



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

BIOLECHOS: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN MEDIANTE BIOENSAYOS PARA TRATAR EFLUENTES CON PESTICIDAS

Autor: Sofía Lammertyn

Director de la Tesis: Dr. Roberto García Ruiz
Directora de la Tesis: Cristina Susana Zalazar
Co-director de Tesis: José Luis Godoy

Departamento: Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Fecha: 22/03/2024

RUJA

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas e instituciones que han sido parte fundamental de mi trayectoria. En particular, deseo dedicar un profundo agradecimiento al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), por brindarme el espacio para crecer tanto a nivel académico como profesional.

Asimismo, agradezco a las universidades que han contribuido a mi formación. La Universidad Nacional del Litoral (UNL) ha sido un pilar de excelencia académica que no solo me ha proporcionado conocimientos, sino que también ha representado un entorno de igualdad de oportunidades al ser de acceso público. De igual manera, valoro enormemente la experiencia enriquecedora que adquirí durante mi tiempo en la Universidad de Jaén (UJA) en España, la cual me permitió conocer otro ámbito académico y cultural.

Reconozco el papel fundamental desempeñado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) en mi carrera profesional. Su labor en la formación de recursos humanos en el ámbito científico y tecnológico es invaluable en Argentina, y me ha brindado la oportunidad de contribuir al avance de la ciencia y la tecnología. También agradezco sinceramente el respaldo financiero proporcionado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), cuyo apoyo ha sido esencial para llevar a cabo mis investigaciones y proyectos.

A mi familia, mi constante apoyo, les debo un profundo agradecimiento por su amor incondicional, comprensión y apoyo continuo. Especialmente, quiero reconocer a mis padres por su fe inquebrantable en mí y por alentarme a perseguir mis sueños. A mi hermana y mis sobrinas, les agradezco por la alegría que han traído a mis días más difíciles. A Fran, mi compañero, le dedico un agradecimiento especial por su paciencia, comprensión y amor durante los días y noches dedicados a este proyecto.

Quiero expresar mi gratitud a todos mis queridos amigos y amigas, aquellos que conocí en la adolescencia, los que me brindó la facultad y también mis compañeros y compañeras becarios, por haber compartido esta experiencia a mi lado. Sus palabras de cariño me han acompañado siempre. Un agradecimiento especial a Carolina Masin y Alejandra Duran por su ayuda en este camino.

Quiero agradecer profundamente a la Dra. Cristina Susana Zalazar, al Dr. José Luis Godoy y al Dr. Roberto García Ruiz por su orientación y apoyo, fundamentales en cada etapa de mi investigación. La sabiduría que compartieron ha dejado una huella en mi desarrollo.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

Aportes Científicos-Tecnológicos

Lammertyn, S., Masín, C. E., Zalazar, C. S., & Fernandez, M. E. (2021). Biomarkers response and population biological parameters in the earthworm *Eisenia fetida* after short term exposure to atrazine herbicide. *Ecological Indicators*, 121, 107173.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107173>

Índice

Agradecimientos	2
Aportes Científicos-Tecnológicos	3
Índice	4
Abreviaturas y símbolos	7
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción	11
1. Explorando el nuevo paradigma del modelo agro-productivo.....	12
2. Las Buenas Prácticas Agrícolas: los biolechos.....	15
3. Biorremediación aplicada a diferentes agro-residuos.....	23
Objetivo general.....	24
Objetivos Específicos.....	24
Capítulo 1. Diseño y desarrollo de un biolecho a escala de laboratorio para la remediación de agua contaminada con agroquímicos	25
Introducción	26
Objetivo	26
Resumen gráfico.....	26
Materiales y métodos.....	26
1. Preparación de los materiales que componen la biomezcla.....	26
2. Armado y maduración de los biolechos.....	28
3. Pulverización de los herbicidas	29
4. Monitoreo integrado a lo largo del proceso de degradación de los herbicidas en la biomezcla.....	30
5. Análisis estadístico	32
Resultados y discusión.....	33
1. Etapa de maduración de los materiales para generar la biomezcla	33
2. Degradación de los herbicidas en la biomezcla y comparación con la degradación en el suelo.....	33
3. Fluctuaciones en la actividad enzimática: Hidrólisis de Fluoresceína Diacetato (FDA) y enzimas Fenoloxidasas (FOX)	38
4. Descripción de las observaciones de los parámetros fisicoquímicos	40
Conclusión	41
Capítulo 2. Incorporación de los bioensayos con oligoquetos terrestres y semillas en el monitoreo de los herbicidas en las biomezclas: desarrollo de una nueva prueba de monitoreo sobre <i>E. fetida</i>	42

Introducción	43
Objetivos.....	43
Resumen gráfico.....	43
Materiales y métodos.....	43
1. Prueba de lesión (li) en <i>E. fetida</i>	44
2. Diseño y análisis de experimentos para la validación de la prueba de lesión	49
3. Monitoreo integrado de la biomezcla mediante indicadores biológicos	53
Resultados y discusión.....	54
1. Determinaciones EC50	54
2. Superficie de respuesta	56
3. Análisis de generalización del modelo	57
4. Comparación de los indicadores biológicos en el monitoreo de la biomezcla	57
Conclusión	61
Capítulo 3. Evaluación de la toxicidad residual en biomezclas desgastadas y su posterior reciclaje para su potencial reutilización como enmienda.....	62
Objetivo	63
Resumen gráfico.....	63
Materiales y métodos.....	64
1. Preparación y armado de los tratamientos	64
2. Evaluación de la estabilidad, madurez y calidad de los sustratos finales.....	64
3. Análisis estadístico	67
Resultados y discusión.....	67
1. Indicadores de estabilidad y madurez	67
2. Indicadores de calidad.....	67
3. Dinámicas de los macronutrientes.....	67
4. Efectos en las lombrices de tierra <i>E. fétida</i> y <i>A. trapezoides</i>	70
5. Análisis de biotransformación BR: evaluación enzimática por FDA y la descomposición del rastrojo de trigo	73
Conclusión	76
Capítulo 4. Biorremediación de residuos agrícolas en cultivos de olivar	77
Introducción	78
Objetivo	78
Materiales y métodos.....	78
1. Recolección de agro-residuos.....	78
2. Diseño Experimental.....	80
3. Lombrices de tierra utilizadas	81

