre las doce subparcelas correspondientes. En principio las aguas de riego tenían que ser 3 pero debido a los problemas surgidos en la puesta en funcionamiento de la planta piloto de ósmosis directa, a pesar de las numerosas horas empleadas por la autora de este TFG y de personal investigador del IDAEA-CSIC, en nuestro experimento sólo se han podido evaluar el efecto de dos aguas de riego en la especie indicada. En el caso de que la planta hubiera funcionado la tercera agua hubiera sido el agua de canal regenerada en la planta de ósmosis y equipo de nanofiltración, para eliminar los xenobióticos presentes, a través de a ósmosis directa (FO).

Las dimensiones de las subparcelas experimentales fueron de 8,16 m<sup>2</sup> (6,80 m x 1,20 m) (**Anexo B., Fig. B-1**).

### 3.5.2. Dosificación de fertilizante mineral

La cantidad de abono mineral a incorporar al suelo se determinó mediante el ajuste entre la necesidad de nitrógeno del cultivo, la aportación orgánica y la riqueza en nitrógeno del fertilizante mineral (**Anexo A**). En la **tabla 3-2**, se especifica la dosis incorporada para la totalidad de la parcela de 250 m<sup>2</sup>.

Las unidades fertilizantes por utilizar se calcularon a partir de las extracciones descritas para lechuga por Pomares y Ramos (2010):

$$N = 100 \frac{\text{kg}}{\text{ha}}; P_2O_5 = 40 \frac{\text{kg}}{\text{ha}}, K_2O = 185 \frac{\text{kg}}{\text{ha}}$$

En el caso del abono orgánico las cantidades aplicadas se determinaron a partir de las unidades fertilizantes nitrogenadas necesarias (**Tabla 3-2**). Posteriormente, se realizó un aporte de fertilizante de nitrato de amónico para ajustar dichas necesidades. Por ello en este experimento se estableció que, para el cálculo de la dosis a aplicar de abono mineral, se ajustará sólo a  $5 \frac{\text{g}}{\text{m}^2}$  de *N* (**Anexo A**), debido a la fertilización orgánica realizada y la no necesidad de aporte de fósforo y potasio al tratarse de un suelo muy rico en estos dos macroelementos.

**Tabla 3.2.** Dosis de los fertilizantes usados en el experimento. Fuente: Elaboración propia

| Fertilizante            | Dosis  |
|-------------------------|--|
| Estiércol de oveja      | 20 toneladas (7200 m <sup>2</sup> )  |
| Nitrato amónico (34% N) | 7.353 g abono $\frac{\text{nitrogenado}}{\text{parcel.}(250 \text{ m}^2)}$ |

### 3.5.3. Sistema de riego.

Para regar se utilizó un sistema de riego por goteo por cinta AQUA-TRAXX, de un caudal de 1,14 L/h y una separación entre goteros de 20 cm. De acuerdo con los tratamientos establecidos (apartado 3.5.1.) se regó con dos procedencias de agua (canal y depósito-pozo) (**Anexo B, Fig. B-4**).

El agua procedente de depósito está compuesta, en su mayoría, por agua de lluvia (65%) almacenada en un depósito pluvial de la finca situado debajo de uno de los invernaderos y agua de

pozo (35%). La conductividad eléctrica y el pH medio durante el estudio fue 0.6 dS/m y 7.65 respectivamente, (**Tabla 3-3**).

El agua procedente del canal corresponde al agua que transporta una de las corredoras que circulan por el Parc Agrari del Baix Llobregat, en concreto se trata de la corredora C-33, la cual se sabe que presenta una carga de xenobióticos. El agua de este canal aporta agua de la planta de regeneración de la EDAR de Gavà-Viladecans, agua de otras corredoras, agua de lluvia y aguas de escorrentía y lixiviación de los campos agrícolas. La conductividad eléctrica y el pH medio durante el estudio fue de 3.5 dS/m y 8.64 respectivamente. Por lo tanto, se trata de un agua con elevado riesgo para la salud humana, ya que contiene contaminantes emergentes. (**Tabla 3-4 y 3-5**).

La frecuencia de riego fue de 1 día a la semana (miércoles) durante 60 minutos. Cabe destacar que esta pauta de riego dependió de la distribución y cuantía de las precipitaciones (**Anexo C.**), durante el período que duró el ensayo. Se instalaron tres cintas de riego separadas entre ellas 40 cm, dejando un margen en la primera de 15 cm desde el inicio de la subparcela (**Anexo B., Fig. B-3**).

**Tabla 3.3.** Analítica del agua depósito-pozo. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A.

| Parámetros                       | Resultados |
|----------------------------------|------------|
| CE                               | 0.6 dS/m   |
| N-NO <sub>3</sub> <sup>(-)</sup> | 0.73 mg/L  |
| NO <sub>3</sub> <sup>(-)</sup>   | 3.25 mg/L  |
| N-NH <sub>4</sub> <sup>(+)</sup> | 0.104 mg/L |
| NH <sub>4</sub> <sup>(+)</sup>   | 0.133 mg/L |
| N-NH <sub>3</sub>                | 0.126 mg/L |
| NH <sub>3</sub>                  | 0.104 mg/L |

**Tabla 3.4.** Analítica del agua de canal. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A.

|                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| pH                               | 7.65              |
| <b>Parámetros</b>                | <b>Resultados</b> |
| CE                               | 3,5 dS/m          |
| N-NO <sub>3</sub> <sup>(-)</sup> | 1,01 mg/L         |
| NO <sub>3</sub> <sup>(-)</sup>   | 4,45 mg/L         |
| N-NH <sub>4</sub> <sup>(+)</sup> | 0.089 mg/L        |
| NH <sub>4</sub> <sup>(+)</sup>   | 0.115 mg/L        |
| N-NH <sub>3</sub>                | 0.089 mg/L        |
| NH <sub>3</sub>                  | 0.109 mg/L        |
| pH                               | 8,64              |

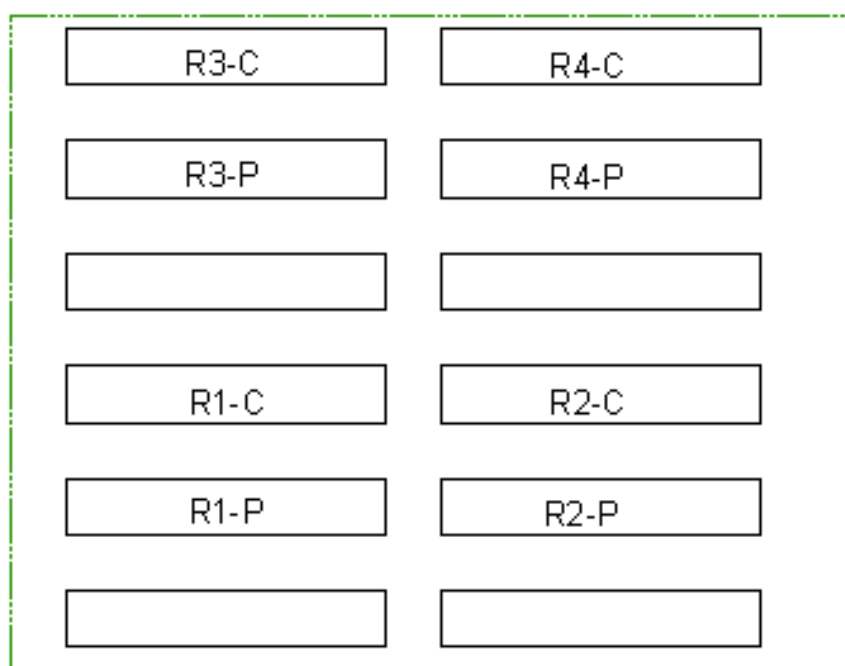
**Tabla 3.5.** Concentración Antibióticos (ng/L). LOD (limit of detection): 0.5 ng/L. Fuente: Eurofins Agroambiental, S.A.

|                  | <b>Canal 1<br/>(Agropolis)</b> | <b>Canal 2<br/>(Agropolis)</b> |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| sulfamethizole   | 0.56                           | 0.56                           |
| sulfamethazine   | 5.36                           | 5.36                           |
| sulfacetamide    | <LOD                           | <LOD                           |
| sulfapyridine    | 7.84                           | 7.84                           |
| sulfathiazole    | 3.68                           | 3.68                           |
| sulfadiazine     | 2.72                           | 2.72                           |
| lincomycin       | <LOD                           | <LOD                           |
| sulfamethoxazole | 1.52                           | 1.52                           |

### 3.5.4. Distribución de los tratamientos y repeticiones

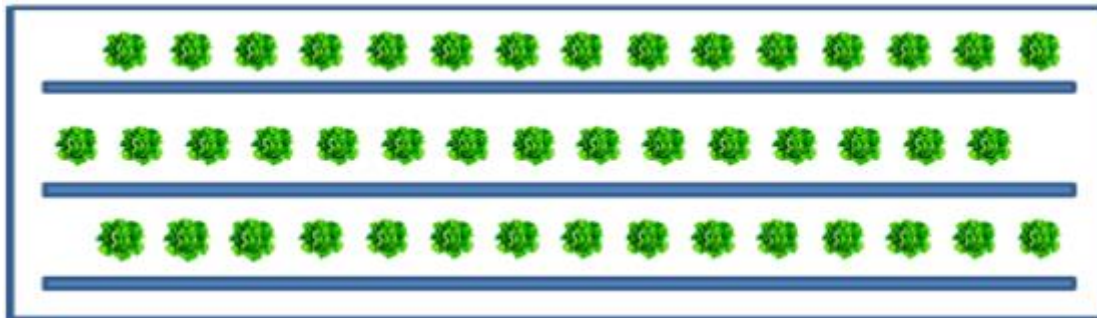
La distribución de los tratamientos para esta campaña de cultivo y para cada subparcela fue lineal, para facilitar la distribución del sistema de riego. En la **figura 3-3**, se detalla la disposición de las subparcelas en la zona de cultivo y cuáles de ellas fueron destinadas a cada tipo de tratamiento.

Para cada tratamiento identificado como R-P (riego agua finca (pozo) y R-C (riego agua canal), se realizaron 4 réplicas, identificadas con la numeración del 1 al 4 (**Anexo B, Fig. B-2**).



**Figura 3-3.** Distribución de los tratamientos en cada subparcela experimental de cultivo. Fuente: Elaboración propia.

En cuanto al material vegetal, se plantaron 15 plántulas por cada línea de riego, lo que supone un total de 45 por subparcela (apartado 3.2.) tal y como se muestra en la **figura 3-4**. El marco de plantación establecido fue de 40 cm x 40 cm al tresbolillo (**Anexo B, Fig. B-3**).



**Figura 3-4.** Distribución de las plantas de lechuga en cada subparcela. Fuente: Elaboración propia.

### 3.6. Gestión del experimento

La gestión del experimento consta de dos partes. La primera hace referencia a todos los procedimientos que fueron necesarios para el inicio del cultivo y durante su desarrollo, y la segunda puede asociarse a todos los trabajos que se realizaron después de la cosecha, las cuales incluían el análisis y la determinación de los parámetros establecidos (apartados 3.9., 3.10.,3.11.,3.12.).

Inicialmente, se hizo una labor de acondicionamiento de la parcela, donde se delimitaron sus márgenes exteriores y los de cada subparcela con plástico lineal negro biodegradable, fabricado a partir de materias primas biodegradables (biopolímeros) que confieren al producto las características básicas de un acolchado. La capacidad de biodegradarse en el terreno permite que el plástico se incorpore a la tierra de forma inocua, en este caso compuesto por fécula de patata.

El segundo paso fue la adquisición de todo el material necesario para realizar el ensayo, como el material vegetal, su procedencia esta descrita en el apartado 3.2., y el equipamiento de ósmosis directa y nanofiltración de APRIA Systems.

A pesar de que no se puede incluir en este TFG el tratamiento con agua osmotizada, sí que previamente a la implantación de las parcelas de cultivo e inicio del experimento de campo se trabajó en la planta piloto de ósmosis. Las labores realizadas en la planta consistieron, principalmente, en el intento de avanzar en la calibración para los parámetros conductividad

eléctrica y pH. El agua osmotizada debe presentar unos valores adecuados para el cultivo. Tal como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria primero se tuvieron que hacer pruebas para saber la dilución de la solución alimento a utilizar para poder crear un diferencial osmótico entre el agua a osmotizar y dicha solución alimento. En este caso como solución alimento se optó por utilizar cloruro potásico. Se ensayaron diferentes concentraciones de cloruro de potasio (KCl) para determinar el flujo inicial para poder calibrar el equipo y empezar a generar agua osmotizada. Uno de los problemas que conlleva la planta de ósmosis es encontrar un equilibrio entre la concentración de la solución alimento y la cantidad y calidad de agua que se forma, que sea apta para el cultivo. Cuanto más aumentamos la concentración salina más agua se forma, pero esto puede conllevar problemas de fitotoxicidad o de estrés salino al cultivo debido a que arrastra sales de la solución alimento.

Por ello se estuvieron haciendo pruebas durante varios meses para encontrar la concentración adecuada y la planta piloto. Además, dicha planta tenía problemas de funcionamiento por lo que fue necesario en varias ocasiones la presencia de los técnicos de la empresa que la había construido. Comentar que aún no se ha conseguido que la planta trabaje correctamente

Unos cuantos meses antes de la iniciación del cultivo se realizó el abonado orgánico. Días antes de la plantación se colocó el sistema de riego y el acolchado. Durante el proceso de crecimiento de las lechugas, se realizó semanalmente un control visual y cuantitativo, referentes al número de hojas y a la longitud de la hoja más larga de la planta.

En la **tabla 3-6** se recoge la recopilación de las fechas ordenadas cronológicamente de todas las acciones descritas anteriormente.

**Tabla 3.6** Cronología de las actividades realizadas durante el experimento. Elaboración propia.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>15-07-2020</b>               | - Instalación planta de ósmosis directa (FO) y equipo de nanofiltración<br>- Inicio instalación red general de riego |
| <b>09-06-2020</b>               | - Fertilización con estiércol de oveja   |
| <b>30-09-2020 al 31-07-2021</b> | - Puesta en funcionamiento y calibración de la planta FO<br>- Equipo de nanofiltración                               |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>8-02-2021</b>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fertilización con nitrato amónico</li> <li>- Instalación de la cinta de riego</li> </ul>  |
| <b>11-02-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Instalación del acolchado</li> </ul>  |
| <b>17-02-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Trasplante de las plántulas de lechuga adquiridas a la empresa Casals Vedri Claudi Planters</li> <li>- Se señaló las réplicas de cada tratamiento en las subparcelas.</li> <li>- Primer control del cultivo</li> <li>- Primer riego de duración 75 min</li> </ul> |
| <b>24-02-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Segundo control del cultivo</li> <li>- Se observó la formación de antocianos debido a las bajas temperaturas.</li> </ul>  |
| <b>03-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tercer control del cultivo</li> </ul>   |
| <b>10-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Muestra de las aguas de riego para su análisis</li> </ul>   |
| <b>11-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuarto control del cultivo</li> <li>- Se notificó la falta de 2 plántulas en la R3-C y en la R4-C</li> </ul>  |
| <b>12-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Segundo riego de duración 40 min.</li> </ul>  |
| <b>17-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quinto control del cultivo</li> <li>- Se replantaron 4 plántulas en las réplicas R3-C y R4-C</li> </ul>   |
| <b>24-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sexto control del cultivo</li> </ul>  |
| <b>26-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tercer riego de duración 40 min.</li> </ul>   |
| <b>31-03-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Séptimo control del cultivo</li> </ul>  |
| <b>07-04-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Octavo control del cultivo</li> </ul>   |
| <b>09-04-2024</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuarto riego de duración 40 min.</li> </ul>   |
| <b>14-04-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Noveno control del cultivo</li> </ul>   |
| <b>21-04-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Décimo control del cultivo</li> </ul>   |
| <b>28-04-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Último control del cultivo</li> <li>- Cosecha de las lechugas.</li> <li>- Determinación de biomasa fresca, clorofilas y nitratos.</li> </ul>  |
| <b>03-05-2021</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinación de biomasa seca</li> </ul>  |
| <b>07-06-2021 al 30-06-2021</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estancia en los laboratorios del centro de investigación IDAEA-CSIC, con el objetivo de cuantificar el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas en las muestras de lechuga.</li> </ul>   |



### 3.7. Evaluación del desarrollo del cultivo

La duración total del cultivo en la parcela fue de 71 días. En la **tabla 3-6** se detallan las fechas de la plantación y la cosecha. A lo largo de todo el proceso se planteó supervisar semanalmente la parcela y se llevó a cabo un control semanal del cultivo, consistente en la medición del número de hojas y de la longitud de la hoja más larga. Además de comprobar si el desarrollo era favorable o había algún problema.

Para evaluar el desarrollo del cultivo, de las tres líneas de plantas establecidas por cada repetición, se seleccionó la línea central y dentro de ella se seleccionaron 5 plantas consecutivas, desde el extremo norte del cultivo, descartando la primera planta de dicha hilera con el fin de evitar el efecto borde (**Fig. 3-5**).



**Figura 3-5.** Localización de las plantas seleccionadas para evaluar la evolución del cultivo (rectángulo rojo). Fuente: Elaboración propia.

#### 3.7.1. Número de hojas

Para determinar el número de hojas se realizó el conteo de las hojas desarrolladas y abiertas. En ninguna ocasión se contabilizaron las que formaban parte del cogollo de la lechuga.

#### 3.7.2. Longitudes

Para estimar la longitud de las hojas, se decidió medir siempre la hoja más larga localizada en el perímetro más exterior de la planta, hecho que facilitó su medida.

Para proceder a la determinación de dicha longitud, se utilizó una cinta métrica, cuya resolución era de 1 mm y la exactitud de  $\pm 0,1$  cm. La hoja más larga se seleccionó de manera visual, y su medida se cuantificó desde la superficie del suelo hasta el extremo de la hoja.

### 3.8. Biomasa

#### 3.8.1. Peso fresco

Para la determinación del peso fresco se optó por las mismas cinco plantas descritas en el apartado 3.7. La cuantificación se realizó en el momento de la cosecha, en la propia finca, para evitar la pérdida de agua (**Fig. 3-6**).

Anterior a la determinación del peso fresco, se identificaron todas las plantas. Una vez hecha esta tarea se procedió a su pesaje con una balanza GX-30K de 2 g de resolución y 1 g de exactitud. Se hicieron dos pesajes, uno de la planta entera, y otro de un cuarto de cada planta, con el fin de tener dos muestras de cada unidad para poder realizar los análisis por los equipos de investigación IDAEA-CSIC y por el equipo EEABB con mayor rapidez y eficacia.



---

**Figura 3-6.** Biomasa al final del cultivo

#### 3.8.2. Peso seco

El peso seco se determinó, en el laboratorio de Producción Vegetal de la EEABB, a partir del material vegetal que previamente se había cuantificado el peso fresco. El material vegetal anteriormente identificado se dispuso en bandejas perforadas y se introdujo en la estufa de secado (Selecta,

modelo DRY-BIG) a 80 °C hasta alcanzar peso constante. Pasado este tiempo el peso del material vegetal se estabilizó y es cuando se pudo proceder a la determinación del peso seco. Para esta determinación se usó una balanza Sartorius BP 310 S de 0,01 g de resolución y de 0,001 g de exactitud (Fig. 3-7).



**Figura 3-7.** Determinación del peso seco con la balanza Sartorius BP 310 S de 0,001 g de resolución.

### 3.8.3. Contenido de agua

$$\% \text{ Contenido hídrico} = \frac{\text{Peso fresco (g)} - \text{Peso seco (g)}}{\text{Peso fresco (g)}} * 100$$

[1]

Para evaluar el contenido en agua de cada planta, se relacionaron las determinaciones del peso fresco y seco. La diferencia de estas medidas dio el contenido hídrico absoluto. El porcentaje hídrico se calculó a partir de la ecuación [1].

### 3.9. Determinación de clorofilas.

Para proceder a la determinación de la cantidad de clorofilas, se hizo uso del aparato OPTI-SCIENCES CCM-200 plus, cuya exactitud es de  $\pm 0,05$  unidades y su resolución de 0,1 unidad. Este aparato calcula el CCI (índice de contenido de clorofila) dando como resultado una medida adimensional.

Este aparato (**Fig. 3-8.**) es un instrumento óptico que permite realizar una cuantificación no destructiva de la muestra. Mide la relación entre la transmitancia en el rojo 653 nm y el infrarrojo 931 nm. La medida es casi instantánea con una frecuencia inferior a los tres segundos. El área de medida es la de un círculo de 9,52 mm de diámetro, es decir, una superficie de 71 mm<sup>2</sup>.



---

**Figura 3-8.** Determinación de clorofila de la hoja exterior mediante el OPTI-SCIENCES CCM -200 plus.

Para esta determinación se utilizó material recién cosechado. La estimación del CCI se realizó en dos posiciones distintas de hojas (exterior e interior) con relación a la planta. En cada posición se realizaron tres repeticiones, es decir, en total se obtuvieron 6 medidas por lechuga.