4.	Muestreo y variables de medición.....	81
5.	Análisis Estadístico.....	85
	Resultados y discusión.....	85
1.	Dinámicas de la temperatura, materia orgánica y pH en las mezclas.....	85
2.	Producción de CO ₂ de los tratamientos.....	87
3.	Variaciones en los contenidos de Carbono y Nitrógeno y la relación C/N.....	88
4.	Dinámica de los principales macronutrientes.....	90
5.	Cambios en los niveles de amonio y nitratos.....	92
6.	Dinámicas de los microelementos.....	94
7.	Actividad microbiana: fosfatasa Alcalina (ALP).....	96
8.	Perfil de consumo de las fuentes de carbono utilizadas por la comunidad microbiana (Ecoplacas).....	97
9.	Estudio del crecimiento y reproducción de las lombrices de tierra de <i>E. fétida</i>	97
	Conclusión.....	99
	Conclusiones generales.....	101
	Bibliografía.....	102
	M. Material complementario.....	113
	M.1. Procedimiento para la cuantificación de herbicidas.....	113
	M.2. Experimentos de CE50.....	116
	M.3. Experimentos de Superficie de Respuesta.....	137
	M.3.1. Experimentos con mezclas de herbicidas: Atrazina, Clethodim, Haloxifop-P-metilo y Dicamba.....	137
	M.3.2 Validación experimental de la prueba mediante la sustitución de atrazina por prometrina.....	162
	M.4. Monitoreo de la degradación de herbicidas en el biolecho.....	168

Abreviaturas y símbolos

Organizaciones y Entidades:

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

ISO: Organización Internacional de Normalización

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

FOA: Federación Olivícola Argentina

SGAyDS: Secretaría de Gobierno de Ambiente y Desarrollo Sustentable

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

INTEC: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

PRINARC: Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos

UNL: Universidad Nacional del Litoral

UJA: Universidad de Jaén

Instrumentación analítica, compuestos y elementos mencionados en la tesis:

UHPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectroscopía de masas

ICP-MS: Espectrometría de masas

DMAB: Ácido 3,3-dimetilaminobenzoico

MBTH: Hidrazona de 3-metilo-2-benzotiazolinona

EdTA/Cu: Complejo de etilendiaminotetraacetato de cobre

AcSC: Ácido sulfocianúrico

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

Parámetros y mediciones:

EC50: Concentración requerida para obtener un 50% de inhibición

UT: Unidad Tóxica

II: Índice de lesión

NR: Respuesta neta

IG: Índice de germinación

AMR: Respuesta metabólica promedio

S: Índice de riqueza metabólica del sustrato

H': Diversidad, índice de Shannon-Weaver

RMSE: Raíz del error cuadrático medio

Biomarcadores:

AchE: Acetil colinesterasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

PT: Proteínas totales

ALP: Fosfatasa alcalina

FOX: Enzimas fenoloxidasas

FDA: Hidrólisis del diacetato de fluoresceína

Nomenclaturas elegidas para los tratamientos de la tesis:

ATZ: Atrazina

PRO: Prometrina

CLE: Cletodim

HAL: Haloxifop-P-metilo

DIC: Dicamba

S/P: Sin pulverizar

OLB: Mezcla de alpeorajo, estiércol vacuno y hojas de olivo

OLBE: Mezcla de OLB y lombrices *E. fetida*

OLHE: Mezcla de OLH y *E. fetida* durante 45 días

OLH: Mezcla alpeorajo, estiércol equino y hojas de olivo

BEF: Biomezcla desgastada con *E. fetida*

BAT: Biomezcla desgastada con *A. trapezoides*

BR: Biomezcla desgastada con la adición de rastrojo de trigo

Otros términos:

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

PPDB: Base de Datos de Propiedades de Agroquímicos

Resumen

Los biolechos han surgido como una estrategia destacada para la gestión eficiente de los residuos de agroquímicos en la agricultura a nivel mundial. Estos sistemas, compuestos por una biomezcla biológicamente activa, han sido diseñados con el propósito de impulsar la degradación de agroquímicos mediante la actividad microbiológica. En este estudio, se evaluó el rendimiento de una biomezcla que incorporó materiales disponibles en Argentina, como rastrojo de trigo, resaca de río y suelo. Esto se llevó a cabo para degradar una combinación de agroquímicos, que incluyeron los herbicidas atrazina, prometrina, cletodim, haloxifop-P-metilo y dicamba. Se monitoreó la degradación de los herbicidas y se evaluaron actividades enzimáticas específicas durante 210 días, evidenciando la destacada capacidad de la biomezcla para reducir los compuestos a niveles prácticamente indetectables (Capítulo 1).

Adicionalmente, se propuso una innovadora prueba de monitoreo ecotoxicológico directa para evaluar la degradación de los herbicidas en los biolechos. Mediante la valoración de las lesiones visuales de *Eisenia fetida* expuestas a los herbicidas se calculó un Índice de lesión. Esta prueba mostró una mejor correlación con la degradación de los herbicidas en comparación con otras pruebas ecotoxicológicas estandarizadas, resaltando así la eficiencia de la evaluación del proceso de descontaminación (Capítulo 2).

La biomezcla desgastada o residual, es decir, que ya no posee actividad biológica para garantizar la remoción de herbicidas se clasifica como residuo peligroso debido a la posible presencia de contaminantes en concentraciones bajas o por la presencia de sus metabolitos. En este estudio, la biomezcla deteriorada se sometió a procesos de biorremediación, específicamente mediante la acción de las lombrices *E. fetida* y *A. trapezoides* (vermirremediación) y a través de la incorporación de material fresco (rastrojo de trigo). Se obtuvieron sustratos estables y maduros, que reunieron las condiciones para ser utilizados como biofertilizante. La especie *E. fetida* mostró mejor desempeño. Cabe destacar que el tratamiento que incorporó rastrojo de trigo se reveló como una estrategia particularmente prometedora para lograr la reciclabilidad eficiente de la biomezcla desgastada y su continuidad de uso en el biolecho (Capítulo 3).

En una investigación adicional realizada en la Universidad de Jaén, España, se llevaron a cabo evaluaciones de procesos de biotransformación utilizando diversos agro-residuos orgánicos provenientes de actividades de la producción de aceite de oliva y también estiércoles animales. Los análisis físicoquímicos, actividades enzimáticas y la evaluación del crecimiento y reproducción de las lombrices revelaron mejoras notables en estos parámetros, especialmente en los tratamientos intervenidos por *E. fetida*. Estos resultados aportaron valiosos conocimientos sobre cómo los procesos de biotransformación generaron recursos beneficiosos para la producción agrícola, subrayando la necesidad de continuar la investigación para maximizar los beneficios en la formación de enmiendas orgánicas (Capítulo 4).

Abstract

Bio-beds have emerged as a prominent strategy for the efficient management of pesticide residues in agriculture worldwide. These systems, composed of a biologically active biomixture, have been designed to enhance the degradation of pesticides through microbiological activity. In this study, the performance of a biomixture incorporating materials available in Argentina, such as wheat stubble, river waste, and soil, was evaluated. This was done to degrade a combination of pesticides, including the herbicides atrazine, prometryn, clethodim, haloxyfop-P-methyl, and dicamba. The degradation of pesticides was monitored, and specific enzymatic activities were assessed over 210 days, demonstrating the remarkable ability of the biomixture to reduce compounds to practically undetectable levels (Chapter 1).

Additionally, an innovative direct ecotoxicological monitoring test was proposed to assess pesticide degradation in bio-beds. By evaluating the visual injuries to earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to pesticides, a Lesion Index was calculated. This test showed a better correlation with pesticide degradation compared to other standardized ecotoxicological tests, highlighting the efficiency of the decontamination process assessment (Chapter 2).

The worn or residual biomixture, meaning it no longer has biological activity to ensure pesticide removal, is classified as hazardous waste due to the possible presence of contaminants in low concentrations or their metabolites. In this study, the deteriorated biomixture underwent bioremediation processes, specifically through the action of earthworms (*E. fetida*) and *A. trapezoides* worms (vermiremediation) and the incorporation of fresh material (wheat stubble). Stable and mature substrates were obtained, meeting the conditions to be used as biofertilizer. The *E. fetida* species showed better performance. It is worth noting that the treatment incorporating wheat stubble proved to be a particularly promising strategy for achieving efficient recyclability of the worn biomixture and its continued use in the bio-bed (Chapter 3).

In additional research conducted at the University of Jaén, Spain, evaluations of biotransformation processes were carried out using various organic agro-wastes from olive oil production activities and animal manure. Physicochemical analyses, enzymatic activities, and the assessment of earthworm (*E. fetida*) growth and reproduction revealed notable improvements in these parameters, especially in treatments involving earthworms. These results provided valuable insights into how biotransformation processes such as composting and vermicomposting/vermiremediation generated beneficial resources for agricultural production, emphasizing the need to continue research to maximize the beneficial characteristics in the formation of quality organic amendments (Chapter 4).

Introducción



1. Explorando el nuevo paradigma del modelo agro-productivo

En la década de los años sesenta, se gestó un fenómeno conocido como la Revolución Verde, cuyo objetivo fundamental consistió en fomentar la productividad agrícola en respuesta a las preocupaciones globales derivadas del crecimiento demográfico y la amenaza de hambruna. Este movimiento se ha extendido a nivel internacional, abarcando múltiples países y se ha llevado a cabo mediante la colaboración entre instituciones académicas y gubernamentales pertenecientes al norte global. Su impacto ha resultado ser de gran envergadura en los sistemas agro-productivos de América Latina e India (Bonanno, 1994).

Un sistema agro-productivo engloba la gestión y producción de alimentos, abarcando prácticas, técnicas y actividades vinculadas a las labores rurales. Durante la Revolución Verde, el enfoque se orientó hacia el aumento de la productividad agrícola. Como resultado, la producción mundial de los principales cereales, como el maíz, el trigo, el arroz y el sorgo, aumentó en aproximadamente mil millones de toneladas desde entonces, según estadísticas proporcionadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Estos cereales siguen siendo esenciales tanto en la alimentación humana como en la producción ganadera a nivel global y se estima que será necesario producir una cantidad igual de cereales para el año 2030 (Harrison, 2002).

A pesar de que la transición de la producción agrícola tradicional a la industrializada ha mejorado la eficiencia en los campos, generó un gran endeudamiento entre numerosos agricultores. Esta situación se debe a que el éxito en la producción agrícola a gran escala se ha logrado gracias a la promoción de obras de infraestructura, la disponibilidad de créditos y la implementación de programas de formación dirigidos a los agricultores. Además, se han agravado los conflictos ambientales, la pérdida de biodiversidad y el agotamiento de recursos naturales debido a los considerables cambios que han surgido con la expansión de las nuevas áreas agrícolas. Estos cambios incluyen prácticas como la deforestación, la introducción de variedades mejoradas de semillas, la contaminación derivada del uso sistemático de los agroquímicos para controlar las plagas y malezas de los cultivos, así como la implementación de sistemas de riego para garantizar un suministro constante de agua para los cultivos (Pimentel, 1996).

1.1. Evolución en el uso de los agroquímicos: los productos emergentes

En la transición hacia métodos agrícolas más tecnológicos, la comunidad agraria ha aceptado ampliamente el empleo de los agroquímicos, una tendencia reflejada en las estadísticas del consumo global anual (Diez Jerez et al., 2013). Según los datos proporcionados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) en 2011, se alcanzaron aproximadamente 2,5 millones de toneladas de agroquímicos consumidos; donde el 40% de este consumo corresponde al grupo de los herbicidas, seguidos por los insecticidas y fungicidas (Grube et al., 2011). Este patrón de consumo posicionó a los agroquímicos entre los productos más contaminantes

por la Unión Europea (2016) y se han convertido gradualmente en el centro de atención. Hasta el momento, se han identificado más de 400 productos diseñados para la protección de los cultivos, y los principales consumidores han sido China, Estados Unidos, Argentina, Tailandia, Brasil, Italia, Francia, Canadá, Japón e India (Manoli et al., 2019). El mercado de los agroquímicos en Argentina se ha expandido fuertemente, con un aumento en el consumo total de 73 a 236 millones de kilogramos por año en los últimos 10 años según informe de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFA, 2013). Durante la campaña del año 2011, los herbicidas han representado el 64% del volumen total de ventas en el mercado nacional, mientras que los insecticidas y fungicidas contribuyeron con un 16% y 12%, respectivamente. Este aumento se ha debido en gran parte a la rápida adopción del paquete tecnológico de la soja transgénica, resistente al herbicida glifosato de bajo costo, lo que ha consolidado al país como el segundo mayor consumidor de los herbicidas a nivel mundial (CASAFA, 2012). Sin embargo, es importante destacar que se evidenció un incremento del 23 % en las ventas nacionales de nuevos productos químicos que están comenzando a tomar participación, alcanzando un volumen total de 78 millones de kilogramos de herbicidas (CASAFA, 2013 y 2014).