Con el fin de encontrar el valor del contenido real de clorofilas, la medida proporcionada por el CCM se transformó haciendo uso de las ecuaciones [2], [3] y [4] obtenidas por Nadal (2015), donde se relaciona la concentración de clorofilas con la lectura proporcionada por el aparato.

$$\text{Clorofilas } a \rightarrow y = 0,009 x \ln(x) - 0,0006 \quad [2]$$

$$\text{Clorofilas } b \rightarrow y = 0,0026 x \ln(x) - 0,0001 \quad [3]$$

$$\text{Clorofilas } \text{totales} \rightarrow y = 0,0116 x \ln(x) - 0,0007 \quad [4]$$

$y$  = concentración de clorofilas (mg/cm<sup>2</sup>)

$x$  = índice de contenido de clorofilas

### 3.10. Determinación de nitratos.

Los nitratos están tomando cada vez más fuerza como parámetro de calidad del alimento debido a los riesgos que pueden ocasionar a la salud del consumidor. Las dosis máximas permitidas en el consumo han ido variando con el tiempo, avanzando siempre hacia mayores exigencias en el control de estos valores.

Para proceder a la determinación de la cantidad de nitratos, se hizo uso del aparato LAQUAtwin-NO<sub>3</sub>-11 (Fig. 3-9), precisión ±10 % el valor de lectura. Este aparato calcula el contenido de nitratos dando como resultado el valor de nitratos de la muestra sin necesidad de hacer diluciones.



---

**Figura 3-9.** Medidor de nitratos LAQUAtwin-NO3-11.

Antes de proceder a medir los nitratos presentes en la muestra, se debe calibrar el LAQUAtwin-NO3-11, se utilizarán las soluciones estándar proporcionadas para una medición precisa en todo el rango, se ejecutarán dos puntos de precisión.

Primero se ponen unas gotas de solución en el sensor plano, la cantidad utilizada debe ocupar los dos círculos del aparato. Después se presiona el botón de CAL se habrá calibrado cuando aparecen los iconos de estabilidad. A continuación, se limpiará con agua y se secará suavemente, para utilizar la segunda solución estándar, se presiona el botón MEAS para la medición.

Para esta medición se utilizó material del mismo día de la cosecha, cogiendo algunas hojas para extraer la savia y así proceder a la medición (**Fig. 3-10**).



---

**Figura 3-10.** Extracción de la savia para medición nitratos.

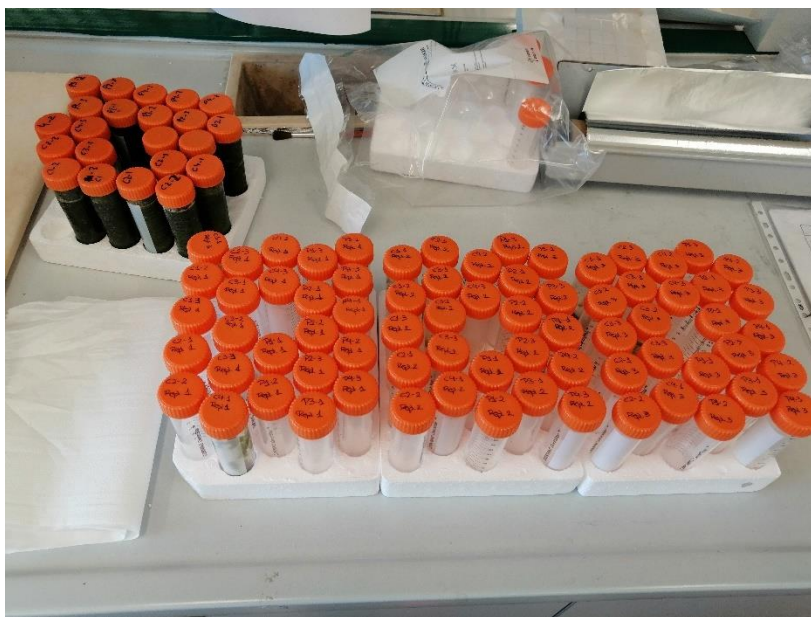
### 3.11. Determinación de carbohidratos y lípidos.

#### 3.11.1. Preparación de las muestras

En el momento de la cosecha de las lechugas, se identificaron las plantas seleccionadas de las subparcelas de cultivo y se trasladaron a los laboratorios IDAEA-CSIC para proceder a su posterior trituración y congelación. En el mes de junio de 2021 se procedió a la extracción de los carbohidratos y los lípidos.

Se obtuvieron 12 tubos Falcon por tratamiento, 3 por cada subparcela, uno entre las lechugas numeradas 1,3 y 5. Estas muestras fueron, respectivamente, numeradas según la correspondiente localización de las plantas en la subparcela y el agua empleada (**Fig. 3-11**).

Para llevar a cabo la extracción era necesario que el material vegetal estuviera seco, para ello se descongeló el material vegetal y se pesó una cantidad de 3 g de muestra por cada tubo Falcon, previamente enumerados y pesados con tapón. Estos pesajes se llevaron a cabo con una balanza RADWAG AS 220.R1 de 0,0001 g de resolución y 0,00001 g de exactitud.



**Figura 3-11.** Muestras más réplicas para contenido carbohidratos y lípidos.

El siguiente paso en la preparación de las muestras fue la introducción de los tubos falcon con la muestra vegetal en la estufa modelo HRGC 5300 a 120°C durante 24-48 horas, tras este tiempo la

materia vegetal había alcanzado un peso estable. Los tubos se introdujeron en la estufa con papel de plata en lugar del tapón, para favorecer la evaporación.

### 3.11.2. Extracción de carbohidratos y lípidos.

El método descrito y publicado por los propios investigadores del IDEA-CSIC (Margenat et al., 2018) fue el empleado para realizar la extracción de los carbohidratos y los lípidos.

El primer paso de la extracción fue la adición de 15 ml de disolvente orgánico, en este caso etanol/hexano en proporción 1:1 (v/v), a la muestra ya seca. Después, los tubos falcon se colocaron durante 15 minutos en el ultrasonido (Bandelin sonorex digiplus DL 156 BH), para facilitar la salida de lípidos e hidratos de carbonos, para posteriormente introducirlos en la centrifugadora (Sigma 3-16) a 4000 rpm durante otros 15 minutos, favoreciendo la decantación de los sólidos y facilitando la extracción del sobrenadante.

El sobrenadante, que quedó tras el centrifugado en los tubos Falcon, se extrajo mediante una jeringuilla y se vertió en un bote de cristal a través de un filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , que previamente había sido pesados. El método empleado por Margenat et al. (2018), concluía que, tras la evaporación del líquido restante, los lípidos quedarían adheridos a la pared del tubo de cristal, mientras que, los carbohidratos quedarían retenidos en el filtro. Para favorecer la evaporación se colocó el filtro y el recipiente de cristal en una placa de calor y se aplicó un flujo de nitrógeno gas (**Fig. 3-12**). Se realizaron varios pesajes a los tubos y a los filtros empleados hasta que se comprobó que el peso era estable, para ello se hizo uso de una balanza RADWAG AS 220.R1 con una resolución de 0,0001 g y una exactitud 0,00001 g.





**Figura 3-12.** Sistema, mediante nitrógeno y placa de calor, empleado en la evaporación de los filtros y tubos.

### 3.11.3. Cuantificación del contenido de carbohidratos y lípidos.

Una vez conocidos el peso inicial y final de los filtros y la cantidad exacta de materia vegetal añadida se calculó el contenido de carbohidratos y lípidos tal y como muestran las ecuaciones [5] y [6].

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{\text{Peso filtro final}(g) - \text{Peso filtro inicial}(g)}{\text{Materia vegetal añadida } (g)} * 100 \quad [5]$$

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{\text{Peso filtro final}(g) - \text{Peso filtro inicial}(g)}{\text{Materia vegetal añadida } (g)} * 100 \quad [6]$$

## 3.12. Contenido de proteínas

El contenido de proteínas se cuantificó utilizando el método de Bradford. Este método requiere una preparación del material vegetal.

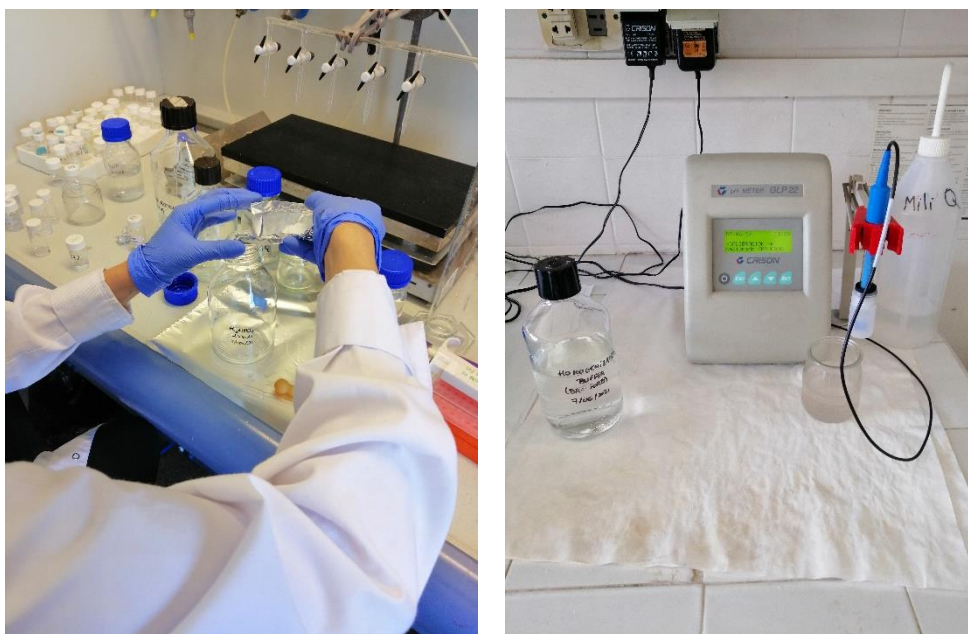
### 3.12.1. Preparación de homogeneización y fraccionamiento de tejidos.

En el momento de la cosecha de las lechugas, se identificaron las plantas seleccionadas de las subparcelas de cultivo y se trasladaron a los laboratorios IDAEA-CSIC para proceder a su posterior trituración y congelación. En el mes de junio de 2021 se procedió a la extracción de las proteínas.

Para poder preparar la homogeneización y fraccionamiento de los tejidos de las muestras de material vegetal fue necesario primeramente preparar una solución tampón.

- **Preparación 100 mM tampón de fosfato, pH: 7.4, 4°C +150 mM KCl + 1 mM EDTA (volumen total= 400mL) (Fig. 3.13):**

Se preparó 500 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,709 g) y 200 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,7218 g) y se llevó a ultrasonidos para disolverlo mejor. Se añadió: 4 mL 1 mM EDTA + 96 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 150 mM KCl después se añadió 300 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y posteriormente se llevó a un baño de ultrasonidos y se conservó en condiciones de refrigeración (4°C). Se ajustó el pH (pH METER CRISON GLP 22) a 7.4 con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.



**Figura 3-13.** Preparación del Phosphate buffer y ajuste de pH.

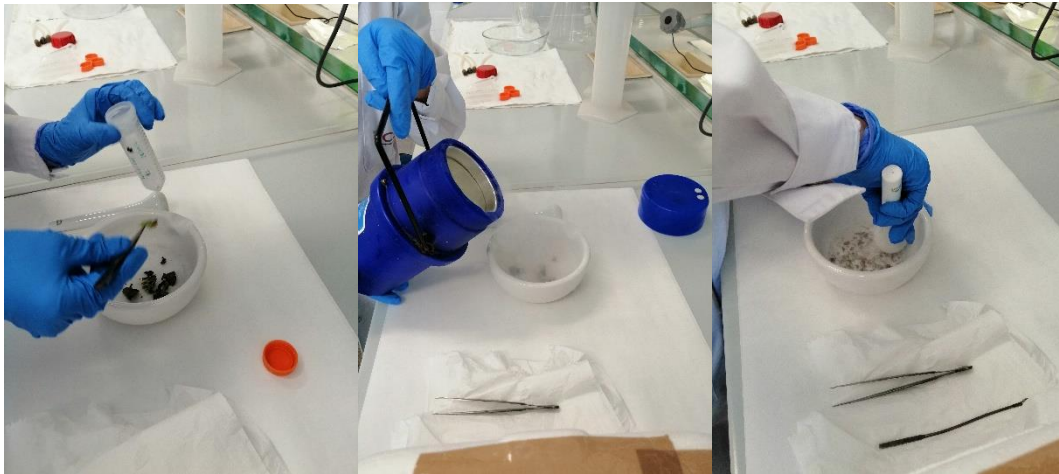
A continuación, se tuvo que homogeneizar las muestras con nitrógeno líquido.

- **Homogeneizar muestras con N2 líquido:**

Se cogieron las muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se pusieron en hielo seco (para evitar su descongelación) (Fig. 3.14).

Se cogió la mitad de la muestra longitudinalmente:

- a. La mitad se guardó otra vez en su falcon correspondiente y se introdujo en hielo seco para posteriormente volver a almacenarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- b. La otra mitad se homogeneizó con N2 líquido y golpes de mortero (2-3 veces). Se guardó en un falcon nuevo y se puso en hielo seco. A continuación, se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3-14.** Preparación muestras con N2 líquido para homogeneizar.

Para poder realizar la valoración de las proteínas se tuvo que proceder al fraccionamiento de los tejidos.

- **Fraccionamiento de tejidos:**

Se pesaron 12 tubos de ensayo de plástico por tratamiento. A continuación, se pusieron en hielo seco junto con una espátula de plástico. Posteriormente se añadió aproximadamente  $\approx 100$  mg de muestra a cada tubo y se colocó en hielo para descongelar y poder mantener una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

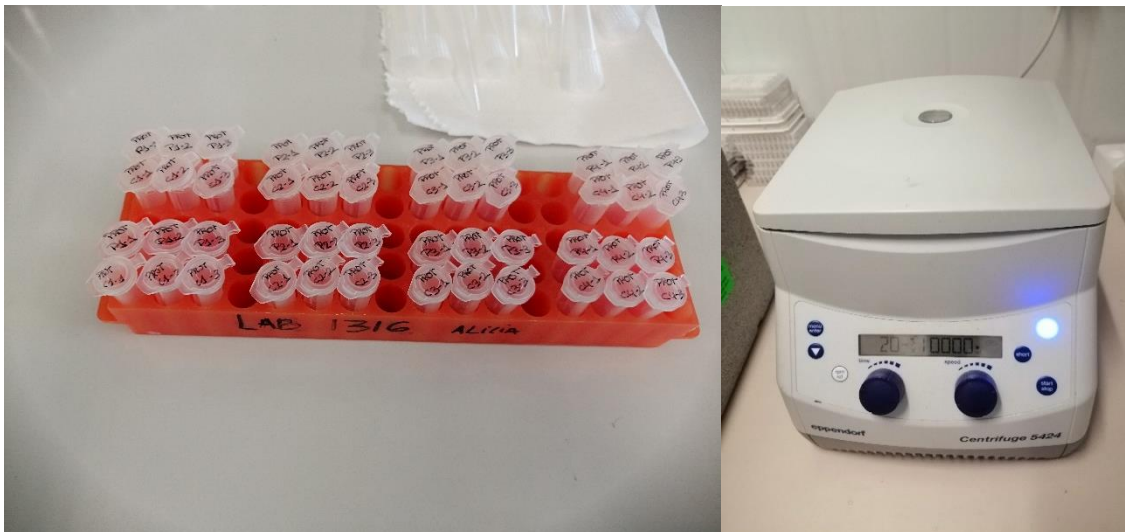
Se añadió el volumen de solución tampón (aproximadamente 1mL). Seguidamente se trituraron los tejidos mediante el uso de un Polytron VDI 12 a cada tubo (velocidad: 4.5,

30’’). Los tubos con el material estaban en un recipiente con hielo (no se podía sacar del hielo mientras se estaba homogeneizando) (Fig. 3.15).



**Figura 3-15.** Homogenización muestras con Polytron VDI 12.

Una vez homogeneizado el material vegetal se pasó todo el volumen a Eppendorfs de 1.5 mL y se centrifugaron (Centrifuge 5424) durante 20 minutos, 10000 xg de revolución y a una temperatura 4°C (Fig. 3.16). Finalizada la centrifugación se pasó el sobrenadante a otros Eppendorfs. Seguidamente se tomaron alícuotas múltiples de 10 µL para proceder al ensayo de Bradford. Se efectuaron diluciones 1/3 (20 µL muestra + 40 µL de agua purificada obtenida en un Milli-Q™ de Merck. Siempre se mantenía una temperatura de 4°C) Se utilizó un vortex para mezclar bien la dilución.



**Figura 3-16.** Muestras homogenizadas para centrifugar y Centrifuge 5424.

### 3.12.2. Ensayo de cuantificación Bradford de proteína.

El ensayo Bradford es un ensayo colorimétrico de proteínas. Se basa en un cambio de absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 en condiciones ácidas cuando se une a proteínas (Bradford, 1976).

- **Reactivos:**

Se añadió a las muestras albúmina de suero bovino (BSA) Sigma - A4503, 4°C (**Fig. 3.17**). Se prepararon reservas de 1 mg / mL. Se mezcló suavemente y se distribuyó en alícuotas en Eppendorfs y se almacenó a -20°C (**Tabla 3.7**).

**Tabla 3.7.** Estándares BSA.

| Concentración (mg/ml) | Agua purificada | Estoc (1mg/mL) vol. |
|-----------------------|-----------------|---------------------|
| 0                     | 500 µL          | 0 µL                |
| 0.02                  | 490 µL          | 10 µL               |
| 0.04                  | 480 µL          | 20 µL               |
| 0.1                   | 450 µL          | 50 µL               |
| 0.2                   | 400 µL          | 100 µL              |

- **Reactivo Bradford Sigma - B6916:**

Antes de añadir el reactivo (almacenado a 4°C) se agitó suavemente y se dejó reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente (**Fig. 3.17**). El reactivo se diluyó en una proporción de 1: 4, por ejemplo:

- 6 mL de reactivo Bradford + 24 mL de agua purificada.

Es importante tener en cuenta que el reactivo de Bradford se debe añadir a las alícuotas justo antes de hacer el ensayo.



**Figura 3-17.** Albúmina de suero bovino (BSA) Sigma - A4503 y Bradford Sigma - B6916

- **ENSAYO:**

Se diluyeron las muestras con agua purificada para ajustar la concentración de proteína entre 0,02 y 0,2 mg / mL. Para ello se mezcló 1/100 agua purificada y 1/10 de la muestra diluida. Después a cada pocillo se añadió 200 µL de reactivo de Bradford diluido. En una microplaca de 96 pocillos, agregó 10 µl de estándar (BSA) y/o muestras diluidas en el siguiente orden (**tabla 3.8, 3.9, 3.10**).