La tendencia a la adopción de los herbicidas específicos se podría atribuir a la alta especificidad de los productos hacia el tipo de maleza y las condiciones estacionales de cada región en particular (Demetrio et al., 2022). En este contexto, es importante considerar que la amplia gama de productos químicos introduce una capa adicional de complejidad en su comportamiento en el entorno natural, debido a las diversas propiedades químicas, los grados de toxicidad y los mecanismos de acción implicados (Katagi, 2006).

En el contexto de los herbicidas emergentes, se destaca el aumento significativo en el uso de tres grupos de compuestos con modos de acción específicos. En primer lugar, se observa un incremento notable en la aplicación de compuestos inhibidores del fotosistema II, conocidos como triazinas. Estos afectan dicha estructura ubicada en la membrana de los tilacoides de los cloroplastos, que desempeña un papel crucial en el proceso de fotosíntesis. Ejemplos de estos inhibidores son la prometrina, utilizada para controlar malezas en el cultivo de algodón, y la atrazina, ampliamente utilizada en Estados Unidos, China y países en desarrollo, a pesar de su prohibición en la Unión Europea (Hansen et al., 2019). Ambos herbicidas son persistentes en aguas subterráneas y plantean amenazas para los sistemas endocrino, nervioso central e inmunológico, y se han asociado con la desmasculinización de ranas y la inhibición de plantas no objetivo, como mencionaron diversos autores en sus estudios (Alonso et al., 2018; Campos-Pereira et al., 2012; Chang et al., 2022; Gao et al., 2019; Garcia 2019; Hayes et al., 2010; Hu et al., 2021; Liu et al., 2019; Mosiichuk et al., 2018; Qu et al., 2017; Sánchez et al., 2017; Singh et al., 2018; Vonberg et al., 2014; Yue et al., 2017).

El segundo grupo de herbicidas que está ganando uso ha sido el de los inhibidores de la acetil-coenzima A (CoA) carboxilasa, como el cletodim, un herbicida selectivo para pastos; pero al ser hidrofílico, se ha convertido en un posible contaminante de cursos de agua (Chen et al., 2017). Dentro de este grupo, el haloxifop-P-metilo, empleado en cultivos como maíz, sorgo y caña de azúcar, ha sugerido posibles riesgos ya que es soluble en agua y se ha detectado en el río Songhua en China (Liu et al., 2023).

En el tercer grupo de herbicidas emergentes se encuentran los herbicidas hormonales, entre los que se encuentra el dicamba, reconocido por su selectividad postemergente frente a las malezas de trigo sarraceno (CASAFE, 2020). A pesar de la limitada información disponible sobre su degradación a lo largo del tiempo, su estructura química sugiere analogías con el 2,4-D. En un estudio llevado a cabo en Canadá (Waite et al., 2005), se identificaron concentraciones de dicamba, atrazina y otros ocho herbicidas en la atmósfera, atribuyendo su presencia al transporte atmosférico a largas distancias desde Estados Unidos, lo que enfatiza su persistencia en el medio ambiente. Estos productos químicos agrícolas han sido motivo de creciente preocupación debido a las amenazas que plantean tanto para el entorno natural como para la salud pública. Para enfrentar esta compleja problemática de contaminación y promover medidas preventivas, es crucial comprender cómo estos contaminantes ingresan al entorno.

1.2. Identificación de fuentes de contaminación ambiental: difusas y puntuales

Las fuentes de contaminación por agroquímicos se refieren a aquellos lugares, las actividades o los procesos que liberan contaminantes al entorno ambiental. En el caso de la contaminación ambiental causada por agroquímicos, se han identificado dos vías principales: las *fuentes puntuales* y las *fuentes difusas* (Carpenter et al., 1998; Massoud et al., 2006).

Las fuentes difusas se caracterizan por la liberación dispersa de los contaminantes desde diversas fuentes no identificadas y áreas geográficas extensas, siendo especialmente evidente en terrenos destinados al monocultivo. Estos contaminantes se desplazan hacia las aguas receptoras por la acción de lluvias intensas o debido al flujo superficial del suelo (Edwards & Withers, 2008).

Por otra parte, las fuentes puntuales se ubican en áreas donde los contaminantes ingresan a través de conductos confinados, normalmente necesitando obtener autorizaciones para su liberación o disposición final. No obstante, también se han identificado fuentes puntuales en áreas propensas al manejo descuidado de los agroquímicos, debido a los accidentes durante el llenado de los tanques de aspersión, tuberías defectuosas y boquillas con fugas, así como la acumulación negligente de los envases de los agroquímicos concentrados (Castillo et al., 2008). Estos incidentes, si no se gestionan adecuadamente, tienen el potencial de contaminar tanto el suelo como los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, siendo la principal causa de la contaminación por agroquímicos (Carter, 2000).

Para abordar la contaminación puntual, es esencial considerar la relación entre la toxicidad inherente de los productos involucrados y el nivel de exposición (frecuencia con la que los contaminantes pueden ingresar al entorno). Por lo tanto, una estrategia de mitigación viable podría ser la intervención directa en la fuente puntual, con el propósito de prevenir el nivel de exposición. En este contexto, las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) se presentan como una herramienta valiosa para reducir las posibilidades de liberación de los contaminantes al ambiente, al mismo tiempo que permite la continuidad de las prácticas agrícolas de manera responsable y sostenible (Diez Jerez et al., 2013).

2. Las Buenas Prácticas Agrícolas: los biolechos

Las Buenas Prácticas Agrícolas constituyen un conjunto de principios, normas y recomendaciones y técnicas aplicables a la producción, procesamiento y transporte de los alimentos. Su principal objetivo ha sido garantizar la protección de la higiene, la salud humana y el medio ambiente a través de métodos que sean ecológicamente seguros, higiénicamente aceptables y económicamente viables. En este marco, la gestión responsable de los fitosanitarios tuvo como meta garantizar el uso adecuado de los agroquímicos a lo largo de todo su ciclo de vida, desde su desarrollo hasta su eliminación, abarcando su comercialización y aplicación en el campo (CASAFA, 2020; Diez Jerez et al., 2013).

Por lo tanto, en situaciones donde existe el riesgo de que se produzcan los derrames accidentales de los agroquímicos, los *biolechos* o camas biológicas emergen como una estrategia tecnológica y sostenible para contener y degradarlos mediante la acción de microorganismos específicos. Estos sistemas de biopurificación sobresalen por su facilidad de operación, su estructura eficiente y su bajo costo (Torstensson & Castillo, 1997).

La versión original del biolecho sueco ha estado integrada por tres elementos dispuestos en un pozo de 60 cm de profundidad en el suelo, como se ilustra en la Figura 1 (Castillo et al., 2008). En una primera etapa, se ubica una base de arcilla en la parte inferior, con una profundidad de 10 cm. La arcilla, caracterizada por su baja permeabilidad y capacidad de absorción, desempeña el papel de barrera impermeable frente al entorno circundante. Asimismo, existe la posibilidad de mejorar la impermeabilización mediante un revestimiento en las paredes laterales y el fondo, utilizando una membrana, como una geomembrana, u otro material impermeable. Este revestimiento actúa como una barrera adicional para prevenir la percolación de los líquidos residuales de la pulverizadora hacia las capas de suelo contiguas y subyacentes al lecho biológico, evitando de esta manera el acceso a las napas de agua subsuperficiales.

Luego se llena el biolecho con la biomezcla (50 cm restantes), núcleo esencial del sistema. La eficacia de este sistema se encuentra estrechamente ligada a cada uno de los componentes que conforman la biomezcla, ya que cada uno de ellos desempeña un papel fundamental en la retención y la degradación de los agroquímicos (Torstensson & Castillo, 1997). La biomezcla

original está compuesta específicamente por la paja, que es un material lignocelulósico, turba como sustrato orgánico humidificante y suelo en una proporción de 50:25:25 % en volumen. En esta mezcla, la paja ocupa un rol central como sustrato principal, ya que los hongos encargados de degradar la lignina son activos en este proceso y generan enzimas que han demostrado ser altamente efectivas en la degradación de los agroquímicos. Por otro lado, el suelo aporta capacidad de adsorción y los microorganismos adaptados a los agroquímicos usados en campo especialmente bacterias. La inclusión de turba en la biomezcla contribuye a la capacidad de adsorción, al control de la humedad y a la degradación abiótica de los agroquímicos (Vischetti et al., 2007).

La relevancia de los biolechos reside en la necesidad de preservarlos de las precipitaciones, dado que estas pueden afectar el contenido de humedad de la biomezcla. Por lo que se podría recubrir el biolecho con una capa de césped, la cual desempeña un papel crucial en la regulación de la humedad, facilitando el transporte ascendente de agua y posiblemente estimulando la exudación de enzimas esenciales para la degradación de agroquímicos por parte de las raíces (Vaughan et al., 1994). La omisión de esta capa de césped puede conllevar a una deficiente evapotranspiración, disminuyendo la actividad microbiológica y aumentando el riesgo de lixiviación de agroquímicos (Fogg et al., 2004; Henriksen et al., 2003; Wilde et al., 2007). No obstante, su inclusión no siempre es factible, especialmente al emplear herbicidas, ya que esto dificulta su supervivencia. Otras alternativas podrían incluir la construcción de un techo o el mantenimiento de una cobertura plástica que impida el ingreso de agua de lluvia, al tiempo que posibilita la circulación de aire para favorecer la evaporación cuando no se está utilizando (IRAM 29.561/2020)

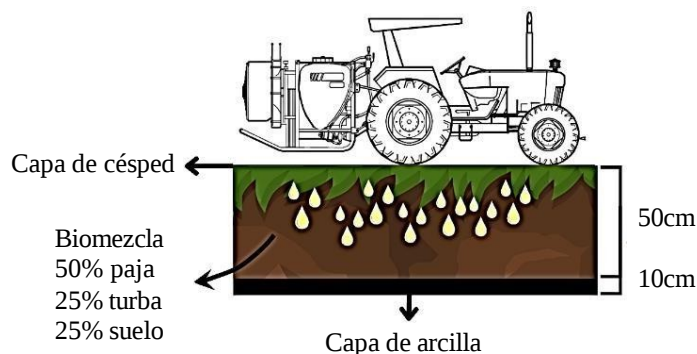


Figura 1. Representación inicial del biolecho sueco que detalla los distintos componentes (Figura adaptada de Castillo et al., 2008).

Con el fin de mantener los bajos costos de los biolechos en diversas regiones y favorecer el reciclaje de agro-residuos locales, resulta fundamental adecuar el diseño de las biomezclas a las condiciones particulares de cada lugar y modificar la composición de dichas biomezclas según sea necesario. En este contexto, se han explorado alternativas al sustrato orgánico humidificante, ya que la turba resulta costosa en regiones donde su disponibilidad limitada. Estas alternativas han incluido el uso de diferentes materiales que pasan por procesos de biotransformación como

compost o vermicompost (Gao et al., 2015; Karas et al., 2015; Omirou et al., 2012). Además, otros estudios han logrado reemplazar exitosamente la paja con materiales lignocelulósicos de fácil obtención, como tallos de uva o los residuos de cultivos de algodón (Karanasios et al., 2010), la fibra de coco (Chin-Pampillo et al., 2016), la paja de maíz (Góngora-Echeverría et al., 2018) y caña de azúcar (Saez et al., 2018).