**Tabla 3.8.** Concentraciones de ajuste de proteína para el ensayo Bradford.

|   | 1          | 2             | 3             | 4            | 5            | 6            | 7           | 8           | 9           |
|---|------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| A | 0<br>mg/ml | 0.02<br>mg/ml | 0.04<br>mg/ml | 0.1<br>mg/ml | 0.2<br>mg/ml | 0.4<br>mg/ml | Sample<br>A | Sample<br>B | Sample<br>C |
| B | 0<br>mg/ml | 0.02<br>mg/ml | 0.04<br>mg/ml | 0.1<br>mg/ml | 0.2<br>mg/ml | 0.4<br>mg/ml | Sample<br>A | Sample<br>B | Sample<br>C |
| C | 0<br>mg/ml | 0.02<br>mg/ml | 0.04<br>mg/ml | 0.1<br>mg/ml | 0.2<br>mg/ml | 0.4<br>mg/ml | Sample<br>A | Sample<br>B | Sample<br>C |
| D | 0<br>mg/ml | 0.02<br>mg/ml | 0.04<br>mg/ml | 0.1<br>mg/ml | 0.2<br>mg/ml | 0.4<br>mg/ml | Sample<br>A | Sample<br>B | Sample<br>C |

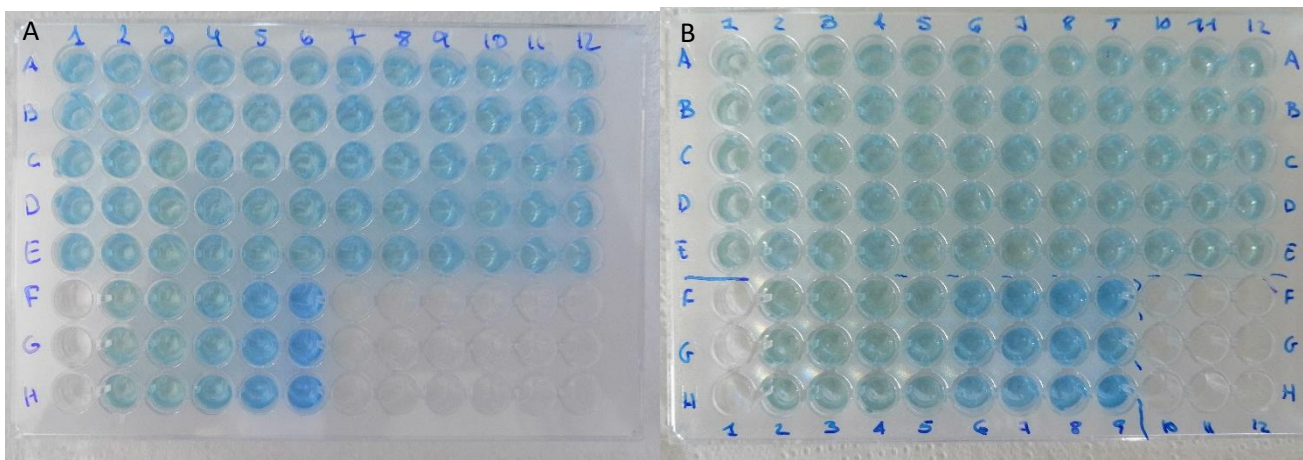
**Tabla 3.9.** Disposición en la microplaca para ensayo Bradford de agua de pozo

|   | 1    | 2      | 3         | 4         | 5        | 6        | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|---|------|--------|-----------|-----------|----------|----------|------|------|------|------|------|------|
| A | P1-1 | P1-2   | P1-3      | P2-1      | P2-2     | P2-3     | P3-1 | P3-2 | P3-3 | P4-1 | P4-2 | P4-3 |
| B | P1-1 | P1-2   | P1-3      | P2-1      | P2-2     | P2-3     | P3-1 | P3-2 | P3-3 | P4-1 | P4-2 | P4-3 |
| C | P1-1 | P1-2   | P1-3      | P2-1      | P2-2     | P2-3     | P3-1 | P3-2 | P3-3 | P4-1 | P4-2 | P4-3 |
| D | P1-1 | P1-2   | P1-3      | P2-1      | P2-2     | P2-3     | P3-1 | P3-2 | P3-3 | P4-1 | P4-2 | P4-3 |
| E | P1-1 | P1-2   | P1-3      | P2-1      | P2-2     | P2-3     | P3-1 | P3-2 | P3-3 | P4-1 | P4-2 | P4-3 |
| F | CN   | 0mg/mL | 0,02mg/mL | 0,04mg/mL | 0,1mg/mL | 0,2mg/mL |      |      |      |      |      |      |
| G | CN   | 0mg/mL | 0,02mg/mL | 0,04mg/mL | 0,1mg/mL | 0,2mg/mL |      |      |      |      |      |      |
| H | CN   | 0mg/mL | 0,02mg/mL | 0,04mg/mL | 0,1mg/mL | 0,2mg/mL |      |      |      |      |      |      |

**Tabla 3.10.** Disposición en la microplaca para el ensayo Bradford de agua de canal.

|   | 1    | 2      | 3         | 4         | 5         | 6         | 7        | 8         | 9        | 10   | 11   | 12   |
|---|------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|------|------|------|
| A | C1-1 | C1-2   | C1-3      | C2-1      | C2-2      | C2-3      | C3-1     | C3-2      | C3-3     | C4-1 | C4-2 | C4-3 |
| B | C1-1 | C1-2   | C1-3      | C2-1      | C2-2      | C2-3      | C3-1     | C3-2      | C3-3     | C4-1 | C4-2 | C4-3 |
| C | C1-1 | C1-2   | C1-3      | C2-1      | C2-2      | C2-3      | C3-1     | C3-2      | C3-3     | C4-1 | C4-2 | C4-3 |
| D | C1-1 | C1-2   | C1-3      | C2-1      | C2-2      | C2-3      | C3-1     | C3-2      | C3-3     | C4-1 | C4-2 | C4-3 |
| E | C1-1 | C1-2   | C1-3      | C2-1      | C2-2      | C2-3      | C3-1     | C3-2      | C3-3     | C4-1 | C4-2 | C4-3 |
| F | CN   | 0mg/mL | 0,01mg/mL | 0,02mg/mL | 0,04mg/mL | 0,08mg/mL | 0,1mg/mL | 0,15mg/mL | 0,2mg/mL |      |      |      |
| G | CN   | 0mg/mL | 0,01mg/mL | 0,02mg/mL | 0,04mg/mL | 0,08mg/mL | 0,1mg/mL | 0,15mg/mL | 0,2mg/mL |      |      |      |
| H | CN   | 0mg/mL | 0,01mg/mL | 0,02mg/mL | 0,04mg/mL | 0,08mg/mL | 0,1mg/mL | 0,15mg/mL | 0,2mg/mL |      |      |      |

Se incubó con agitación constante durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, el contenido de proteína soluble en el sobrenadante resultante se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm (**Figura 3.18.**).



**Figura 3-18.** Microplacas con reactivo Bradford de pozo (A) y de canal (B), para lectura de absorbancia a 595nm.



### 3.12.3. Cuantificación de proteínas.

Se extrapoló la concentración de proteína en la muestra usando la curva estándar de BSA resultante. La curva estándar se ajustó a una ecuación de línea de grado secundaria [7] y al final se multiplica el resultado por el factor de dilución utilizado en el ensayo [8]:

$$y = -2,6240x^2 + 1,3816x + 0,1246$$

$$R^2 = 0,9938$$
[7]

$$\frac{mg \text{ Protina}}{mL} = \left( \frac{-b \pm \sqrt{(b^2 - 4 * a * (c - y))}}{(2 * a)} \right) * \text{Factor dilución utilizada}$$
[8]

### 3.13. Tratamiento estadístico.

Se realizó el análisis de variancia (ANOVA) para los resultados obtenidos con la finalidad de comprobar si había diferencias significativas entre los diferentes tipos de tratamiento (**Anexo D**). Primeramente, se comprobó mediante la prueba de igualdad de variancias si se podían asumir variancias iguales o no para todas las variables estudiadas.

El análisis de la variancia tenía un nivel de significancia del 5 %. Cuando se detectaban diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) se llevó a cabo la respectiva prueba que agrupaba los resultados según las similitudes.

En caso de asumir variancias iguales se realizó ANOVA y su correspondiente separador de medias Tukey, en caso de no poder asumir variancias iguales (al menos una variancia era distinta) se realizó la prueba de Welch-ANOVA y su correspondiente separador de medias Games-Howell.

Se realizó un análisis de los componentes principales (PCA), para las variables correspondientes al crecimiento del cultivo (peso fresco y peso seco) y las variables químicas (contenido clorofílico,

nitratos, carbohidratos y lípidos, y proteínas) y también para los resultados del registro con la finalidad de buscar la creación de grupos a partir de los datos obtenidos.

El tratamiento estadístico se realizó con el programa Minitab 18 para Windows.

**RESULTADOS**

---

## 4. Resultados

### 4.1. Número total de hojas y longitud de hoja más larga.

La recogida de los datos de la evolución del número de hojas, y de la longitud de la hoja más larga, se ha llevado a cabo como se explica en el apartado 3.7. de esta memoria.

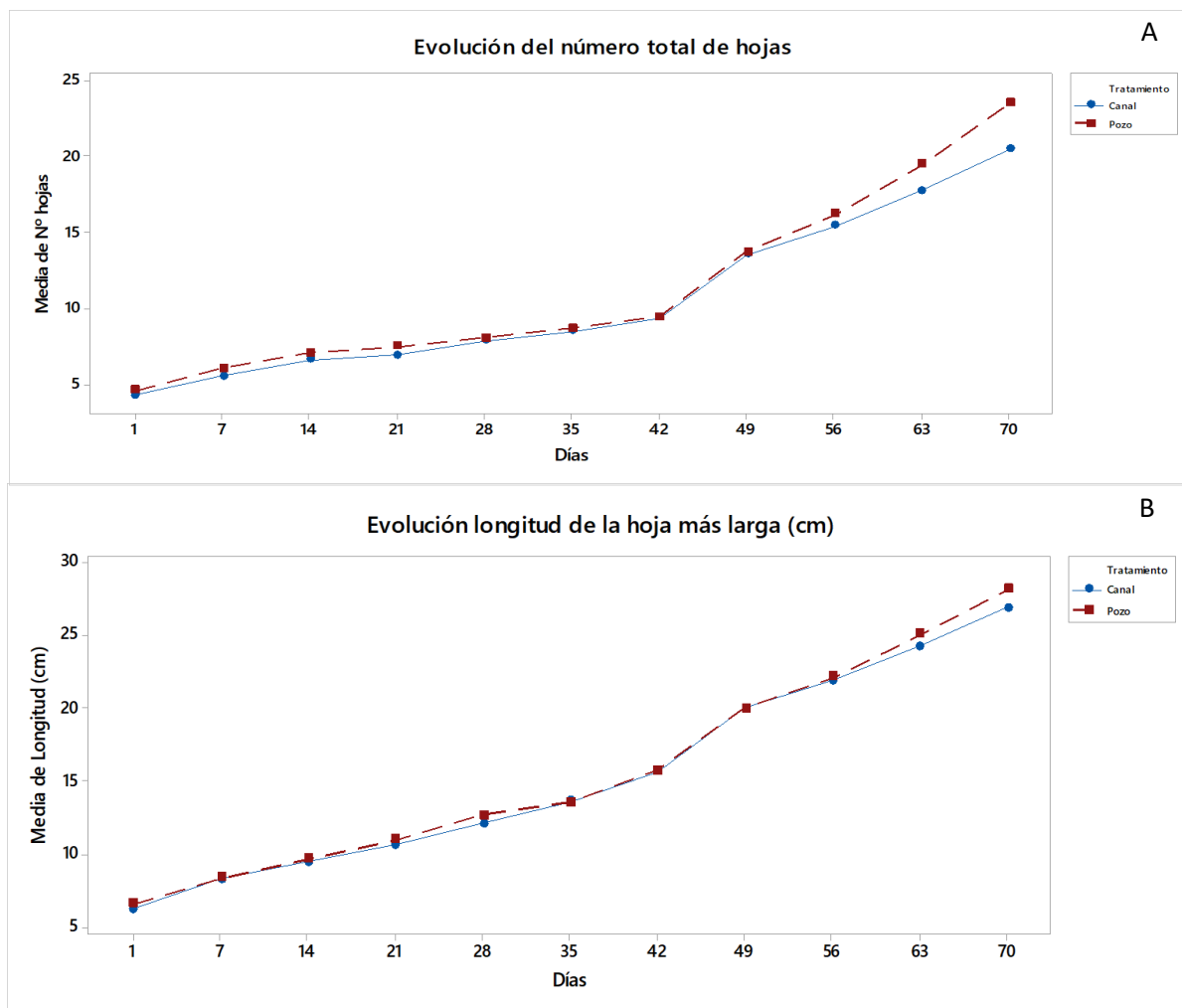
Se ha realizado el análisis estadístico de los resultados obtenidos durante todo el período de control. No hay diferencias significativas entre tratamientos para las variables analizadas (número de hojas y longitud de la hoja más larga) ( $p$ -valor  $\geq 0,05$ ) (**Tabla 4-1.**).

La **figura 4-1. A.** muestra la evolución del número de hojas, se puede ver como a partir del séptimo control, a partir del día 42 de cultivo, aparentemente hay una cierta diferenciación en los tratamientos, ya que aparecen un mayor número de hojas, esto es debido a que a partir de ese día empezaron a aparecer brotes en las bases de las lechugas, seguramente por efecto de un aumento de las temperaturas diurnas.

**Tabla 4.1.** Número total de hojas y longitud de la hoja más larga en cultivo de lechuga, según tratamiento aplicado (pozo y canal)

| Tratamiento | Número total de hojas         | Longitud de la hoja más larga (cm) |
|-------------|-------------------------------|------------------------------------|
| POZO        | 11,27 $\pm$ 6,09 <sup>a</sup> | 15,68 $\pm$ 7,13 <sup>a</sup>      |
| CANAL       | 10,55 $\pm$ 5,37 <sup>a</sup> | 15,33 $\pm$ 6,91 <sup>a</sup>      |

*Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.*



**Figura 4-1.** Evolución del número total de hojas (A) y longitud de hoja más larga (B), en el cultivo de lechuga, según el tratamiento aplicado (pozo y canal).

En la **figura 4-2.** se presenta la representación gráfica de las variables de número de hojas y longitud de la hoja más larga correspondientes al último día de control. Referente al número total de hojas, se observa, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos, que la dispersión de los datos para los dos tipos de agua es ligeramente diferente. (**Fig. 4-2. A.**).

En contrapartida, los resultados referentes a la variable longitud de la hoja más larga indican que las plantas que fueron regadas con agua de canal y pozo presentan una mayor dispersión de los datos, siendo similar entre los dos tipos de agua. (**Fig. 4-2. B.**)

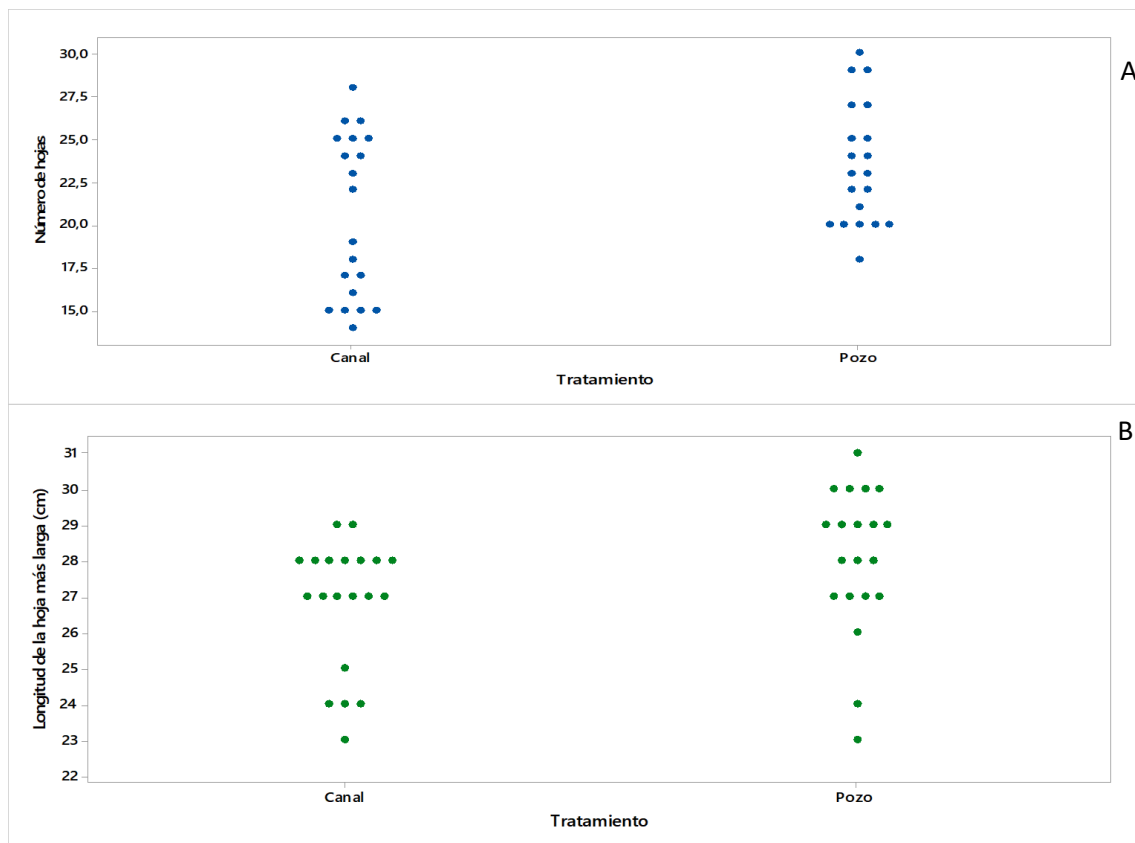


Figura 4-2. Diagrama de valores individuales del número total de hojas (A) y longitud de hoja más larga (B), en el cultivo de lechuga, según el tratamiento aplicado (pozo y canal).

## 4.2. Biomasa

La biomasa de las lechugas corresponde a la gravimetría realizada con la parte aérea de las plantas.

En la **tabla 4-2.** se recogen los valores promedio y las desviaciones estándar de los resultados de las variables, peso fresco, peso seco y el porcentaje de contenido hídrico.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos del pesaje de la biomasa fresca y de la seca y el cálculo de contenido hídrico (apartado 3.8.) muestra que la prueba ANOVA no hay diferencias significativas ( $p$ -valor  $\geq 0,05$ ) (**Tabla 4-2.**).

A continuación, se evalúan y destacan los principales resultados de la comparación de los distintos tratamientos respecto a las diferentes variables analizadas: peso fresco, peso seco y porcentaje del contenido hídrico.

#### **4.2.1. Peso fresco**

En la **tabla 4-2.** se refleja que el tratamiento que ha producido, mayor biomasa fresca es el de agua de pozo, seguido del tratamiento de agua de canal, aunque no se observan diferencias significativas entre estos dos tratamientos. Se puede destacar de la **figura 4-3. A.** que el tratamiento de agua de pozo y de canal presenta valores con muy poca asimetría.

#### **4.2.2. Peso seco**

El análisis estadístico de los datos de peso seco (**Tabla 4-2.**) nos indica que las plantas que han obtenido mayor contenido de biomasa seca son las que fueron regadas con los tratamientos de agua de pozo (aunque entre ellas no presentan diferencias significativas), al contrario que las plantas regadas con agua de canal que han obtenido menor biomasa seca, siendo sus medias muy similares y tampoco presentando diferencias significativas entre ellas.

Cabe remarcar que las plantas que han presentado un menor peso seco, aunque sin diferencias significativas con el tratamiento de canal, análogamente a la variable peso fresco.

Se puede observar en la **figura 4-3. B.**, que todos los valores referentes al peso seco presentan asimetría, asimismo siendo referente el agua de pozo el que presenta una mayor dispersión de los datos.

#### **4.2.3. Contenido hídrico.**

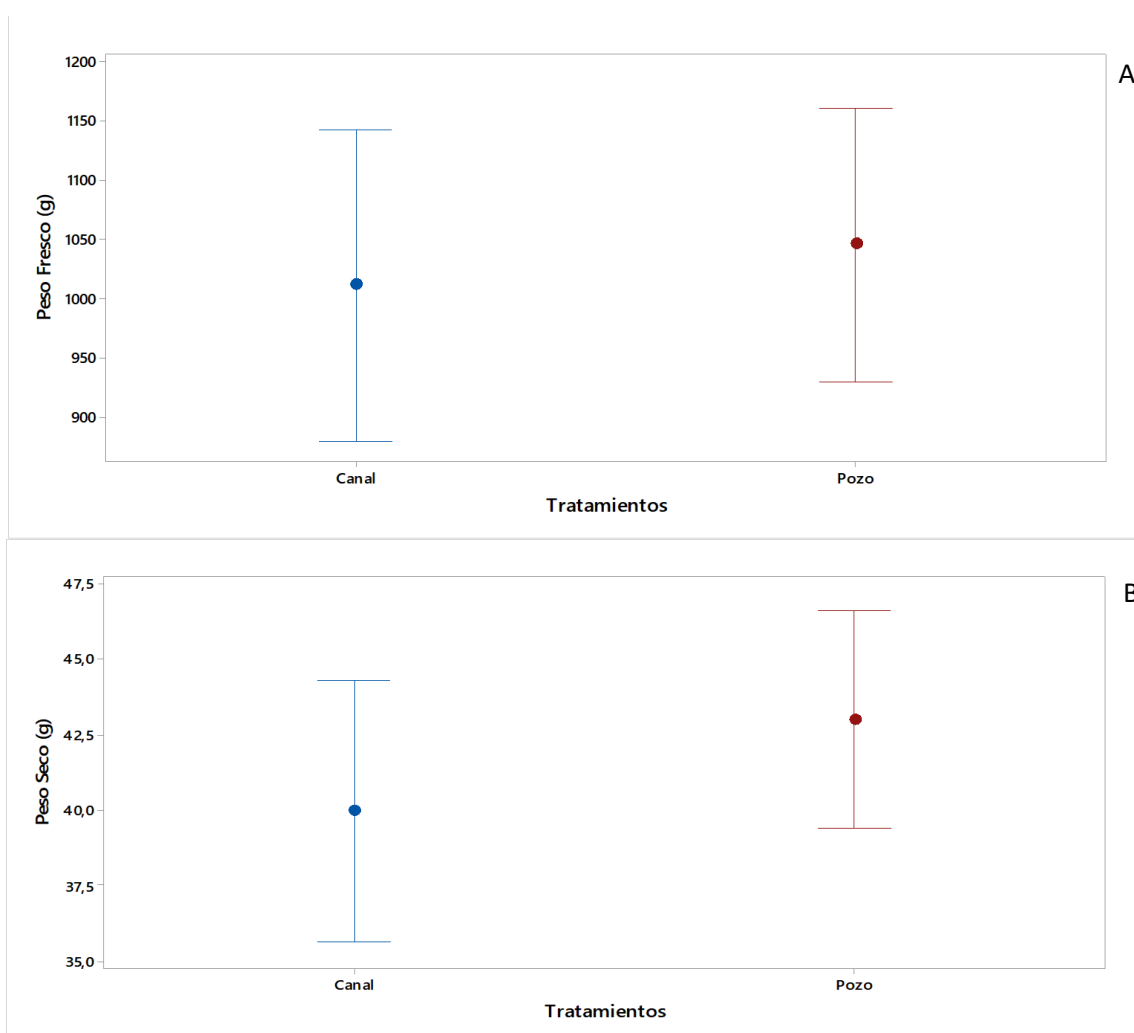
El porcentaje de contenido hídrico no presentan diferencias significativas entre ellos, siendo sus valores promedios muy similares, alrededor del 95 % (**Tabla 4-2.**).