El creciente interés global en la búsqueda de alternativas sostenibles resalta la importancia y el potencial de esta tecnología. Numerosas investigaciones en países como Inglaterra, Bélgica, Italia, Francia y Dinamarca han dado lugar a una variedad de enfoques de tratamiento, tales como biofiltros, lechos de biomasa, y sistemas como Fitobac y Biobac (Coppola et al., 2007; Fait et al., 2007; Fogg et al., 2003, 2004; Pietrantoni, 2004; Spliid et al., 2006; Vischetti et al., 2004; Wilde et al., 2007). En América Latina, países como Uruguay, Brasil, Costa Rica y Chile han manifestado un interés en constante crecimiento hacia la adopción de esta técnica agrícola innovadora (Rivero et al., 2022; Dias et al., 2021; Acosta-Sánchez et al., 2020; Briceño et al., 2014). La Figura 2 proporciona ejemplos concretos de estos avances en el mundo. En el caso de Argentina, se han identificado soluciones locales que se suman a la tendencia. Un ejemplo es el aprovechamiento de la resaca de río, que son los residuos vegetales fluviales acumulados en condiciones anaeróbicas en el delta del Río Paraná y se utiliza para la producción de flores, como una alternativa a la turba. En cuanto a la paja, dada la considerable producción de cereales en el país, se han explorado una amplia gama de opciones, centrándose en materiales lignocelulósicos como el rastrojo de trigo y la paja de alfalfa (Lescano et al., 2022; Masin et al., 2018). En el estudio realizado por Lescano et al. (2018), se ha identificado una combinación altamente efectiva de rastrojo de trigo, resaca de río y suelo para la degradación del glifosato. Esta combinación merece una investigación más detallada para evaluar su eficacia en comparación con otros herbicidas.



Figura 2. Diversas estrategias para la adaptación de los biolechos en el mundo

Otro aspecto crucial en la gestión de los biolechos es el monitoreo de la disminución del volumen de la biomezcla. Esta reducción se debe a la degradación natural de los materiales constituyentes, provocada por la intensa actividad microbiológica. Diversos factores ambientales, como las condiciones climáticas locales, influyen en este proceso. Por lo tanto, se recomienda la incorporación anual de biomezcla fresca antes del comienzo de la temporada de fumigación. Además, es importante tener en cuenta que las biomezclas desgastadas, después de su uso, pueden contener residuos de agroquímicos; por lo que se consideran residuos peligrosos. Estas trazas de productos pueden provenir de aplicaciones recientes, incluso momentos antes de eliminar el material retirado, o de la gradual degradación de agroquímicos persistentes que aún no se ha completado (Torstensson, 2000). Se sugiere llevar a cabo una renovación completa de la biomezcla cada 5 a 8 años (Delgado-Moreno et al., 2020) y el material desgastado debe someterse preferentemente a un tratamiento de biorremediación, el cual se detallará más adelante (inciso 2.1).

2.1. Gestión sostenible de los biolechos: monitoreo integrado

Para asegurar un funcionamiento efectivo de los biolechos, es crucial llevar a cabo mediciones analíticas periódicas de la carga contaminante presente. Estas mediciones son esenciales para garantizar la eficacia del sistema y prevenir la acumulación excesiva de agroquímicos en la biomezcla. Métodos avanzados como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se utilizan para cuantificar la presencia de agroquímicos en la biomezcla (Acosta-Sánchez et al., 2020; Fernandez et al., 2022; Papazlatani et al., 2019; Ruiz-Hidalgo et al., 2015).

Es importante destacar que la mera ausencia de detección de un agroquímico no garantiza la completa descontaminación de la biomezcla. El proceso de degradación puede dar lugar a la formación de intermediarios potencialmente más tóxicos, como se ha observado en estudios realizados por Santiago et al. (2018) y Sirtori et al. (2014). En ocasiones, la toxicidad de estos agroquímicos se debe a la acción de sus metabolitos que generalmente son más polares y más tóxicos que su compuesto original. En el caso de las triazinas, como la atrazina, se han identificado los productos de degradación desetilatrizona (DEA) y deisopropilatrizona (DEIA) (Singh et al., 2018). Según la base de datos de propiedades de agroquímicos (PPDB), la prometrina se degrada con oxidación del grupo metilotio a hidroximetabolitos. El cletodim se metaboliza principalmente a cletodim sulfóxido, cletodim sulfona y sulfóxido imina (Atzei et al., 2021). El haloxifop-P-metilo se transforma en haloxifop-ácido (Buerge et al., 2015) y el dicamba presenta el principal metabolito ácido-3,6-diclorosalicílico (PPDB). Sin embargo, es importante tener en cuenta que aún hay muchos productos no identificados y cuantificar todos los metabolitos presentes en la biomezcla es una tarea compleja debido a la diversidad y bajas concentraciones de estos compuestos.

Para afrontar estos desafíos, se han explorado soluciones adicionales a los métodos analíticos convencionales para supervisar la degradación de los contaminantes en una biomezcla. Aquí es donde entra en juego el monitoreo integrado, una propuesta innovadora para abordar los aspectos críticos en los biolechos. El monitoreo integrado no se limita solo a seguir el proceso de degradación de un contaminante en particular, sino que implica una evaluación más completa desde diferentes perspectivas.

Parte de este enfoque considera la supervisión de los cambios ecotoxicológicos mediante el uso de bioindicadores. Estos bioindicadores, que pueden ser organismos, partes de organismos o comunidades de organismos, se emplean para obtener información sobre la calidad de una muestra o el entorno natural. Son especialmente valiosos debido a su sensibilidad y capacidad de respuesta ante perturbaciones ambientales. Además, los bioindicadores poseen la capacidad de integrar información sobre la salud del ecosistema, proporcionando así una evaluación multifacética que contribuye a aumentar la confiabilidad de los resultados y a lograr un entendimiento completo del sistema (Alkorta et al., 2003).

En los biolechos, el monitoreo de las actividades enzimáticas podría servir como una herramienta potencial de monitoreo. Esta alternativa es viable debido a lo mencionado previamente: el material lignocelulósico favorece la proliferación de hongos esenciales en la descomposición de la lignina, en particular, el hongo de pudrición blanca. Este hongo genera enzimas especializadas, como peroxidasas y lacasas, que desempeñan un papel fundamental en este proceso (Kirk & Farrell, 1987). Estas enzimas son altamente específicas y eficaces en la degradación de diversos compuestos clorados, colorantes y diversos agroquímicos (Castillo et al., 2000; Castillo et al., 2001; Coppola et al., 2007; Hirai et al., 2004; Kotterman et al., 1998; Paszczynski & Crawford, 1995; Pizzul et al., 2009; Vischetti et al., 2007; Wesenberg et al., 2003). Las investigaciones sobre la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) han sido fundamentales para avanzar en la dinámica microbiológica en diferentes tipos de sustratos (Schnurer & Rosswall, 1982; Adam & Duncan, 2001). La capacidad de la FDA para servir como indicador indirecto de la actividad biológica del sustrato, al ser hidrolizada por enzimas activas, proporciona una medida indirecta de la actividad biológica del sustrato.

Es importante señalar que los agroquímicos pueden perturbar la actividad de las comunidades microbiológicas, las cuales pueden manifestarse de diversas maneras, ya sea mediante el agotamiento de sustratos que sirven como fuente nutricional o mediante la eliminación completa de la microbiota debido a su elevada toxicidad. En este sentido, numerosos estudios respaldan la idea de que la disipación de la mayoría de los agroquímicos en una mezcla está correlacionada con la actividad de las enzimas fenoloxidasas (FOX) y/o la respiración basal (Vischetti et al., 2007). Además, se ha documentado la degradación de agroquímicos individuales por hongos de pudrición blanca, subrayando la participación activa de peroxidasas en este proceso. Por lo tanto, el monitoreo detallado del comportamiento de las comunidades microbiológicas se ha

convertido en una herramienta valiosa en la evaluación del biolecho y reflejan su relación con la degradación de los contaminantes (Dias et al., 2021; Fernandez et al., 2022; Khalid et al., 2020; Lescano et al., 2018; Masin et al., 2018; Tortella et al., 2012).

En la búsqueda de avanzar en la comprensión del funcionamiento de los biolechos y mejorar la evaluación del desempeño de la biomezcla, resulta altamente beneficioso incorporar pruebas con bioindicadores que representen diversos grupos taxonómicos. Un ejemplo común en ensayos ecotoxicológicos es el uso de *Daphnia magna*, un microcrustáceo de agua dulce, en ensayos que involucran lixiviados extraídos de biomezclas (Ruiz-Hidalgo et al., 2015). Al tratar la degradación del insecticida/nematicida carbofurano en combinación con clorpirifós, varios estudios informaron una eliminación casi completa de la toxicidad basada en pruebas de inmovilización aguda en *Daphnia magna*. Además, se han examinado las respuestas fisiológicas en peces como *Oreochromis aureus* y *Oncorhynchus mykiss* en relación con procesos de desintoxicación de matrices contaminadas (Acosta-Sánchez et al., 2020; Rodríguez-Rodríguez et al., 2018). En este contexto, los organismos utilizados en los estudios proporcionan información integral sobre el estado de las biomezclas, considerando el entorno como un tejido interconectado, donde las perturbaciones en un nivel pueden incidir en todo el sistema.

En la búsqueda de indicadores idóneos, también se han examinado pruebas fundamentadas en plantas superiores, destacadas por su simplicidad, sensibilidad y eficacia en el monitoreo ambiental. La Organización Internacional de Normalización (ISO), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) han emitido recomendaciones sobre el uso de *Lactuca sativa* como una especie vegetal modelo en pruebas de fitotoxicidad. Esta elección se basa en su susceptibilidad de *L. sativa* a los compuestos químicos en contraste con otras especies vegetales. Las pruebas se centran en la evaluación de la germinación de las semillas y el desarrollo de las raíces (Lyu et al., 2018; Oliveira et al., 2018).

Por otra parte, el uso de invertebrados terrestres como colémbolos o lombrices de tierra (oligoquetos terrestres) presentan la ventaja de que se pueden aplicar directamente sobre la biomezcla a evaluar (Carniel et al., 2020; Dias et al., 2020; Masin et al., 2018). Estos organismos han sido utilizados en pruebas de toxicidad crónica, es decir, evaluando principalmente la reproducción en biomezclas contaminadas. En este sentido, las lombrices de tierra, representan una porción sustancial de la biomasa presente en el suelo, desempeñan una función crucial en su funcionalidad, con implicaciones de gran relevancia en lo que respecta a la estructura del suelo, el ciclo de nutrientes y la composición microbiológica (Blouin et al., 2013). Estas especies se consideran indicadores ecotoxicológicos apropiados debido a su extrema sensibilidad a concentraciones bajas de contaminantes (Oliveira et al., 2018; Yang et al., 2017). En consecuencia, las pruebas de toxicidad aguda con lombrices, empleando especies como *Eisenia*

fetida o *Eisenia andrei*, han sido adoptadas universalmente para evaluar el impacto ambiental de sustancias químicas antropogénicas, tales como agroquímicos, hidrocarburos y metales (Edwards & Bohlen, 1996; Pelosi et al., 2014). Por tanto, es esencial optar por un enfoque de monitoreo que se apoye en las respuestas de bioindicadores pertenecientes a diversos grupos taxonómicos. Esta elección podría enriquecer la comprensión sobre la eficacia de estos sistemas y, simultáneamente, proporcionaría una perspectiva más completa de los procesos involucrados.