En la **figura 4-3. C.** se observa que los tratamientos de agua de pozo presentan un valor atípico por debajo de la media y el de agua de canal por encima de la media. El tratamiento de agua de pozo muestra una mayor dispersión y asimetría de los datos que el resto de los tratamientos.

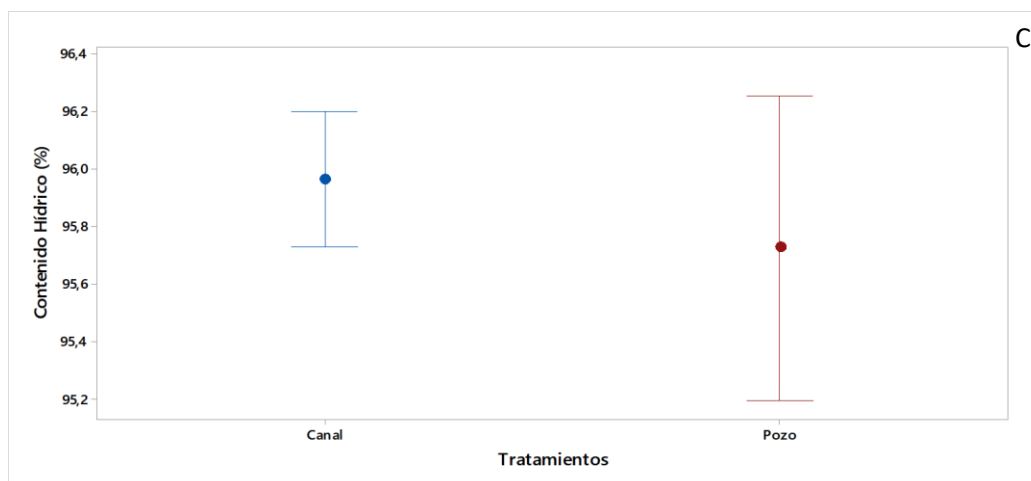
**Tabla 4.2.** Biomasa final y contenido hídrico en lechuga, según el tratamiento aplicado (agua de pozo y agua de canal).

| Tratamiento | Peso fresco (g)             | Peso seco (g)             | Contenido hídrico (%)       |
|-------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| POZO        | 1045,6 ± 247,4 <sup>a</sup> | 43,02 ± 7,69 <sup>a</sup> | 95,757 ± 1,131 <sup>a</sup> |
| CANAL       | 1010,8 ± 280,6 <sup>a</sup> | 39,96 ± 9,28 <sup>a</sup> | 95,966 ± 0,506 <sup>a</sup> |

Los datos se expresan como promedio ± DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey (peso fresco, peso seco y contenido hídrico), con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.







**Figura 4-3.** Diagrama de caja de peso fresco (A), peso seco(B) y del contenido hídrico (C) en lechuga, según tratamiento el tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal.)

### 4.3. Contenido clorofílico.

#### 4.3.1. Determinación del contenido total en clorofilas según el tratamiento.

Las lecturas obtenidas con el CCM se han transformado con las ecuaciones obtenidas por Nadal (2015) para la misma variedad de lechuga y así poder obtener la concentración de clorofila a, b y total. Los resultados promedio junto con las desviaciones estándar se encuentran recogidos en la **tabla 4-3**.

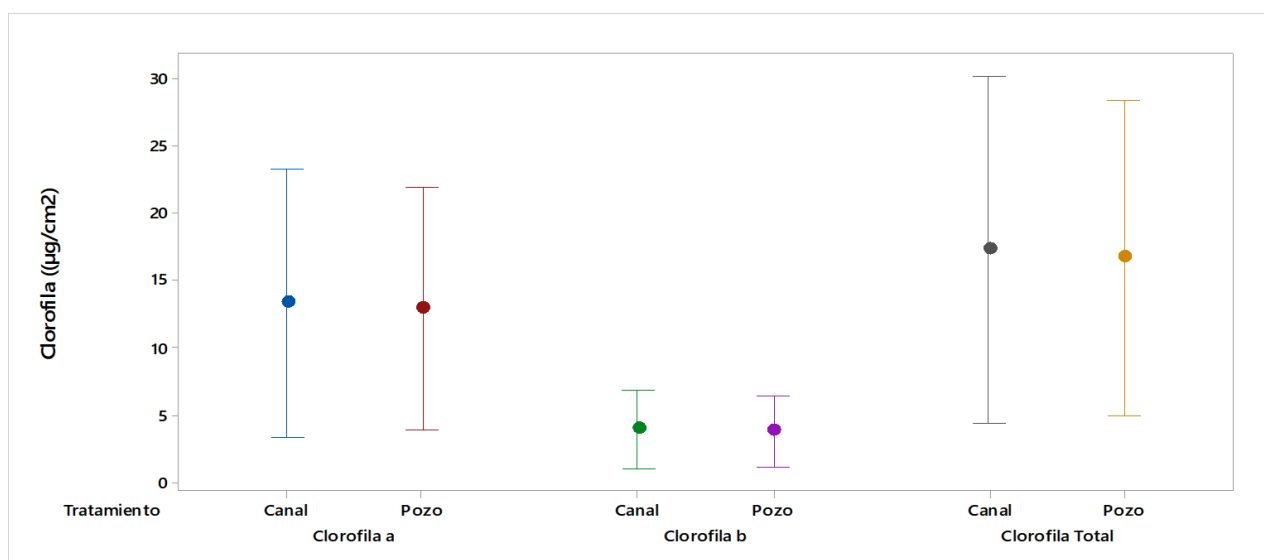
La prueba de ANOVA revela que no que hay diferencias significativas entre tratamientos para los dos tipos de clorofilas y para la clorofila total ( $p\text{-valor} \geq 0,05$ ). Las plantas que fueron regadas con agua de pozo y canal no presentan diferencias significativas entre ellas. Se puede ver que las plantas que presentan una menor concentración, aunque sin presentar diferencias con algunos tratamientos, son las de pozo.

En la **figura 4-4**. se observa que las plantas regadas con agua de pozo y de canal no presentan una asimetría en el contenido de clorofilas entre ellas, siendo el tratamiento de pozo el que presenta una mayor dispersión. También se puede observar que los tratamientos presentan una simetría en todos los casos.

**Tabla 4.3.** Contenido total de clorofilas en lechugas, según el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

| Tratamiento | Clorofila a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) | Clorofila b ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) | Clorofila total ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|-------------|---|---|---|
| POZO        | $12,94 \pm 10,44^a$                       | $3,810 \pm 3,016^a$                       | $16,75 \pm 13,46^a$                           |
| CANAL       | $13,35 \pm 1,142^a$                       | $3,930 \pm 3,300^a$                       | $17,28 \pm 14,72^a$                           |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.



**Figura 4-4.** Diagrama de caja del contenido de clorofila a, b y total en lechuga, según el tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal).

#### 4.3.2. Determinación del contenido en clorofilas según la posición de la hoja.

El análisis descriptivo global de las variables clorofila a, b y total, frente a la posición que ocupaba en la planta y tratamiento con el que había sido regada se presenta en la **figura 4-5**. Se puede observar que hay diferencias significativas según la posición de la hoja (exterior e interior) en la planta ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ).

Las hojas que estaban dispuestas en el exterior de la planta presentan, para todos los tipos de clorofilas, unos valores de concentración significativamente superiores a la otra posición de hoja. Las hojas situadas en el nivel interior son las que presentan una menor concentración de estos pigmentos. (Tablas 4-4., 4-5., 4-6.).

En el caso de las plantas tratadas con agua de canal, se presentan valores atípicos, por encima de la media y para cada tipo de clorofila en interior. (Fig. 4-5. A,B,C.).

**Tabla 4.4.** Contenido de clorofila *a*, según posición de la hoja de la lechuga y tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

| Posición | Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                       |
|----------|--|---------------------------------------|
|          | Pozo   | Canal                                 |
| Exterior | 0,023033 $\pm$ 0,002754 <sup>a</sup>             | 0,0024497 $\pm$ 0,002234 <sup>a</sup> |
| Interior | 0,002839 $\pm$ 0,001220 <sup>b</sup>             | 0,002201 $\pm$ 0,001087 <sup>b</sup>  |

*Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey y Games Howell, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.*

**Tabla 4.5.** Contenido de clorofila *b*, según la posición de la hoja de la lechuga y el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

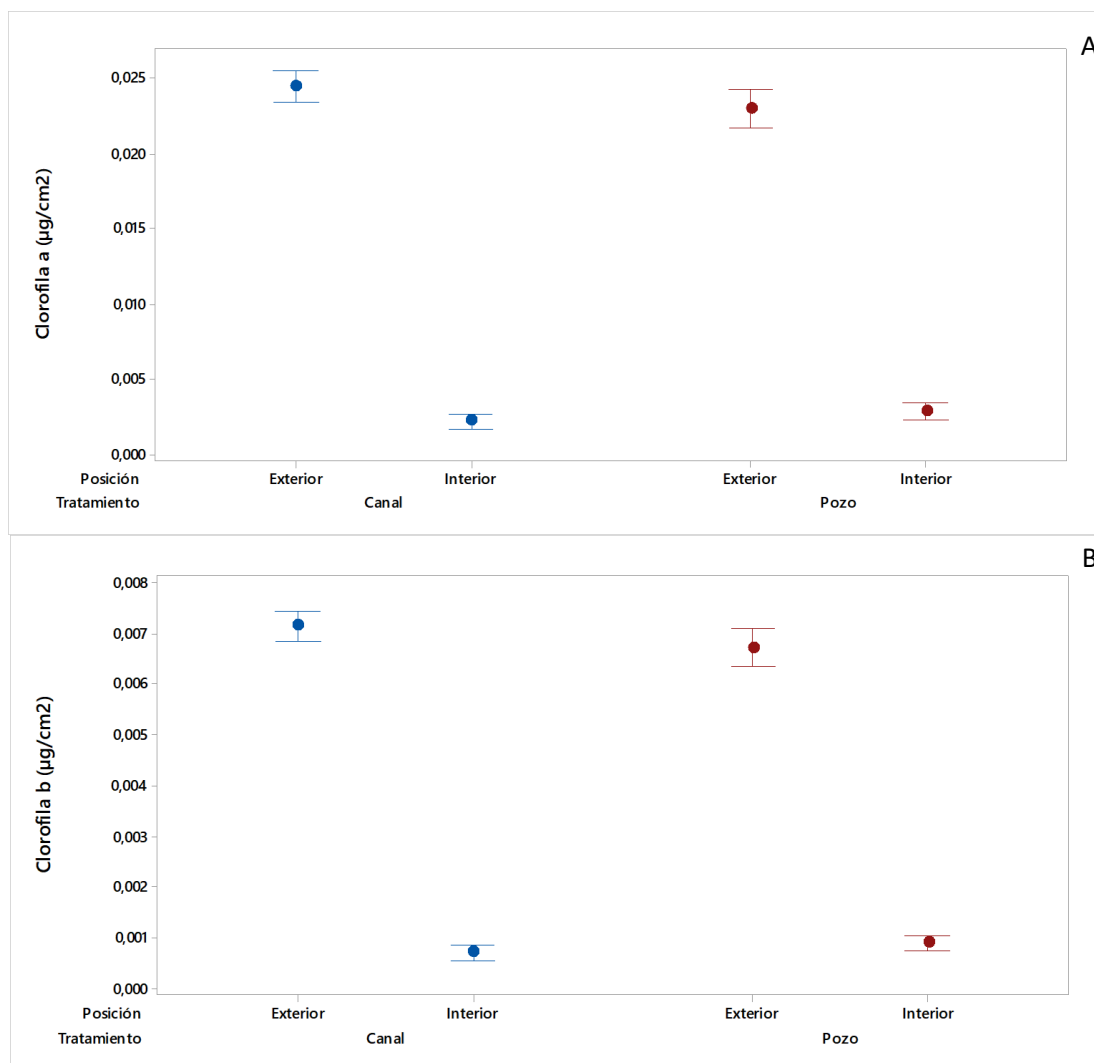
| Posición | Clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                      |
|----------|--|--------------------------------------|
|          | Pozo   | Canal                                |
| Exterior | 0,006727 $\pm$ 0,000795 <sup>a</sup>             | 0,007150 $\pm$ 0,000645 <sup>a</sup> |
| Interior | 0,000893 $\pm$ 0,000352 <sup>b</sup>             | 0,000709 $\pm$ 0,000314 <sup>b</sup> |

*Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey y Games Howell, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.*

**Tabla 4.6.** Contenido de clorofila total, según la posición de la lechuga y el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

| Clorofila total ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                           |                           |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Posición                                      | Pozo                      | Canal                     |
| Exterior                                      | $0,029761 \pm 0,003549^a$ | $0,031647 \pm 0,002879^a$ |
| Interior                                      | $0,003732 \pm 0,001573^b$ | $0,002910 \pm 0,001401^b$ |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey y Games Howell, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes





**Figura 4-5.** Diagrama de caja del contenido de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) y clorofila total (C), según posición de hoja de lechuga y el tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal).

#### 4.3.3. Determinación del contenido en clorofilas según la posición de la hoja entre tratamientos.

En la **figura 4-6.** podemos ver la distribución de los resultados de los contenidos en clorofilas (*a*, *b* y total) para cada una de las posiciones de hoja y los tratamientos aplicados. Se puede observar que las gráficas A, B y C de dicha figura presentan la misma distribución a pesar de que las concentraciones sean diferentes.

El análisis estadístico realizado para cada uno de los tipos diferentes de clorofilas muestra que para la posición exterior, la concentración de este pigmento es superior a la del resto de posiciones, siendo las plantas regadas con agua de pozo, las que obtienen un valor promedio más elevado para el tipo de clorofila *a*, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos.

Los resultados expuestos en la **tabla 4-7., 4-8., 4-9.** señalan que, entre tratamientos, no existen diferencias significativas en los contenidos clorofílicos de las hojas interiores ni exteriores ( $p$ -valor  $\geq 0,05$ ). Las hojas exteriores obtenidas de las plantas regadas con agua de canal presentan unos contenidos de clorofila *b* y totales superiores al tratamiento de pozo.

**Tabla 4.7.** Contenido de clorofila *a* según posición de la hoja de lechuga entre los tratamientos aplicados. (agua de pozo y agua de canal)

| Tratamiento | Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                      |
|-------------|--|--------------------------------------|
|             | Exterior   | Interior                             |
| Pozo        | 0,023033 $\pm$ 0,002754 <sup>a</sup>             | 0,002839 $\pm$ 0,001220 <sup>a</sup> |
| Canal       | 0,0024497 $\pm$ 0,002234 <sup>a</sup>            | 0,002201 $\pm$ 0,001087 <sup>a</sup> |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.

**Tabla 4.8.** Contenido de clorofila *b*, según posición de la hoja de lechuga entre los tratamientos aplicados. (agua de pozo y agua de canal).

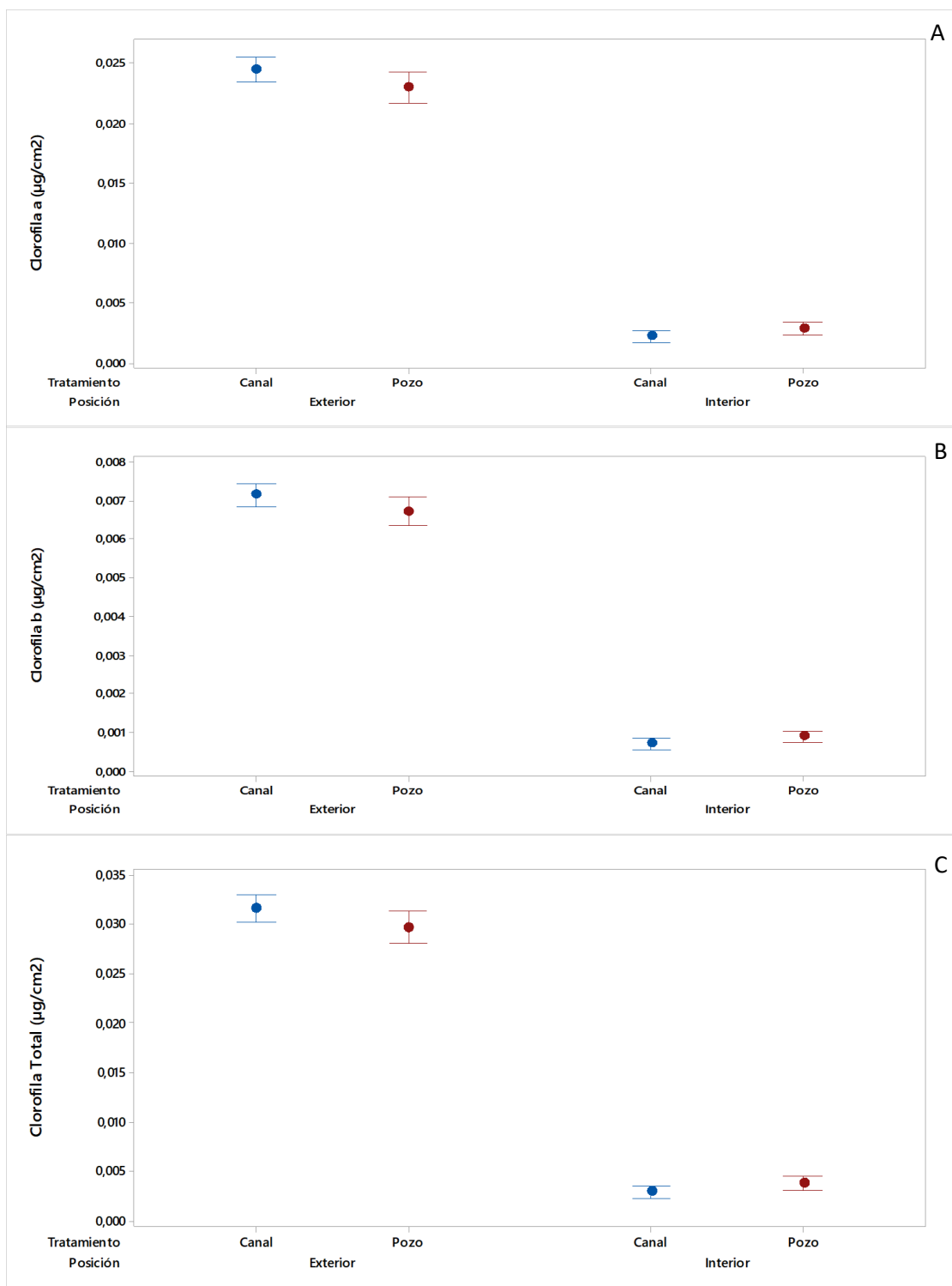
| Tratamiento | Clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                      |
|-------------|--|--------------------------------------|
|             | Exterior   | Interior                             |
| Pozo        | 0,006727 $\pm$ 0,000795 <sup>a</sup>             | 0,000893 $\pm$ 0,000352 <sup>a</sup> |
| Canal       | 0,007150 $\pm$ 0,000645 <sup>a</sup>             | 0,000709 $\pm$ 0,000314 <sup>a</sup> |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes

**Tabla 4.9.** Contenido de clorofila total, según posición de la hoja de lechuga entre los tratamientos aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

| Tratamiento | Clorofila total ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                      |
|-------------|---|--------------------------------------|
|             | Exterior                                      | Interior                             |
| Pozo        | 0,029761 $\pm$ 0,003549 <sup>a</sup>          | 0,003732 $\pm$ 0,001401 <sup>a</sup> |
| Canal       | 0,031647 $\pm$ 0,002879 <sup>a</sup>          | 0,002910 $\pm$ 0,001401 <sup>a</sup> |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes



**Figura 4-6.** Diagrama de caja del contenido de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) y clorofila total (C), según posición de lechuga entre tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal).

#### 4.4. Contenido nitratos.

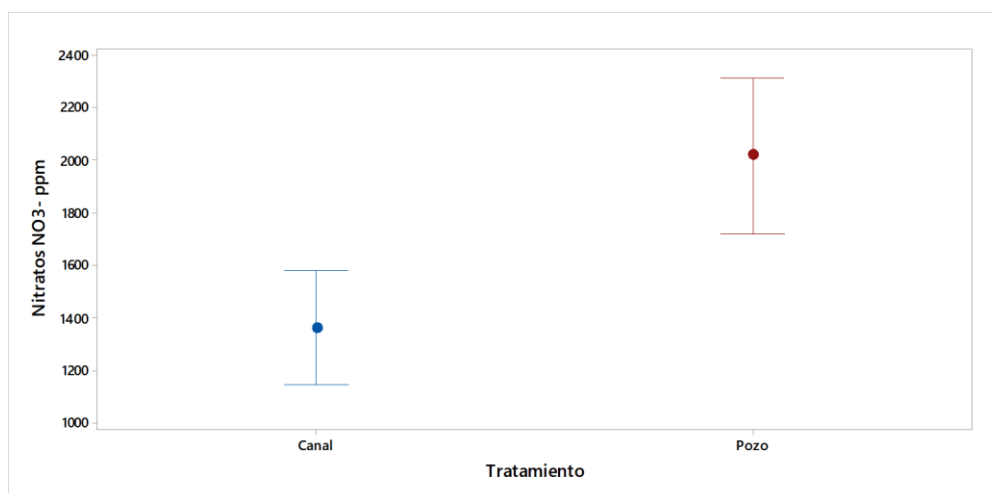
En la **tabla 4.10** se pueden ver los valores promedios y desviaciones estándares del contenido de nitratos presentes en los dos tratamientos. En el análisis estadístico de los resultados de esta variable se puede apreciar que hay diferencias significativas en su contenido ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ). Referente al tratamiento con agua de pozo fueron las que contenían más concentración de nitratos.

En la **figura 4.7** se puede ver la distribución del contenido de nitratos para cada tratamiento, se observa que hay diferencias significativas entre el tratamiento de pozo y canal. El contenido de nitratos en el tratamiento de pozo es mayor que en la de canal.

**Tabla 4.10.** Contenido de nitratos en lechugas, según el tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

| Tratamiento | Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ , mg/Kg P.F) |
|-------------|---|
| POZO        | 2020 $\pm$ 416 <sup>b</sup>             |
| CANAL       | 1361,0 $\pm$ 304,6 <sup>a</sup>         |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey y de Games-Howell, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.



**Figura 4-7.** Contenido de nitratos en lechuga, según tratamiento aplicado, con un nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal).



## 4.5. Contenido de carbohidratos y lípidos.

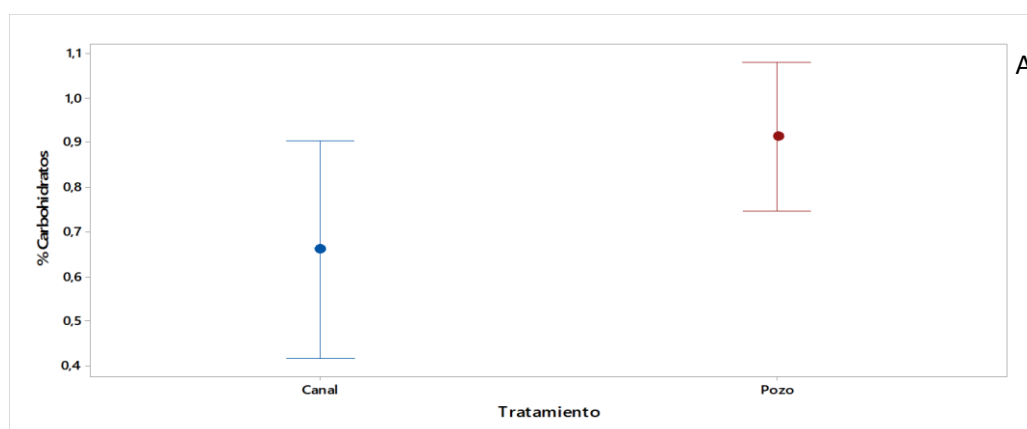
En la **tabla 4-11** podemos observar los resultados de los valores promedios y las desviaciones estándares del contenido en carbohidratos y lípidos según el tipo de tratamiento aplicado. En el análisis estadístico de los resultados de estas dos variables se puede apreciar que no hay diferencias significativas en su contenido ( $p$ -valor  $\geq 0,05$ ). Referente a los carbohidratos, las plantas que fueron regadas con agua de pozo fueron las que acumularon mayores concentraciones. No obstante, dichos valores no son significativamente distintos de los presentados por las plantas regadas con agua de canal. (**Tabla 4-11** y **Fig. 4-8**).

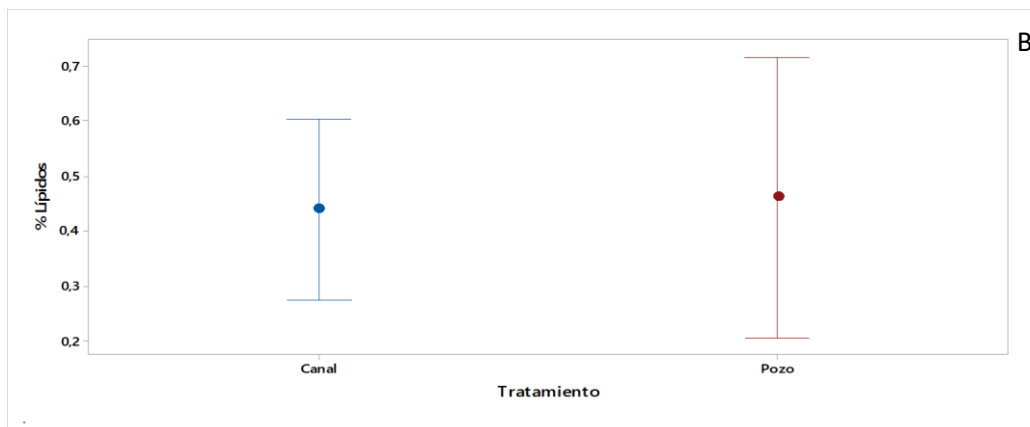
De igual manera, el análisis estadístico realizado con el porcentaje de contenido en lípidos muestra como el tratamiento de pozo ha sido el que ha generado la concentración más elevada de lípidos, pero dicho resultado no se diferencia del presentado por las plantas tratadas con canal. (**Tabla 4-11** y **Fig. 4-8**).

**Tabla 4.11.** Contenido de carbohidratos y lípidos en lechuga, según tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal)

| Tratamiento | % Carbohidratos                  | % Lípidos                        |
|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| POZO        | 0,9136 $\pm$ 0,2609 <sup>a</sup> | 0,462 $\pm$ 0,402 <sup>a</sup>   |
| CANAL       | 0,662 $\pm$ 0,385 <sup>a</sup>   | 0,4402 $\pm$ 0,2582 <sup>a</sup> |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes.

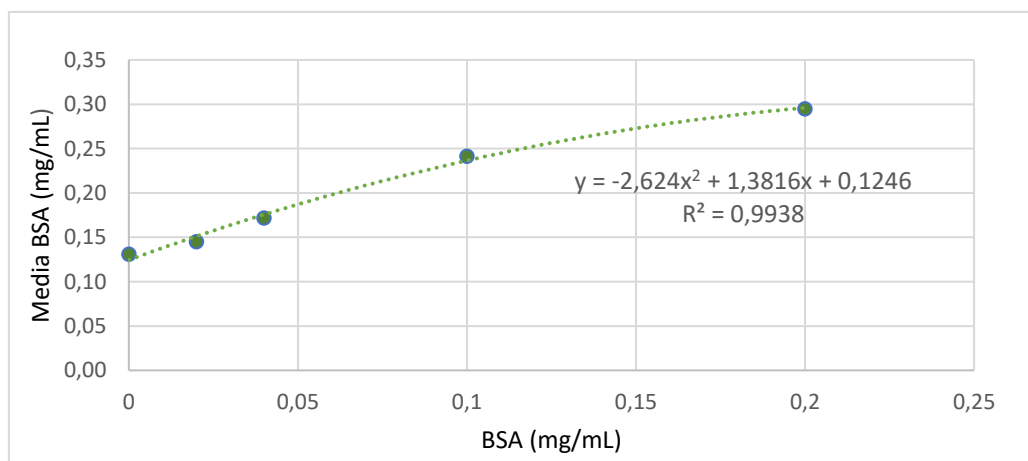




**Figura 4-8.** Diagrama de intervalos del porcentaje de contenido en carbohidratos (A) y lípidos (B) en lechuga, según el tratamiento aplicado, con el nivel de significancia del 5%. (agua de pozo y agua de canal).

#### 4.6. Contenido de proteínas.

Para conocer el contenido de proteínas en la lechuga, se efectuó el ensayo de Bradford de las diferentes muestras de los dos tratamientos de nuestro ensayo, para conseguir la gráfica de BSA con la ecuación de segundo grado se utilizó los datos obtenidos de la recta de BSA. (Figura 4.9.).



**Figura 4-9.** Gráfica de recta resultante de BSA para determinar ecuación de segundo grado

La línea de tendencia obtenida a partir de la gráfica realizada (Fig. 4.9 y 4.10) presentaba un elevado coeficiente de determinación ( $R^2$ ), del valor de 0,9938. Como consecuencia de este elevado

coeficiente de determinación fue posible evaluar posteriormente el contenido de proteína de las muestras de lechuga.

$$y = -2,6240x^2 + 1,3816x + 0,1246$$

$$R^2 = 0,9938$$

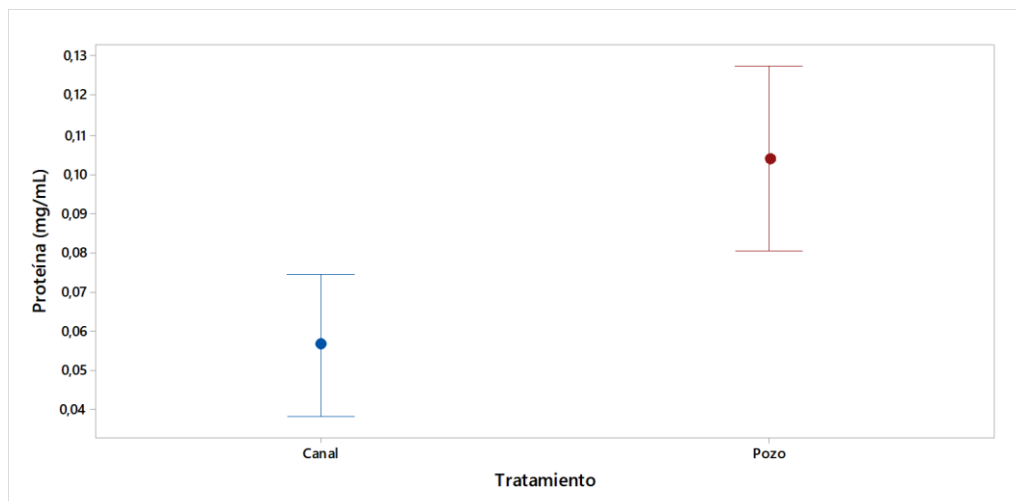
**Figura 4-10.** Línea de tendencia obtenida a partir de la recta resultante de BSA.

En la **tabla 4-12**, podemos observar los resultados de los valores promedios y las desviaciones estándares del contenido en proteínas según el tipo de tratamiento aplicado. En el análisis estadístico de los resultados de estas dos variables se puede apreciar que hay diferencias significativas en su contenido ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ). Las plantas que fueron regadas con agua de pozo fueron las que acumularon mayores concentraciones. (**Tabla 4-12** y **Fig. 4-11**).

**Tabla 4.12.** Contenido de proteínas en lechuga, según tratamiento aplicado (agua de pozo y agua de canal).

| Tratamiento | Proteínas (mg/mL)                  |
|-------------|------------------------------------|
| POZO        | 0,10380 $\pm$ 0,0371 <sup>a</sup>  |
| CANAL       | 0,05648 $\pm$ 0,02845 <sup>b</sup> |

*Los datos se expresan como promedio  $\pm$  DE. Las letras en superíndice muestran la información de agrupación, utilizando el método de Tukey y de Games-Howell, con un nivel de significancia del 5%. Los promedios que contienen la misma letra no son significativamente diferentes*



**Figura 4-11.** Diagrama de intervalos del contenido de proteínas en lechuga, según tratamiento aplicado. (agua de pozo y agua de canal).

**DISCUSIÓN**

---

## 5. Discusión

### 5.1. Biomasa

Los valores de biomasa fresca y seca (parte aérea) obtenidos en este ensayo (primera campaña de cultivo, invierno-primavera) no han estado afectados por la calidad del agua de riego, ya que las plantas de lechuga presentan el mismo número de hojas y de igual longitud. Según Maas et al. (1986) y Ayers y Westcot, (1994) la lechuga es un cultivo moderadamente sensible a la salinidad y puede desarrollarse en suelos sin que se vea afectado su rendimiento siempre que la conductividad eléctrica no sobrepase los 1,4 dS/m (determinado en extracto de pasta saturada). En nuestro ensayo, a pesar de que el agua de la corredora C-33 puede clasificarse como un agua de restricción severa para riego, ya que contiene más de 3 dS/m, el cultivo se ha desarrollado en un suelo que presenta una baja salinidad (0,19 dS/m en extracto 1:5 equivalente a 0,85 en extracto de pasta saturada). Hay que tener en cuenta que el número de riegos ha sido reducido, como consecuencia de las lluvias, las cuales han tenido un efecto de dilución de concentración de las sales en la fracción líquida del suelo. Esto ha facilitado que el suelo no incrementara su salinidad y no afectara al desarrollo de la plantación. Cuando la fracción líquida del suelo contiene un exceso de sales puede causar problemas en la estructura del suelo, disminuir su permeabilidad y reducir el rendimiento del cultivo (Lax et al., 1994; Kohler et al., 2009).

Los resultados son similares, aunque algo superiores, a los obtenidos por Margenat et al, (2017) en cultivo de primavera y para la misma variedad. En cambio, tanto los pesos frescos y secos obtenidos fueron superiores a los obtenidos para la misma variedad por Grech (2020) en cultivo de invierno y Alvarado (2020) en cultivo de primavera. Hay que tener en cuenta que la biomasa depende mucho del número de días del ciclo agrícola de cultivo, es decir, de la cantidad de grados-día acumulados. En nuestro caso, debemos comentar que la cosecha, se realizó con algún día de retraso, lo que favoreció un ligero incremento del peso estándar de cosecha, como consecuencia del desarrollo de algún brote axilar.

## 5.2. Contenido de clorofilas

La calidad de las aguas de riego utilizadas no ha repercutido en la formación de clorofilas, ya que no se han detectado diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados se ajustan (clorofila a y b) a los cuantificados por Nadal, (2015), Jaray (2019), Grech (2020) y Perdomo (2020) para el mismo cultivar de lechuga, pero por lo que respecta a la clorofila b los valores obtenidos en nuestro ensayo son inferiores a los presentados por Alvarado (2020). Seguramente esta reducción puede ser atribuida a que el cultivo de Alvarado se desarrolló en condiciones de día más largo, lo que favoreció, en su caso, una mayor biosíntesis de clorofila b y una reducción en la relación clorofila a/b (Björkman et al.,1972; Larsson et al., 1987 y Pattanayak et al.,2005).

Como era de esperar si se produjeron diferencias significativas entre los contenidos clorofílicos según la posición de las hojas (exteriores o interiores). Las hojas interiores están agrupadas en esta variedad de lechuga en forma de cogollo lo que dificulta su exposición a la luz a la vez reduce la difusión de CO<sub>2</sub>. Estas condiciones favorecen una menor actividad fotosintética debido a una menor actividad de la nitrato reductasa (Ruiz y Azcón, 1996) (Matt et al., 2001) ya descrita en el cultivo de lechuga por Raigón et al., (2006).

Tal como ya se ha justificado en el apartado anterior (apartado 5.1), al tratarse de un cultivo de ciclo corto y desarrollarse en un suelo sin problemas iniciales de salinidad, no ha afectado a la concentración de clorofilas. En suelos salinos se produce una disminución en la formación de clorofilas en los cultivos (Sheng et al., 2008) debido a la inhibición de los enzimas vinculados a la síntesis de clorofila (Murkute et al., 2006).

## 5.3. Contenido nitratos

Las especies vegetales suelen asimilar el nitrógeno en forma de nitrato en cantidades importantes, siempre y cuando haya disposición de este macroelemento en el suelo (Baker and Mills, 1980; Colla et al., 2010, 2011). En muchos cultivos hortícolas, como es el caso de las lechugas, las mayores concentraciones se acumulan en las hojas (Maynard et al.,1976; Santamaria et al., 2006).

Según Du et al. (2007) las concentraciones estándares de nitratos en lechuga están comprendidas entre 123 y 2678 mg/Kg P.F, mientras que para Santamaria (2006) suelen sobrepasar los 2500

mg/Kg P.F. En nuestro caso, para ninguno de los dos tratamientos se han superado dichos valores. Además, son muy similares a los obtenidos por Margenat et al. (2018) en la misma variedad de lechuga. En ningún caso se ha producido un exceso de acumulación que pueda representar un peligro para la salud humana. Los límites máximos establecidos por la Unión Europea son de 3000 mg/Kg P.F, para cultivo de verano y de 4000 mg/Kg P.F, para cultivo de invierno (Reglamento CE N°1258/2011). Además, según Sánchez (2010) se puede una ingesta diaria de nitratos hasta 3,65 mg/Kg peso vivo sería admisible. Los nitratos son poco tóxicos para la salud humana tan solo el 5% de los nitratos ingeridos se transforman en nitritos, Socaciu (2007).

Curiosamente, las lechugas irrigadas con agua de canal han acumulado una menor concentración de nitratos que las irrigadas con agua de pozo. No existe razón alguna que justifique estas diferencias, ya que la biomasa y los contenidos clorofílicos de ambos tratamientos no presentaron diferencias significativas, y las condiciones de cultivo fueron las mismas, a excepción de que el agua de pozo presentaba 3,25 mg/L y la de canal 4,45 mg/L de nitratos. En principio, a mayor cantidad de nitratos aportado, mayor acumulación de nitratos en hoja de lechuga (Rincón, 2005). Lo más coherente habría sido obtener valores algo superiores (significativos o no) en las plantas irrigadas con agua de canal, pero contrariamente no ha sido así. Creemos que las determinaciones han sido correctas ya que estos resultados siguen la misma pauta que los obtenidos en la síntesis de proteínas (apartados 4.6 y 5.4). Esto nos hace suponer que alguno de los xenobióticos presentes en el agua de canal interfiere en la disponibilidad o en la acumulación de nitratos.

#### **5.4. Contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas.**

Nuestros resultados no indican diferencias significativas entre tratamientos en la cantidad de carbohidratos y lípidos sintetizados. El hecho de que el agua de canal transporte xenobióticos no ha afectado en dicha síntesis.

Knecht y O'Leary (1983) indican que a mayor grado de maduración de un cultivo de lechuga mayor acumulación de carbohidratos, probablemente por este motivo, en nuestro ensayo valores determinados de esta macromolécula son superiores a los cuantificados en otros ensayos (Jaray, 2019; Alvarado, 2020; Grech, 2020).



Frame y Laidlaw (1992) indican que las cantidades sintetizadas de lípidos suelen ser de poca cuantía en las plantas. Son numerosas las referencias bibliográficas donde se indica que son diversos los factores ambientales relacionados con la formación de lípidos (Munnik, 1998, 2001; Meijer et al., 1999; Bavaro, 2007; Zhang et al., 2016). La síntesis de lípidos de nuestro ensayo ha resultado algo más elevada que la obtenida por otros autores (Jaray, 2019; Alvarado, 2020; Grech, 2020; Perdomo, 2020). Seguramente, esta mayor acumulación pueda relacionarse con un cierto retraso de nuestra cosecha, Villareal-Peña et al. (2012) para el cultivo de café encontraron que ha mayor duración del ciclo de cultivo mayor formación de lípidos cuantificaban.

El contenido de proteínas cuantificado ha sido superior en el cultivo irrigado con agua de pozo que el obtenido con agua de canal. Este resultado es coherente con la acumulación de nitratos obtenida en este ensayo. A mayor contenido de nitrógeno mayor formación proteica (Tkachuk et Irvine, 1969). De acuerdo con Antón (2018) la concentración proteica y de nitratos en lechuga varía según la variedad cultivada. El nitrógeno se incorpora en las especies vegetales en forma de aminoácidos y posteriormente a partir de estas moléculas se sintetiza la proteína. La función principal del ion nitrato es facilitar distintas funciones en la planta, pero principalmente la síntesis proteica.

Varios investigadores han observado que en diferentes especies vegetales los xenobióticos pueden afectar negativamente la biosíntesis de proteínas (Ishimaru et al., 2001; Hillis et al., 2011; Bellino et al., 2018; Singh et al., 2018; Riaz et al., 2017; Rede et al., 2019; Wahid et al., 2021). No obstante, en nuestro caso, a pesar de que el agua de canal transporta distintos tipos de contaminantes, no podemos atribuir a éstos una menor formación proteica, ya que consideramos que esta disminución ha sido debida a una menor concentración de nitratos en las hojas.

## CONCLUSIONES

---

## Conclusiones

De los resultados obtenidos del trabajo experimental realizado, se establecen las siguientes conclusiones principales:

- El tipo de agua empleada no ha afectado a la biomasa desarrollada (número de hojas, longitud de la hoja más larga, peso fresco y seco).
- El contenido de clorofilas (a, b y total) no se ha visto afectado por la calidad del agua.
- Para los dos tratamientos, la posición de la hoja afecta al contenido clorofílico, situándose la mayor concentración en las hojas en la posición más externa de la cobertura foliar, y la menor en las hojas interiores.
- El contenido de nitratos y proteína presenta una concentración mayor en las plantas tratadas con agua de pozo frente a las tratadas con agua de canal.
- La formación de carbohidratos y lípidos no se ha visto alterada ni en las plantas regadas con agua de pozo ni agua de canal.

## BIBLIOGRAFÍA

---

## Bibliografía

### Referencias bibliográficas

Antón, L. (2018). *Estudio comparativo de la composición de macronutrientes y micronutrientes en diferentes tipos de lechugas procedentes de cultivo ecológico y convencional*. Tesis de máster. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural. Departament de Química Universitat Politècnica de València. pp.21

<http://hdl.handle.net/10251/110587>

Almarcha, D., Almarcha, M., Riera, P., Rabella, R. (2011). *Contaminants emergents*. Diputació de Barcelona. [Internet [www.diba.cat/llibreria](http://www.diba.cat/llibreria). Consultado en fecha de 17 de marzo de 2021]

Alvarado, A. (2020). *Efecto de la incorporación de diferentes abonos orgánicos en el desarrollo y contenido en lípidos, azúcares y clorofilas en cultivos de hortalizas*. Trabajo Final de Grado. l'Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 116.

<https://upcommons.upc.edu/handle/2117/178013>

Asano, T. (1987). *Irrigation with reclaimed Municipal Wastewater*. *GeoJournal*, 15(3) 273-282.

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00213455>

Ayers, R.S., Westcot, D.W. (1994) *Water Quality for Agriculture*. FAO Irrigation and Drainage Paper 29, Revision 1, FAO, Rome, pp.174

Baeza, R., Segura, M., Contreras, J., Eymar, E., García, C., Moreno, J., Suarez, F. (2012). *Gestión sostenible de la reutilización de aguas residuales urbanas en los cultivos hortícolas*. Ed: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, pp.132

Barker, A., Mills, H.A. (2011). *Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops*. *Chemistry. Horticultural Reviews*, 2, 34-423.

Bavaro, L., Catucci, L., Depalo, N., Ventrella, A., Corcelli, A., Agostiano, A. (2007). *Lipid content in higher plants under osmotic stress*. *Bioelectrochemistry*, 70: 12–17.

<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.036>

Bellino, A., Lofrano, G., Carotenuto, M., Libralato, G., Baldantoni, D. (2018). *Antibiotic effects on seed germination and root development of tomato (*Solanum lycopersicum* L.)*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 148, 135-141.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.006>

Bixio, D., Thoeve, C., De Koning, J., Joksimovic, D., Savic, D., Wintgens, T., Melin, T. (2006). *Wastewater reuse in Europe*. *Desalination*, 187(1-3), 89-101.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.04.070>

Björkman, O., Boardman, N., Anderson, J.M., Thorne, S.W., Goodchild, D., & Pyliotis, N.A. (1972). *Effect of light intensity during growth of *Atriplex patula* on the capacity of photosynthetic reactions, chloroplast components and structure*. *Carnegie Institute Year Book*, 71: 115-135.

Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), 248-254.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BOE, (2007). *Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas*. Ministerio de la Presidencia, pp. 22.

[<https://www.boe.es/eli/es/rd/2007/12/07/1620>. Consultado en fecha de 5 de noviembre de 2020].

BOE, (2007). *Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica*. Ministerio de Medio Ambiente, pp. 38. [

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-13182> . Consultado en fecha de 5 de noviembre de 2020].

Bunani, S., Yörükoğlu, E., Yüksel, Ü., Kabay, N., Yüksel, M., Sert, G. (2015). *Application of reverse osmosis for reuse of secondary treated urban wastewater in agricultural irrigation*. *Desalination*, 364, 68–74.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.07.030>

Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V., Bayona, J. M. ( 2011a). *Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading*. Water Research, 45: 221–231.

<https://doi.org/10.1071/EA9940505>

Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V., Bayona, J. M., (2011b). *Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading*. Water Research, 45: 221–231.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.057>

Calderón-Preciado, D, Renault, Q., Matamoros, V., Cañameras, N., Bayona, J. M. (2012). *Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: an in vitro experiment*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 2000–2007.

<https://doi.org/10.1021/jf2046224>

Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Biel, C., Save, R., Bayona, J.M. 2013. *Foliar sorption of emerging and priority contaminants under controlled conditions*. Journal of Hazardous Materials, 260: 176-182.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.016>

Calderón-Preciado, D, Matamoros, V., Savé, R., Muñoz, P., Biel, C., Bayona, J. M., (2013). *Uptake of microcontaminants by crops irrigated with reclaimed water and groundwater under real field greenhouse conditions*. Environmental Science and Pollution Research, 20: 3629–3638.

<https://doi.org/10.1007/s11356-013-1509-0>

Cath Tzahi Y., Childress Amy E., Menachem Elimelech. (2006). *Forward osmosis: Principles, applications, and recent developments*. Journal of Membrane Science, 281: 70-87.

<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.05.048>

Cerqueira, F., Matamoros, V., Bayona, J., Piña, B. (2019a). *Antibiotic resistance genes distribution in microbiomes from the soil-plant-fruit continuum in commercial *Lycopersicon esculentum* fields under different agricultural practices*. Science of The Total Environment, 652: 660-670.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.268>

Cerqueira, F., Matamoros, V., Bayona, J., Elsinga, G., Hornstra, Luc M., Piña, B. (2019b). Distribution of antibiotic resistance genes in soils and crops. A field study in legume plants (*Vicia faba* L.) grown under different watering regimes. *Environmental Research*, 170: 16-25.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.007>

Chekli, L., Kim, Y., Phuntsho, S., Li, S., Ghaffour, N., Leiknes, T. O., Shon, H. K. (2017). *Evaluation of fertilizer-drawn forward osmosis for sustainable agriculture and water reuse in arid regions*. *Journal of Environmental Management*, 187:137–145.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.021>

Christou, A., Agüera, A., Bayona, J. M., Cytryn, E., Fotopoulos, V., Lambropoulou, D., Manaia, C. M., Michael, C., Revitt, M., Schröder, P., Fatta-Kassinos, D. (2017). *The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – A review*. *Water Research*, 123: 448–467.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.004>

Colla, G., Cardona, C.M., Cardarelli, M., Roupael, Y. (2010). *Improving nitrogen use efficiency in melon by grafting*. *HortScience*, 45 (4): 559-565.

<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.4.559>

Colla, G., Roupael, Y., Mirabellí, C., Cardarelli, M. (2011). *Nitrogen-use efficiency traits of mini-watermelon in response to grafting and nitrogen-fertilization doses*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174 (6): 933-941.

<https://doi.org/10.1002/jpln.201000325>

Coloma, A. (2020). *El mercado de infraestructuras de agua en Singapur*. Estudio de Mercado. Ed: ICEX España Exportación e Inversiones, pp: 41.

[doc2018785965.pdf \(icex.es\)](https://www.icex.es/doc2018785965.pdf)



CE (Comisión Europea), (2015). “Comunicación de La Comisión Al Parlamento Europeo, Al Consejo, Al Comité Económico y Social Europeo y Al Comité de Las Regiones - Cerrar El Círculo: Un Plan de Acción de La UE Para La Economía Circular.” Diario Oficial de Las Comunidades Europeas (614),1–24.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:52015DC0614>

Departament d’Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. (2020). TAULA ORIENTATIVA DEL CONTINGUT DE NUTRIENTS EN DEJECCIONS RAMADERES. Generalitat de Catalunya.

[f7d702bd-4f79-4ae4-97e4-ae4809b1ee57 \(gencat.cat\)](https://f7d702bd-4f79-4ae4-97e4-ae4809b1ee57.gencat.cat)

Ding, G., Chen, G., Liu, Y., Li, M., Liu, X. (2020). *Occurrence and risk assessment of fluoroquinolone antibiotics in reclaimed water and receiving groundwater with different replenishment pathways.* Science of the Total Environment, 738: 139802.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139802>

DOCE, (1991). *Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.* Comunidades Europeas, pp. 13.

[<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1991-80646>. Consultado en fecha de 17 de febrero de 2021].

DOCE, (2000). *Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.* Comunidades Europeas, pp. 73.

[<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2000-82524>. Consultado en fecha de 17 de febrero de 2021].

DOGC, (2007). *DECRETO 5/2009, de 13 de enero, por el que se deroga el Decreto 84/2007, de 3 de abril, de adopción de medidas excepcionales y de emergencia en relación con la utilización de los recursos hídricos.* Generalitat de Catalunya.

[DOGC20090113.pdf \(cedex.es\)](https://www.cedex.es/DOGC20090113.pdf)

Dodgen, L. K., Ueda, A., Wu, X., Parker, D. R., Gan, J. (2015). *Effect of transpiration on plant accumulation and translocation of PPCP/EDCs.* Environmental Pollution, 198: 144–153.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.002>

DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea), (2011). Reglamento (UE) N°1258/2011 DE LA COMISIÓN de 2 de diciembre de 2011 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de nitratos en los productos alimenticios. Diario oficial de la union europea, 320: 15-17.

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:320:0015:0017:ES:PDF>

DOUE (Diario Oficial de la Union Europea), (2020). *Reglamento (UE) 2020/741 del parlamento europeo y del consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua*. Diario oficial de la union europea, 177: 32-55.

<https://www.boe.es/doue/2020/177/L00032-00055.pdf>

DSWRAP, (2018). *Decision support-based approach for sustainable water reuse application in agricultural production*. PRIMA. [ <https://www.dswap-prima.eu/> . Consultado en fecha de 16 de marzo de 2021].

Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S. (2017). *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment*. Emerging Contaminants, 3(1): 1–16.

<https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>

FAO-AQUASTAT, (2012). *Global information system on water and agriculture*. FAO.

FAO (2013). *Afrontar la escasez de agua. Un marco de acción para la agricultura y la seguridad alimentaria*. FAO informe sobre temas hídricos, 38, pp.97.

<http://www.fao.org/3/i3015s/i3015s.pdf>

Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I., Kümmerer, K. (2011). *Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency*. Chemosphere, 85(5): 693–709.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.082>

Frame, J., Laidlaw, A. S. (1992). *Improved Grassland Management*. (2ª edición-2011). The Crowood Press Limited, Ramsbury. pp. 352.

Gracia-Lor, E., Martínez, M., Sancho, J. V., Peñuela, G., Hernández, F. (2012). *Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 99: 1011–1023.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.091>

Grech, C., (2020). *Evaluación del crecimiento y contenido de clorofilas, carbohidratos y lípidos en cultivo de invierno de Lactuca sativa L. fertilizado con abonos orgánicos*. Trabajo de Final de Grado. l'Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 122.

<https://upcommons.upc.edu/handle/2117/333349>

Grenni, P., Ancona, V., Barra Caracciolo, A. (2018). *Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review*. *Microchemical Journal*, 136: 25–39.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>

Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A. (2002). *From municipal sewage to drinking water: Fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas*. *Water Science and Technology*, 46(3):81–88.

<https://doi.org/10.2166/wst.2002.0060>

Heberer, T. (2002). *Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water*. *Journal of Hydrology*, 266(3–4): 175–189.

[https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00165-8)

Hillis, D.G., Fletcher, J., Solomon, K.R., Sibley, P.K. (2011). *Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species*. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 60 (2): 220-232.

<https://doi.org/10.1007/s00244-010-9624-0>

Hurtado, C., Domínguez, C., Pérez-Babace, L., Cañameras, N., Comas, J., Bayona, J. M., (2016). *Estimate of uptake and translocation of emerging organic contaminants from irrigation water concentration in lettuce grown under controlled conditions*. Journal of Hazardous Materials, 305: 139–148.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.039>

Hurtado, C., Cañameras, N., Domínguez, C., Price, G. W., Comas, J., Bayona, J. M., (2017a). *Effect of soil biochar concentration on the mitigation of emerging organic contaminant uptake in lettuce*. Journal of Hazardous Materials, 323: 386-393.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.046>

Hurtado, C., Parastar, H., Matamoros, V. (2017b). *Linking the morphological and metabolomic response of *Lactuca sativa* L exposed to emerging contaminants using GC × GC-MS and chemometric tools*. Scientific Reports 7: 6546.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06773-0>

Ishimaru, K., Kobayashi, N., Ono, K., Yano, M., Ohsugi, R. (2001). *Are contents of Rubisco, soluble protein and nitrogen in flag leaves of rice controlled by the same genetics?*. Journal of Experimental Botany. 52 (362): 1827-1833.

<https://doi.org/10.1093/jexbot/52.362.1827>

Jaray, S., (2019). *Estudio del efecto de uso de fertilizantes orgánicos sobre el desarrollo y contenido de lípidos, azúcares y clorofilas en cultivo de *Lactuca sativa* L. en invernadero*. Trabajo de Final de Grado. l'Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 97.

<https://upcommons.upc.edu/handle/2117/166853>

Jørgensen, S.E., Halling-Sørensen, B. (2000). *Drugs in the environment*. Chemosphere 40 (7): 691-699.

[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00438-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00438-5)

Kinney, C.A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Cahill, J.D. (2006). *Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(2): 317–326.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16519291/>

Knecht, G.N., O'Leary, J.W. (1983). *The influence of carbon dioxide on the growth, pigment, protein, carbohydrate and mineral status of lettuce*. *Journal of Plant Nutrition*, 6(4): 301-312.

<https://doi.org/10.1080/01904168309363091>

Kohler, J., Hernandez, J.A., Caravaca, F., Roldan, A. (2009). *Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress*. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 245-252.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.09.008>

Maas, E.V., Poss, J.A., Hoffman, G.J. (1986). *Salt tolerant of plant*. *Applied Agricultural Research* 1(1): 12-16.

Margenat, A., Matamoros, V., Díez, S., Cañameras, N., Comas, J., Bayona, J. M., (2017). *Occurrence of chemical contaminants in peri-urban agricultural irrigation waters and assessment of their phytotoxicity and crop productivity*. *Science of the Total Environment*, 599–600: 1140–1148.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.025>

Margenat, A., Matamoros, V., Díez, S., Cañameras, N., Comas, J., Bayona, J. M., (2018). *Occurrence and bioaccumulation of chemical contaminants in lettuce grown in peri-urban horticulture*. *Science of the Total Environment*, 637–638: 1166–1174.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.035>

Margenat, A., Matamoros, V., Díez, S., Cañameras, N., Comas, J., Bayona, J. M., (2019). *Occurrence and human health implications of chemical contaminants in vegetables grown in peri-urban agriculture*. *Environment International*, 124: 49–57.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.013>

Margenat, A., You, R., Cañameras, N., Carazo, N., Díez, S., Bayona, J. M., Matamoros, V., (2020). *Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and trace elements in Lactuca sativa amended with different organic fertilizers*. Environmental Research, 190: 109946 (pre-proof).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109946>

Matamoros V, Calderón-Preciado D, Domínguez C, Bayona JM. (2012) *Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review*. Analytica Chimica Acta.722:8–20.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.004>

Matamoros, V., Franco, J. (2018). *Assessing the use of sand, peat soil, and pine bark for the attenuation of polar pesticides from agricultural run-off: a bench-scale column experiment*. Environmental Science and Pollution Research, 25: 20640–20647.

<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2213-x>

Matt, P., Geiger, M., Walch Liu, P., Engels, C., Krapp, A., Stitt, M. (2001). *Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate*. Plant Cell and Environmental, 24: 1119- 1137.

Maynard, D. N., Barker, A.V., Monotti, P.L., and Peck, N. H. (1976). *Nitrate accumulation in vegetables*. Advances in Agronomy, 28: 71-118.

Meijer, H. J. G., Divecha, N., Van Den Ende, H., Musgrave, A., Munnik, T. (1999). *Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidyl-d-inositol 3,5-bisphosphate in plant cells*. Planta, 208: 294–298.

<https://doi.org/10.1007/s004250050561>

Melgarejo-Moreno, J., López-Ortiz, M. I. (2016). *Tratamiento de Aguas Residuales y Reutilización de Aguas En España*. Agua y Territorio, 8: 22–35.

<https://doi.org/10.17561/at.v0i8.3293>

Milano, M., Ruelland, D., Fernandez, S., Dezetter, A., Fabre, J., Servat, E. (2012). *Facing climatic and anthropogenic changes in the Mediterranean basin: What will be the medium-term impact on water stress?* Comptes Rendus - Geoscience, 344(9): 432–440.

<https://doi.org/10.1016/j.crte.2012.07.006>

Mujeriego, R. (1990). *Manual práctico de riego con agua residual municipal regenerada*. Ed: La Junta de Sanejament de la Generalitat de Catalunya i la Universitat Politècnica de Catalunya, pp.524

[https://www.researchgate.net/publication/230887765\\_Manual\\_Practico\\_De\\_Riego\\_Con\\_Agua\\_Residual\\_Municipal\\_Regenerada](https://www.researchgate.net/publication/230887765_Manual_Practico_De_Riego_Con_Agua_Residual_Municipal_Regenerada)

Mujeriego, R. (2007). *La reutilización, la regulación y la desalación en la gestión integrada del agua. En: La Sequía en España: Directrices para Minimizar su Impacto*. Ed. Dirección General del Agua, del Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp.155-202.

Mujeriego, R. (2013). *Reutilización del agua y gestión integrada de los recursos hídricos. Aspectos conceptuales, técnicos, reglamentarios y de gestión. XXXI Curso sobre tratamiento de aguas y explotación de estaciones depuradoras*. CEDEX.

[https://www.researchgate.net/publication/264540891\\_REUTILIZACION\\_DEL\\_AGUA\\_Y\\_GESTION\\_INTEGRADA\\_DE\\_LOS\\_RECURSOS\\_HIDRICOS\\_Aspectos\\_conceptuales\\_tecnicos\\_reglamentarios\\_y\\_de\\_gestion](https://www.researchgate.net/publication/264540891_REUTILIZACION_DEL_AGUA_Y_GESTION_INTEGRADA_DE_LOS_RECURSOS_HIDRICOS_Aspectos_conceptuales_tecnicos_reglamentarios_y_de_gestion)

Munnik, T., Irvine, R. F., Musgrave, A. (1998). *Phospholipid signalling in plants*. Biochimica et Biophysica Acta, 1389: 222–272.

[https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00158-6)

Munnik, T. (2001). *Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger*. Trends in Plant Science, 6: 227–233.

[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01918-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01918-5)

Murkute, A.A., Sharma, S., Singh, S.K. (2006). *Studies on salt stress tolerance of citrus rootstock genotypes with arbuscular mycorrhizal fungi*. HortScience 33: 70-76.

<https://doi.org/10.17221/3742-HORTSCI>

Nadal, M., (2015). *Efecte de la incorporació de biochar al sòl i estrès abiòtic de contaminants orgànics emergents presents en l'aigua de reg en la producció de biomassa de Lactuca sativa L.* Trabajo Final de Grado. l'Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 99.

<https://upcommons.upc.edu/handle/2117/78334>

Nicolás, E., Alarcón, J. J., Mounzer, O., Pedrero, F., Nortes, P. A., Alcobendas, R., Romero-Trigueros, C., Bayona, J. M., Maestre-Valero, J. F. (2016). "Long-term physiological and agronomic responses of mandarin trees to irrigation with saline reclaimed water". *Agricultural Water Management*, 166: 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.11.017>

Lafforgue, M., Lenouvel, V. (2015). *Closing the urban water loop: lessons from Singapore and Windhoek.* *Environmental Science: Water Research & Technology*, 5: 622-631.

<https://doi.org/10.1039/C5EW00056D>

Larsson, U.K., Anderson, J.M., Andersson, B. (1987). *Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll ab-protein complex (LHC II) subpopulations during thylakoid light adaptation and development.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 894 (1): 69-75.

[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90213-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90213-1)

Lax, A., Díaz, E., Castillo, V. and Albaladejo, J. (1994). *Reclamation of physical and chemical properties of a salinized soil by organic amendment.* *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 8: 9-17.

O'Connor, G.A., Elliott, H.A., Bastian, R.K. (2008). *Degraded Water Reuse: An Overview.* *Journal of Environmental Quality*, 37: 157-168.

<https://doi.org/10.2134/jeq2007.0459>

Owino, F., Gatheru, M., Stephen, E., Bing, O., Carter, L., Gao, Y. (2020). *Antibiotic-contaminated wastewater irrigated vegetables pose resistance selection risks to the gut microbiome.* *Environmental Pollution*, 264: 1147-52.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114752>



Pattanayak, G.K., Biswal, A.K., Reddy, V.S., Tripathy, B.C. (2005). *Ligth-dependent regulation of chlorophyll b biosynthesis in chlrophyllide a oxygenase overexpressing tobacco plants*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 326 (2): 466-471.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.049>

Perdomo, M. (2020). *Efecto de la presencia de metales pesados (Zn y Cu) en el desarrollo y contenido de lípidos, azúcares y clorofilas en cultivos de hortalizas*. Trabajo Final de Grado. l'Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 71.

<https://upcommons.upc.edu/handle/2117/192989>

Pérez, J. A. (2017). *Fármacos en aguas residuales*. Tecnoaqua, pp.70–73.

<https://www.tecnoaqua.es/>

Petrovic, M., González, S., Barceló, D., (2003). *Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water*. Trends in Analytical Chemistry, 22: 685-696.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993603011051>

Phillip, W. A., Yong, J. S., & Elimelech, M. (2010). *Reverse draw solute permeation in forward osmosis: Modeling and experiments*. Environmental Science and Technology, 44(13): 5170–5176.

<https://doi.org/10.1021/es100901n>

Pomares, F., Ramos, C., (2010). *Abonado de los cultivos hortícolas. En: Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, Madrid. pp. 181-192.

Poustie, A., Yang, Y., Verburg, P., Pagilla, K., Hanigan, D. (2020). *Reclaimed wastewater as a viable water source for agricultural irrigation: A review of food crop growth inhibition and promotion in the context of environmental change*. Science of the Total Environment, 739: 139756.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139756>

Radcliffe, John C., Page, D. (2020). *Water reuse and recycling in Australia — history, current situation and future perspectives*. Water Cycle, 1: 19-40.

<https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2020.05.005>

Raigón, M.D., García Martínez, M.D., Guerrero, C., Esteve, P. (2006). *Actividad de la nitrato reductasa y su relación con los factores productivos en lechuga*. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología, Universidad Politécnica de Valencia, 157: 1-11.

Rede, D., Santos, L.H., Ramos, S., Oliva-Teles, F., Antão, C., Sousa, S.R., Delerue- Matos, C. (2019). *Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of Lactuca sativa seeds*. Science of the Total Environment, 673: 102-109.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.432>

Riaz, L., Mahmood, T., Coyne, M.S., Khalid, A., Rashid, A., Hayat, M.T., Gulzar, A., Amjad, M. (2017). *Physiological and antioxidant response of wheat (Triticum aestivum) seedlings to fluoroquinolone antibiotics*. Chemosphere, 177: 250-257.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.033>

Rincón, L. 2005. *Fertilización nitrogenada y contenido de nitratos en hojas de lechuga "Iceberg"*. Vida Rural, 210: 50-55.

Romero-Trigueros, C., Parra, M., Bayona, J. M., Nortes, P. A., Alarcón, J. J., Nicolás, E. (2017). *Effect of deficit irrigation and reclaimed water on yield and quality of grapefruits at harvest and postharvest*. LWT - Food Science and Technology, 85: 405–411.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.001>

Ruiz Lozano, J.M.; Azcón, R. (1996). *Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants*. Agriculture Ecosystems & Environment, 60: 175-181.

Sánchez, T.M. (2010). *"Evaluación de la calidad de lechuga (Lactuca sativa L.) respecto a su contenido de nitratos y materia seca"*. Revista de la Facultad de Agronomía. UNL-Pam. Argentina, 21:29-36.

Santamaria, P. (2006). *Nitrate in vegetables: Toxicity, content, intake and EC regulation*. Journal of the Science of Food and Agriculture 86(1):10 – 17.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2351>

Sheng, M., Tang, M., Chen, H. (2008). *Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress*. *Mycorrhiza*, 18: 287–296.

<https://doi.org/10.1007/s00572-008-0180-7>

Singh, V., Pandey, B., Suthar, S. (2018). *Phytotoxicity of amoxicillin to the duckweed Spirodela polyrhiza: growth, oxidative stress, biochemical traits and antibiotic degradation*. *Chemosphere* 201: 492-502.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.010>

Socaciu, C., Stanila, A. (2007). *Nitrates in food, health and the environment*. In *Case Studies in Food Safety and Environmental Health*. pp.11-19.

<http://www.springerlink.com.Content/g4hk266n488g5605>.

Suwaileh, W., Johnson, D., Hilal, N. (2019). *Brackish water desalination for agriculture: Assessing the performance of inorganic fertilizer draw solutions*. *Desalination*, 456: 53–63.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2019.01.014>

Takeuchi, H., Tanaka, H. (2020). *Water reuse and recycling in Japan — History, current situation, and future perspectives —*. *Water Cycle*, 1: 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2020.05.001>

Tanoue, R., Sato, Y., Motoyama, M., Nakagawa, S., Shinohara, R., Nomiyama, K. (2012). *Plant uptake of pharmaceutical chemicals detected in recycled organic manure and reclaimed wastewater*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41): 10203-11.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf303142t>

Tkachuk, R., Irvine, G.N. (1969). *Aminoacid compositions of cereals and oilseed meals*. *Cereal Chemistry*, 46(2): 206-218.

Villareal, D., Baena, L.M., Posada, H. E. (2012). *Análisis de lípidos y ácidos grasos en café verde de líneas avanzadas de Coffea arabica cultivadas en Colombia*. *Cenicafé*, 63 (1): 19-40.

<https://www.cenicafe.org/es/publications/2.Analisis.pdf>

Wahid, F., Baig, S., Bhatti, Faraz M., Manzoor, M., Ahmed, I., Arshad, M. (2021). *Growth responses and rubisco activity influenced by antibiotics and organic amendments used for stress alleviation in Lactuca sativa*. Chemosphere, 264 (1): 128433.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128433>

Du, S.T., Zhang, Y.S., Lin, X.Y. (2007). *Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health*. Agricultural Sciences in China 6(10):1246–1255.

[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(07\)60169-2](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60169-2)

Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., Costanzo, S. D. (2009). *The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water*. Science of the Total Environment, 407(8): 2711–2723.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>

Williams-Nguyen, J., Sallach, J. B., Bartelt-Hunt, S., Boxall, A. B., Durso, L. M., McLain, J. E., Singer, R. S., Snow, D. D., Zilles, J. L. (2016). *Antibiotics and antibiotic resistance in agroecosystems: state of the science*. Journal of Environmental Quality, 45(2): 394–406.

<https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0336>

Wu, Y., Williams, M., Smith, L., Chen, D., Kookana, R. (2012). *Dissipation of sulfamethoxazole and trimethoprim antibiotics from manure-amended soils*. Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 47(4): 240–249.

<https://doi.org/10.1080/03601234.2012.636580>

Wu, X., Dodgen, L. K., Conkle, J. L., Gan, J. (2015). *Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review*. Science of the Total Environment, 536: 655–666.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.129>

WWAP (Programa Mundial de la UNESCO de Evaluación de los Recursos Hídricos). (2019). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos 2019: No dejar a nadie atrás*. París, UNESCO.

<https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000367304?locale=en>

Zalacaín, D., Bienes, R., Sastre-Merlín, A., Martínez-Pérez, S., García-Díaz, A., (2019). *Influence of reclaimed water irrigation in soil physical properties of urban parks: A case study in Madrid (Spain)*. *Catena* 180: 333–340.

<https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.05.012>

Zhang, X., Xu, M., Liu, J., Sun, N., Wang, B., Wu, L. (2016). *Greenhouse gas emissions and stocks of soil carbon and nitrogen from a 20-year fertilised wheat-maize intercropping system: A model approach*. *Journal of Environmental Management*, 167: 105–114.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.014>

Zhao S., Zou L., Tang Chuyang Y., Dennis Mulcahy. (2012). *Recent developments in forward osmosis: Opportunities and challenges*. *Journal of Membrane Science*, 396: 1-21.

<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.12.023>

## **Bibliografía complementaria**

Dades metereològiques. (2021). RuralCat.

[Dades agrometeorològiques - Ruralcat \(gencat.cat\)](https://gencat.cat/dades-agrometeorologiques)

**ANEXOS**

---

## Anexos

|   |            |
|---|------------|
| <b>ANEXO A. Cálculo de la dosis de los fertilizantes orgánicos y mineral.</b> | <b>106</b> |
| <b>ANEXO B. Croquis del ensayo de campo</b>                                   | <b>108</b> |
| <b>ANEXO C. Datos agrometeorológicos.</b>                                     | <b>113</b> |
| <b>ANEXO D. Resultados del ANOVA del tratamiento estadístico.</b>             | <b>115</b> |

## Índice de figuras

**Figura B- 1.** Plano 1/4: Cotas de la parcela y las subparcelas. Fuente: Elaboración propia. \_\_\_\_\_ 109

**Figura B- 2.** Plano 2/4: Distribución de los tratamientos. Fuente: Elaboración \_\_\_\_\_ 110

**Figura B- 3.**Plano 3/4: Distribución de las plantas en la subparcela. Fuente: Elaboración propia. 111

**Figura B- 4.** Plano 4/4: Instalación del sistema de riego. Fuente: Elaboración propia. \_\_\_\_\_ 112

**Figura C- 1.** Gráfico de las precipitaciones diarias acumuladas y las temperaturas medias diarias de la estación meteorológica de Viladecans durante el período de cultivo. Fuente: Elaboración propia, (Ruralcat,2021). \_\_\_\_\_ 114



## Índice de tablas

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla D- 1.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable número total de hojas. _____  | 115 |
| <b>Tabla D- 2.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable longitud de la hoja. _____  | 115 |
| <b>Tabla D- 3.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable peso fresco. _____  | 116 |
| <b>Tabla D- 4.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable peso seco. _____  | 116 |
| <b>Tabla D- 5.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable contenido hídrico. _____  | 116 |
| <b>Tabla D- 6.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a. _____  | 117 |
| <b>Tabla D- 7.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b. _____  | 117 |
| <b>Tabla D- 8.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total. _____  | 117 |
| <b>Tabla D- 9.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a para el tratamiento de pozo según la posición de la hoja. _____       | 118 |
| <b>Tabla D- 10.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b para el tratamiento de pozo según la posición de la hoja. _____      | 118 |
| <b>Tabla D- 11.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para el tratamiento de canal según la posición de la hoja. _____ | 118 |
| <b>Tabla D- 12.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a para el tratamiento de canal según la posición de la hoja. _____     | 119 |
| <b>Tabla D- 13.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b para el tratamiento de canal según la posición de la hoja. _____     | 119 |
| <b>Tabla D- 14.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para el tratamiento de pozo según la posición de la hoja. _____  | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla D- 15.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a para la posición exterior entre tratamientos. _____     | 120 |
| <b>Tabla D- 16.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b para la posición exterior entre tratamientos. _____     | 120 |
| <b>Tabla D- 17.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para la posición exterior entre tratamientos. _____ | 120 |
| <b>Tabla D- 18.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a para la posición interior entre tratamientos. _____     | 121 |
| <b>Tabla D- 19.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b para la posición interior entre tratamientos. _____     | 121 |
| <b>Tabla D- 20.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para la posición interior entre tratamientos. _____ | 121 |
| <b>Tabla D- 21.</b> Tabla Welch ANOVA de la variable nitratos _____   | 122 |
| <b>Tabla D- 22.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable carbohidratos _____   | 122 |
| <b>Tabla D- 23.</b> Tabla ANOVA de un factor de la variable lípidos. _____  | 122 |
| <b>Tabla D- 24.</b> Tabla Welch ANOVA de la variable proteínas _____  | 123 |

## ANEXO A. Cálculo de la dosis de los fertilizantes orgánicos y mineral.

### Cultivo lechuga exterior

- **Tratamientos de lechuga:**

- Número de tratamientos: 2
  - ⇒ Agua de riego: Depósito-pozo
  - ⇒ Agua de riego: Corredera-33
- Número de repeticiones: 4
- Número total de subparcelas: 8

- **Superficie parcela por tratamiento:**

$$6,80 \text{ m} \times 1,20 \text{ m} = 8,16 \text{ m}^2$$

- **Extracciones lechuga:**

- Extracciones de lechuga: N = 80-100 kg/ha; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 30-50 kg/ha, K<sub>2</sub>O = 160-210 kg/ha (Pomares y Ramos, 2010)

$$N = 100 \text{ kg} \frac{N}{\text{ha}} * \frac{1 \text{ ha}}{10.000 \text{ m}^2} * \frac{1000 \text{ g} N}{1 \text{ kg} N} = 10 \text{ g} \frac{N}{\text{m}^2}$$

$$P_2 O_5 = 40 \text{ kg} \frac{P_2 O_5}{\text{ha}} * \frac{1 \text{ ha}}{10.000 \text{ m}^2} * \frac{1000 \text{ g} P_2 O_5}{1 \text{ kg} P_2 O_5} = 4 \text{ g} \frac{P_2 O_5}{\text{m}^2}$$

$$K_2 O = 185 \text{ kg} \frac{K_2 O}{\text{ha}} * \frac{1 \text{ ha}}{10.000 \text{ m}^2} * \frac{1000 \text{ g} K_2 O}{1 \text{ kg} K_2 O} = 18,5 \text{ g} \frac{K_2 O}{\text{m}^2}$$

- **Necesidades de abono para los tratamientos**

- Necesidad de fertilizante orgánico (estiércol de oveja):

Cantidad aproximada incorporada a la parcela de 7500 m<sup>2</sup> → 30 m<sup>3</sup> → 40 m<sup>3</sup>/ha

Incorporado a principios de verano (Información extraída de ruralcat):

9 kg N/m<sup>3</sup> (30% amoniacal = 2,82 kg N/m<sup>3</sup>)

4 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>

9 kg K<sub>2</sub>O/m<sup>3</sup>

$$N = 2,82 \frac{\text{kg N}}{\text{m}^3} * 40 \text{ m}^3 \frac{\text{estiércol}}{\text{ha}} = 112,8 \text{ UF}$$

$$P_2O_5 = 4 \frac{\text{kg N}}{\text{m}^3} * 40 \text{ m}^3 \frac{\text{estiércol}}{\text{ha}} = 160 \text{ UF}$$

$$K_2O = 9 \frac{\text{kg N}}{\text{m}^3} * 40 \text{ m}^3 \frac{\text{estiércol}}{\text{ha}} = 360 \text{ UF}$$

Se considera que estas cantidades no estarán disponibles en el primer año de cultivo y por eso se requiere de un suplemento fertilizante de nitrógeno. No es necesario aportes suplementarios de fósforo y potasio ya que la analítica del suelo (Tabla 3-1.) manifestó unos contenidos elevados de estos dos macroelementos.

- Necesidad de fertilizante mineral:

La aportación de nitrógeno se realizó con nitrato amónico (34%N). El cálculo de la necesidad de abono se realizó en base a 50 UF en lugar de las 100 UF referenciadas en la bibliografía , ya que se estimó que un 50% aproximadamente del N aportado con el estiércol estaría disponible el primer año de cultivo.

$$\begin{aligned} \text{Nitrato amónico} &= 5 \frac{\text{g N}}{\text{m}^2} * 250 \text{ m}^2 * \frac{100 \text{ g abono}}{34 \text{ g N}} * \frac{1}{0,5 \text{ eficiencia}} \\ &= 7,353 \text{ g abono} \frac{\text{nitrogenado}}{\text{parcela}} \end{aligned}$$

## **ANEXO B. Croquis del ensayo de campo**

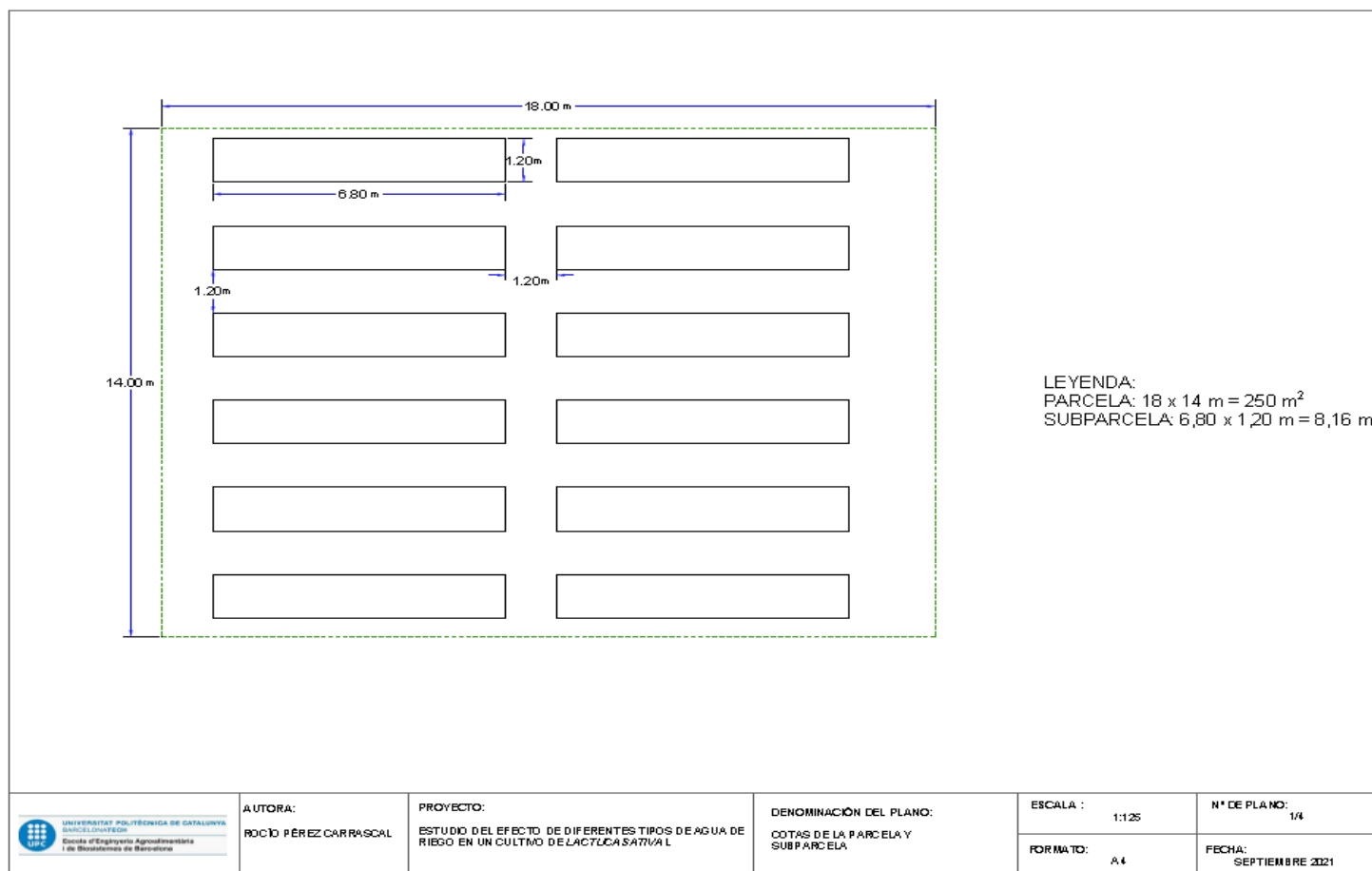
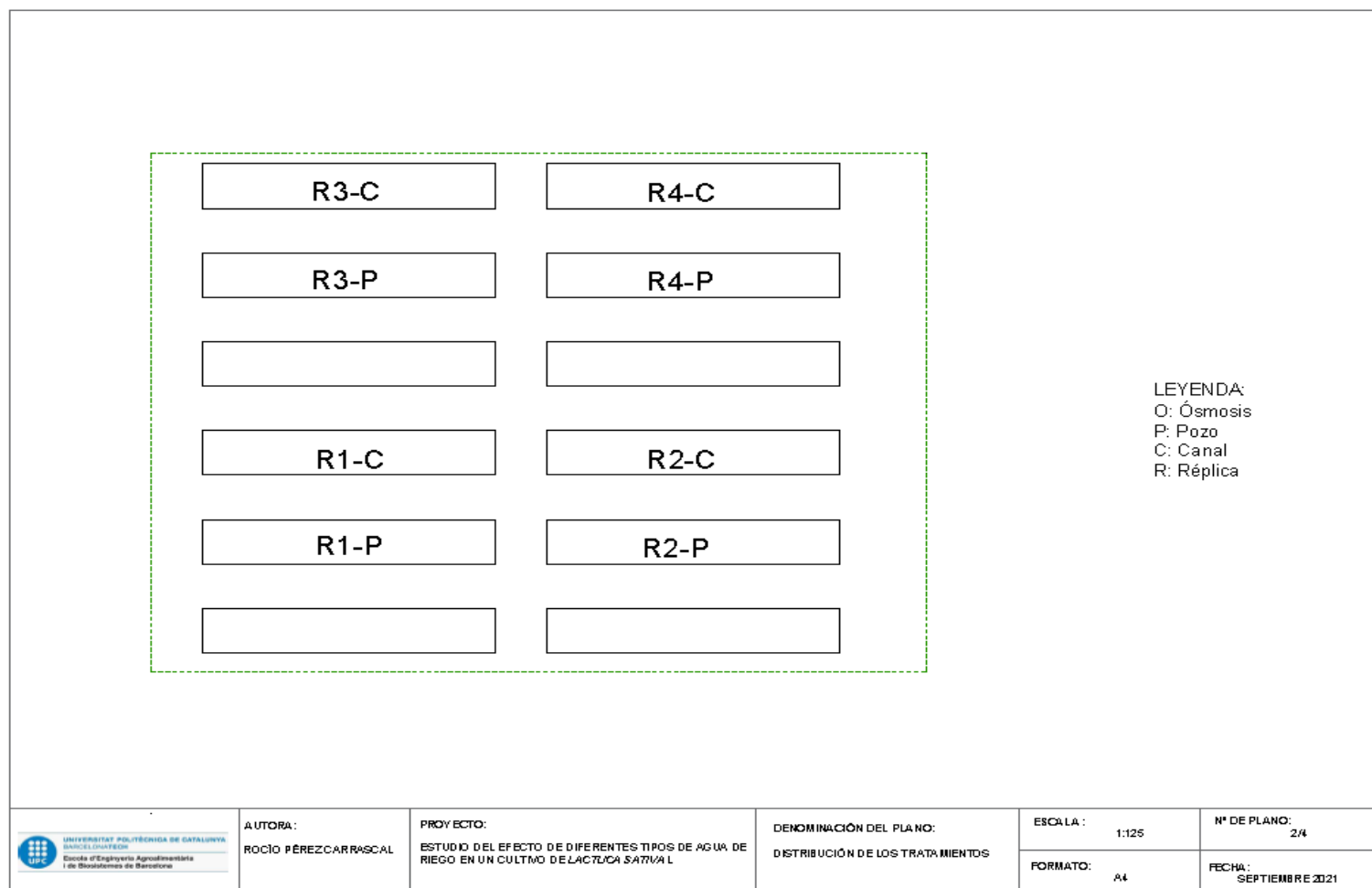


Figura B- 1. Plano 1/4: Cotas de la parcela y las subparcelas. Fuente: Elaboración propia.



**Figura B- 2.** Plano 2/4: Distribución de los tratamientos. Fuente: Elaboración

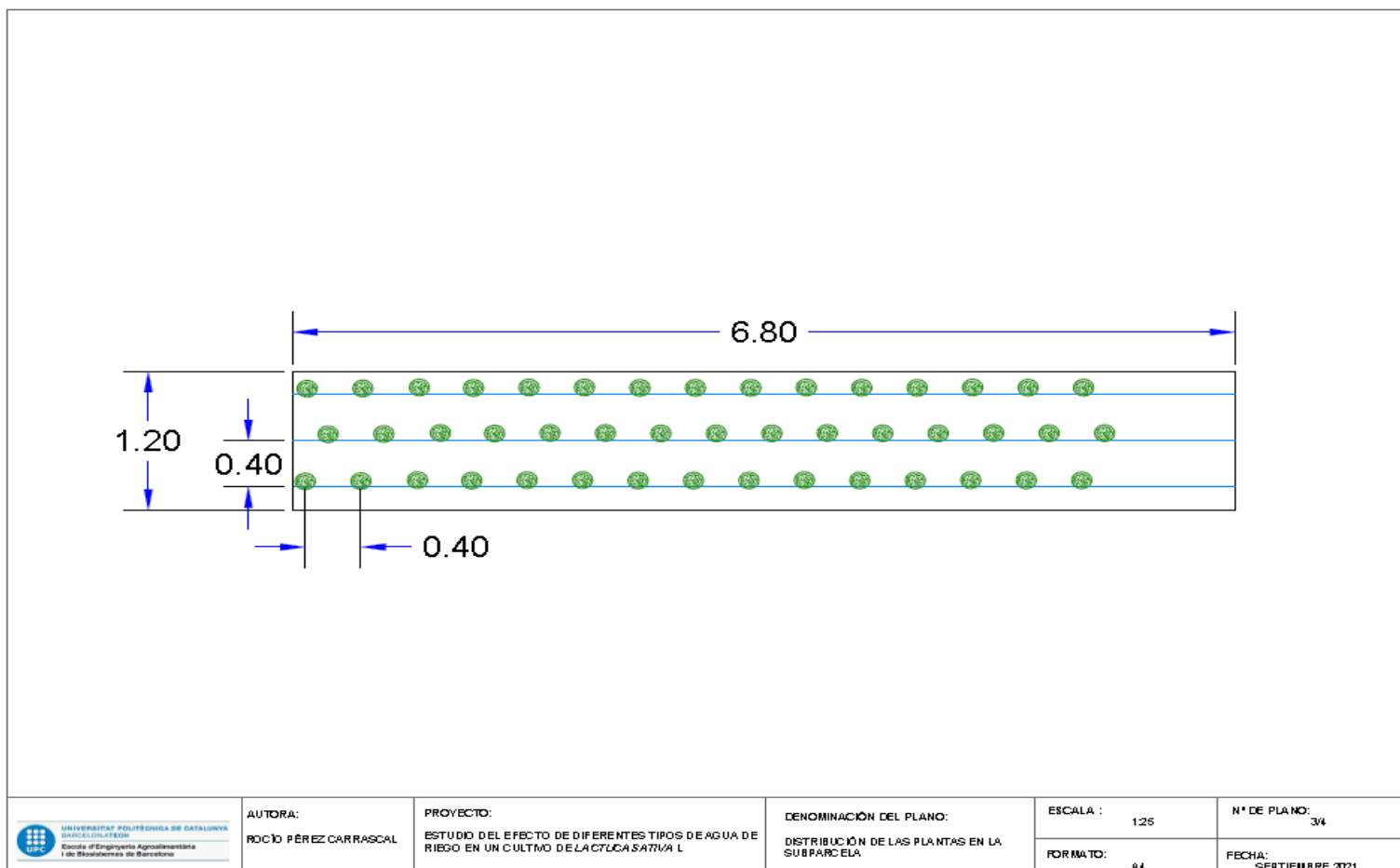


Figura B- 3.Plano 3/4: Distribución de las plantas en la subparcela. Fuente: Elaboración propia.



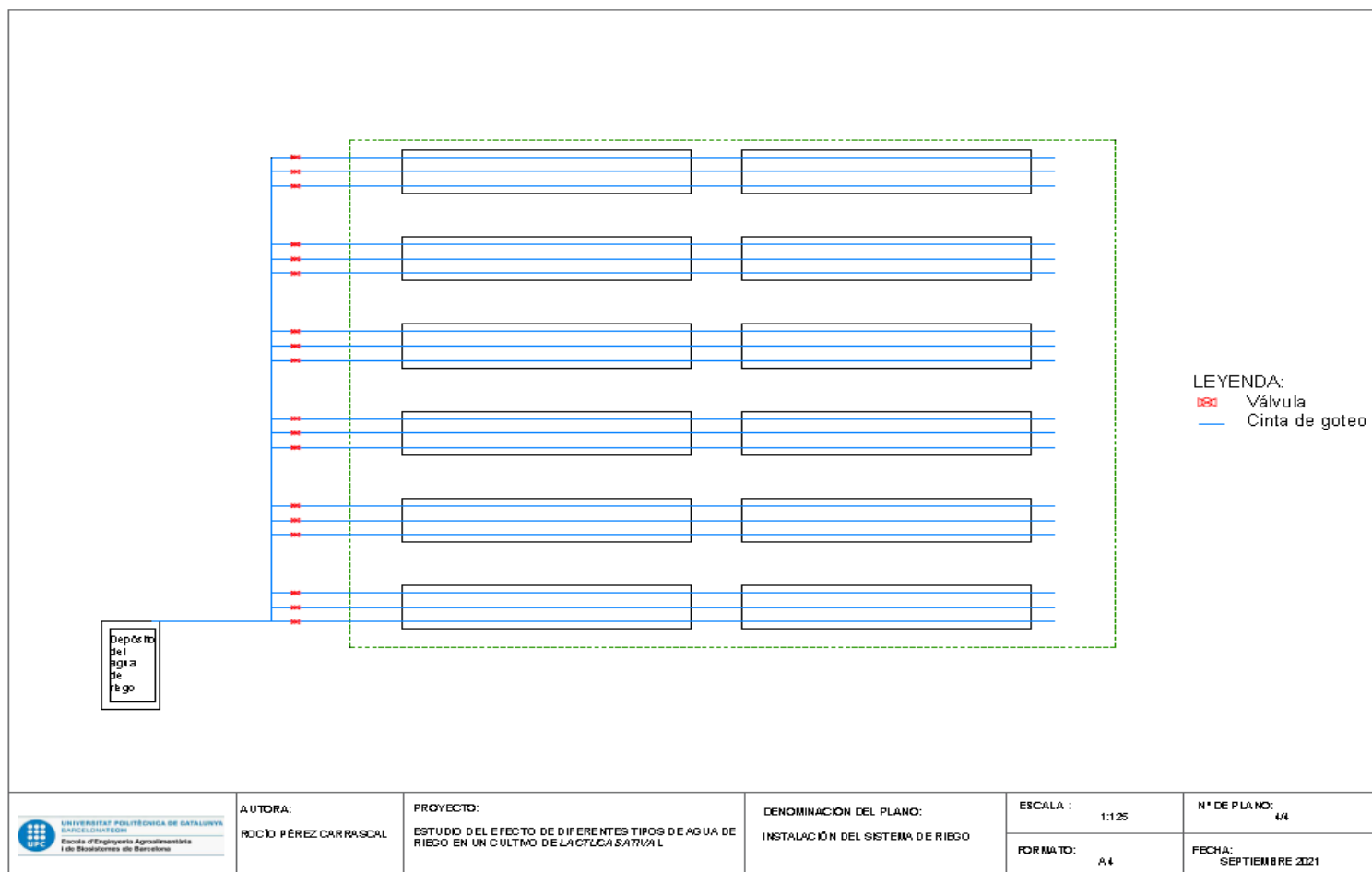
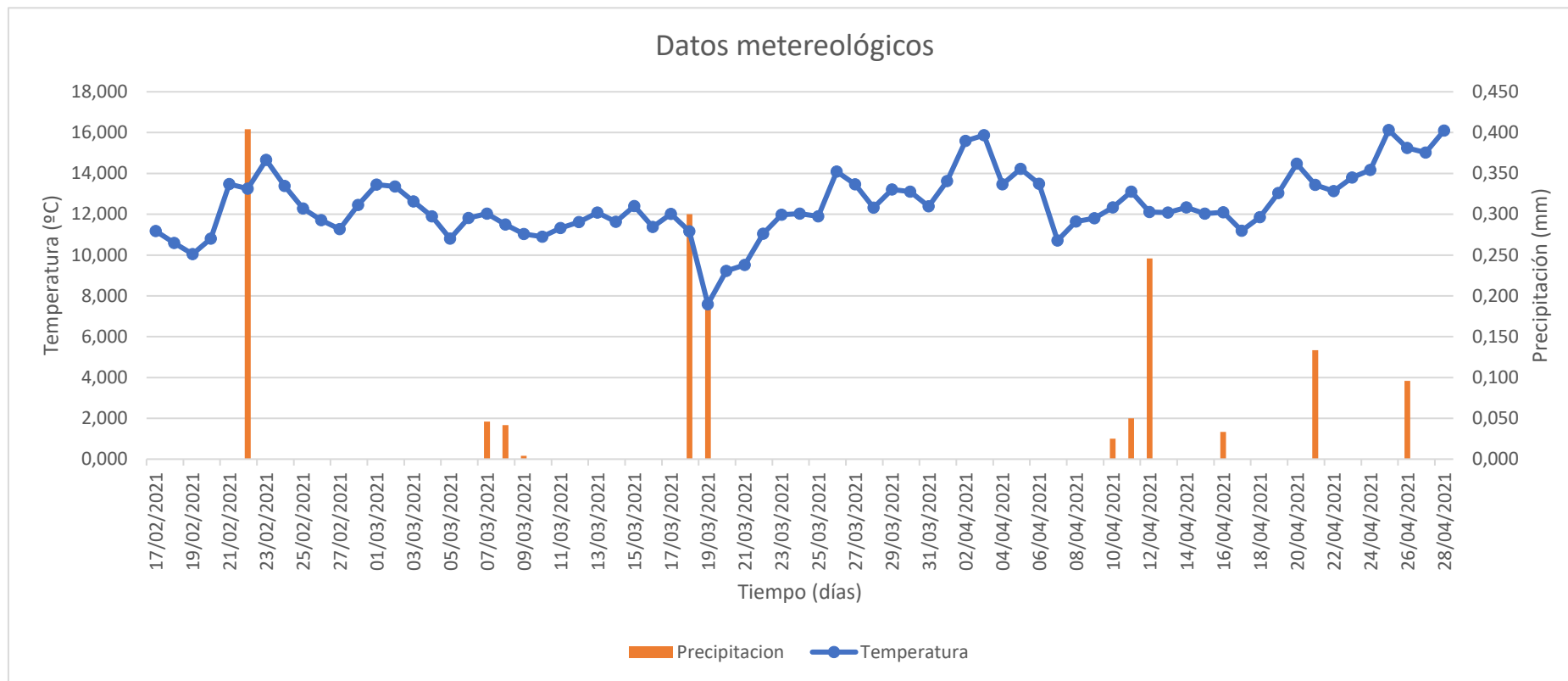


Figura B- 4. Plano 4/4: Instalación del sistema de riego. Fuente: Elaboración propia.

## **ANEXO C. Datos agrometeorológicos.**

- Estación meteorológica de Viladecans
- Temperatura media: 12,45°C
- Precipitación media: 0,022 mm



**Figura C- 1.** Gráfico de las precipitaciones diarias acumuladas y las temperaturas medias diarias de la estación meteorológica de Viladecans durante el período de cultivo. Fuente: Elaboración propia, (Ruralcat,2021).

## ANEXO D. Resultados del ANOVA del tratamiento estadístico.

- Número total de hojas

**Tabla D- 1.** Tabla ANOVA de un factor de la variable número total de hojas.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 2,873   | 0,43%        | 2,873     | 2,873     | 0,09    | 0,771   |
| <b>Error</b>       | 20 | 659,237 | 99,57%       | 659,237   | 32,962    |         |         |
| <b>Total</b>       | 21 | 662,110 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Longitud de la hoja

**Tabla D- 2.** Tabla ANOVA de un factor de la variable longitud de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,674   | 0,07%        | 0,674     | 0,6738    | 0,01    | 0,908   |
| <b>Error</b>       | 20 | 985,977 | 99,93%       | 985,977   | 49,2989   |         |         |
| <b>Total</b>       | 21 | 986,651 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Biomasa
  - Peso fresco

**Tabla D- 3.** Tabla ANOVA de un factor de la variable peso fresco.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 12110   | 0,45%        | 12110     | 12110     | 0,17    | 0,680   |
| <b>Error</b>       | 38 | 2658512 | 99,55%       | 2658512   | 69961     |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 2670622 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Peso seco

**Tabla D- 4.** Tabla ANOVA de un factor de la variable peso seco.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 93,40   | 3,27%        | 93,40     | 93,40     | 1,29    | 0,264   |
| <b>Error</b>       | 38 | 2759,51 | 96,73%       | 2759,51   | 72,62     |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 2852,91 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Contenido hídric

**Tabla D- 5.** Tabla ANOVA de un factor de la variable contenido hídrico.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,5692  | 1,91%        | 0,5692    | 0,5692    | 0,74    | 0,395   |
| <b>Error</b>       | 38 | 29,1721 | 98,09%       | 29,1721   | 0,7677    |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 29,7413 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Determinación del contenido total en clorofila según el tratamiento
  - Clorofila *a*

**Tabla D- 6.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00000 | 0,04%        | 0,000003  | 0,000003  | 0,03    | 0,866   |
| <b>Error</b>       | 78 | 0,00933 | 99,96%       | 0,009339  | 0,000120  |         |         |
| <b>Total</b>       | 79 | 0,00934 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *b*

**Tabla D- 7.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00000 | 0,04%        | 0,000000  | 0,000000  | 0,03    | 0,866   |
| <b>Error</b>       | 78 | 0,00077 | 99,96%       | 0,000779  | 0,000010  |         |         |
| <b>Total</b>       | 79 | 0,00078 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila total

**Tabla D- 8.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00000 | 0,04%        | 0,000006  | 0,000006  | 0,03    | 0,866   |
| <b>Error</b>       | 78 | 0,01551 | 99,96%       | 0,015514  | 0,000199  |         |         |
| <b>Total</b>       | 79 | 0,01551 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Determinación del contenido total en clorofila según la posición de la hoja.
  - Clorofila *a*

**Tabla D- 9.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila *a* para el tratamiento de pozo según la posición de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00407 | 95,95%       | 0,004078  | 0,004078  | 899,19  | 0,000   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00017 | 4,05%        | 0,000172  | 0,000005  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,0042  | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *b*

**Tabla D- 10.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila *b* para el tratamiento de pozo según la posición de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00034 | 95,95%       | 0,000340  | 0,000340  | 899,19  | 0,000   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00001 | 4,05%        | 0,000014  | 0,000000  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00035 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila total

**Tabla D- 11.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para el tratamiento de canal según la posición de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00677 | 95,95%       | 0,006775  | 0,006775  | 899,19  | 0,000   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00028 | 4,05%        | 0,000286  | 0,000008  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00706 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *a*

**Tabla D- 12.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila *a* para el tratamiento de canal según la posición de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00497 | 97,70%       | 0,004971  | 0,004971  | 1611,03 | 0,000   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00011 | 2,30%        | 0,000117  | 0,000003  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00508 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *b*

**Tabla D- 13.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila *b* para el tratamiento de canal según la posición de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00041 | 97,70%       | 0,000415  | 0,000415  | 1611,03 | 0,000   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00001 | 2,30%        | 0,000010  | 0,000000  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00042 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofi

**Tabla D- 14.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para el tratamiento de pozo según la posición de la hoja.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00825 | 97,70%       | 0,008258  | 0,008258  | 1611,03 | 0,000   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00019 | 2,30%        | 0,000195  | 0,000005  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00845 | 100,00%      |           |           |         |         |



- Determinación del contenido total en clorofila según la posición de la hoja entre tratamientos.
  - Clorofila *a*

**Tabla D- 15.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila a para la posición exterior entre tratamientos.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00002 | 8,23%        | 0,000021  | 0,000021  | 3,41    | 0,073   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00023 | 91,77%       | 0,000239  | 0,000006  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00026 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *b*

**Tabla D- 16.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila b para la posición exterior entre tratamientos.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00000 | 8,23%        | 0,000002  | 0,000002  | 3,41    | 0,073   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00002 | 91,77%       | 0,000020  | 0,000001  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00002 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila total

**Tabla D- 17.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para la posición exterior entre tratamientos.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00003 | 8,23%        | 0,000036  | 0,000036  | 3,41    | 0,073   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00039 | 91,77%       | 0,000397  | 0,000010  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00043 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *a*

**Tabla D- 18.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila *a* para la posición interior entre tratamientos.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00000 | 7,42%        | 0,000004  | 0,000004  | 3,05    | 0,089   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00005 | 92,58%       | 0,000051  | 0,000001  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00005 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila *b*

**Tabla D- 19.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila *b* para la posición interior entre tratamientos.

| Fuente             | GL | SC Sec.  | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|----------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,000000 | 7,42%        | 0,000000  | 0,000000  | 3,05    | 0,089   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,000004 | 92,58%       | 0,000004  | 0,000000  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,000005 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Clorofila total

**Tabla D- 20.** Tabla ANOVA de un factor de la variable clorofila total para la posición interior entre tratamientos.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00000 | 7,42%        | 0,000007  | 0,000007  | 3,05    | 0,089   |
| <b>Error</b>       | 38 | 0,00008 | 92,58%       | 0,000084  | 0,000002  |         |         |
| <b>Total</b>       | 39 | 0,00009 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Determinación del contenido en nitratos

**Tabla D- 21.** Tabla Welch ANOVA de la variable nitratos

| Fuente             | GL Num | GL Den  | Valor F | Valor p |
|--------------------|--------|---------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1      | 16,4991 | 16,35   | 0,001   |

- Contenido de carbohidratos y lípidos
  - Carbohidratos

**Tabla D- 22.** Tabla ANOVA de un factor de la variable carbohidratos

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,3810  | 13,81%       | 0,3810    | 0,3810    | 3,53    | 0,074   |
| <b>Error</b>       | 22 | 2,3773  | 86,19%       | 2,3773    | 0,1081    |         |         |
| <b>Total</b>       | 23 | 2,7583  | 100,00%      |           |           |         |         |

- Lípidos

**Tabla D- 23.** Tabla ANOVA de un factor de la variable lípidos.

| Fuente             | GL | SC Sec. | Contribución | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|---------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Tratamiento</b> | 1  | 0,00279 | 0,11%        | 0,00279   | 0,002792  | 0,02    | 0,877   |
| <b>Error</b>       | 22 | 2,51024 | 99,89%       | 2,51024   | 0,114102  |         |         |
| <b>Total</b>       | 23 | 2,51304 | 100,00%      |           |           |         |         |

- Determinación del contenido en proteínas

**Tabla D- 24.** Tabla Welch ANOVA de la variable proteínas

| Fuente      | GL Num | GL Den  | Valor F | Valor p |
|-------------|--------|---------|---------|---------|
| Tratamiento | 1      | 20,6180 | 12,32   | 0,002   |