2.1.1. Innovación en el monitoreo integrado: Prueba de Lesión en *E. fetida* para biolechos (*in situ*)

La utilización de pruebas ecotoxicológicas para evaluar la carga contaminante en un biolecho emerge como una herramienta valiosa en la gestión, permitiendo una evaluación sólida y confiable de su descontaminación. Sin embargo, una limitación se presenta al intentar evaluar los efectos en los organismos expuestos a concentraciones elevadas de contaminantes, dado que los organismos muestran una notable sensibilidad incluso a niveles bajos de contaminación. No obstante, se podría emplear una estrategia para obtener información adicional acerca de lo que ocurre en el biolecho al retirar a los organismos y observar las alteraciones morfológicas y lesiones en la epidermis. La suposición subyacente es que estas lesiones podrían proporcionar datos reveladores sobre el grado de contaminación, actuando como indicadores de exposición, siempre y cuando se logren identificar patrones de lesiones consistentes en su aparición. En este contexto, diversos estudios han identificado cambios morfológicos en las lombrices de tierra cuando se someten a la exposición a diferentes contaminantes. Por ejemplo, en Venkateswara Rao et al. (2003) estudiaron a *E. fetida* cuando se la expuso a insecticidas organofosforados, encontrando como respuesta el exudado de líquido celómico. En Chakra Reddy & Venkateswara Rao (2008) examinaron los cambios morfológicos en *E. fetida* expuesta a otro insecticida organofosforado, profenofos. Además, en Gupte et al. (2013) observaron que la especie *Pheretima postuma* presentaba síntomas morfológicos, como la desaparición de la pigmentación, en presencia de tintes como el Rojo BS y el Rojo de Metilo. En Rodríguez et al. (2013) examinaron a *E. fetida* expuesta a cadmio y observó protuberancias en toda la superficie del cuerpo. En Homa et al. (2016) estudiaron los efectos de metales como el cobre, níquel y cadmio en *Allolobophora chlorotica*, lo que resultó en malformaciones, anomalías e interrupción de segmentos. En años posteriores, Selvan Christyraj et al. (2020) investigaron la capacidad de curación de heridas y regenerativa en *Eudrilus eugeniae*, y en el estudio de Subbiahanadar Chelladurai et al. (2020) examinaron los efectos de la radiación ultravioleta (UV-C) en *Perionyx excavatus*. Estos estudios han mejorado la comprensión de los efectos de varios contaminantes en la morfología de las lombrices, aunque ninguno ha intentado definir un umbral de toxicidad para estas lesiones.

Considerando estos aspectos, es necesario buscar una alternativa de monitoreo para detectar cómo afectan los contaminantes durante el proceso de degradación en su conjunto. Esta iniciativa busca, además, la capacidad de distinguir la gravedad de las lesiones en comparación con otras y, en lo posible, contar con un registro visual que permita llevar a cabo el monitoreo en el lugar contaminado. Este enfoque se presenta como ventajoso debido a su accesibilidad y aplicabilidad en el terreno. No obstante, la obtención de este registro visual representa un desafío crítico que requiere una investigación profunda sobre la correlación entre los diferentes niveles de lesiones biológicas y el grado de toxicidad inherente a la muestra en cuestión.

2.2. Biorremediación de las biomezclas desgastadas

Las biomezclas desgastadas que son retiradas del sistema del biolecho deben ser reemplazadas ya que podrían contener trazas de contaminantes, lo que requiere la aplicación de tratamientos especiales. Para abordar este desafío, se han empleado diversas tecnologías, como la dispersión, el depósito en vertederos y la incineración. Sin embargo, es importante destacar que estas técnicas suelen ser costosas y pueden llevar a la transferencia de residuos de agroquímicos a otros entornos. Por lo tanto, resulta esencial llevar a cabo un proceso de descontaminación de las biomezclas desgastadas antes de su eliminación definitiva o de considerar su posible reutilización. Desde una perspectiva ambiental, las técnicas de biorremediación se destacan como un enfoque beneficioso y económicamente viable. Entre estas técnicas, los procesos de biotransformación son especialmente relevantes, ya que contribuyen de manera significativa al reciclaje, la biodegradación, la bioestabilización y la biomaduración de una amplia gama de desechos orgánicos (Delgado-Moreno et al., 2020). La biotransformación, mediante la incorporación de diversos materiales disponibles, constituye un proceso aeróbico que emplea microorganismos para estabilizar residuos agrícolas. La función crucial de estos microorganismos radica en la regulación, a través de sus enzimas, de la transformación y descomposición de la materia orgánica, generando nutrientes en forma más accesibles para los cultivos (Bowles et al., 2014; Diaz-Ravina et al., 1993).

La biotransformación con la colaboración de las lombrices de tierra se presenta como otro eficaz enfoque de biorremediación. Estas lombrices modifican el entorno de manera significativa, promoviendo las interacciones entre las comunidades microbiológicas y el sustrato. *E. fetida* es una lombriz de tierra que vive en la superficie del suelo (epigea), se alimenta principalmente de restos de materia orgánica en descomposición. Es ampliamente reconocida como la lombriz de tierra más utilizada en los procesos de biotransformación debido a su ubicuidad, alta tasa de reproducción, ciclo de vida corto y alta tolerancia a las condiciones cambiantes (Domínguez & Gómez-Brandón, 2012). La biotransformación con lombrices de tierra ha demostrado ser un proceso eficaz para eliminar contaminantes orgánicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, agroquímicos), incluso en algunos sustratos complejos como lodos de depuradora (Rorat et al., 2017; Suthar et al., 2014) o metales pesados en cenizas de carbón (Usmani et al., 2017). Además,

el uso de vermicompostaje como enmienda del suelo redujo la disponibilidad y movilidad de metales potencialmente tóxicos (Jordão et al., 2011; Liu et al., 2019) y agroquímicos (Fernández-Bayo et al., 2015; Masin et al., 2018) lo que favorece su eliminación en los suelos (Delgado-Moreno & Peña, 2009). Finalmente, diferentes estudios han informado que la inoculación de suelos contaminados con diferentes especies de lombrices, incluida *E. fetida*, directamente o en combinación con materia orgánica, mejoró la degradación y la eliminación de una amplia gama de contaminantes ambientales (Lin et al., 2012; Rodríguez-Campos et al., 2014; Shi et al., 2020). La efectividad de los procesos de biotransformación en la eliminación de los contaminantes ambientales en diversas matrices constituye la base científica que respalda su utilización en la descontaminación de las biomezclas desgastadas. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Delgado-Moreno et al. (2020), que exploró el potencial de la vermicorremediación para reciclar biomezclas contaminadas con diuron, imidacloprid, tebuconazole, oxyfluorfen y dimethoate, obteniendo resultados satisfactorios para el diuron y el oxyfluorfen. Asimismo, en el trabajo de Zenteno-Rojas et al. (2019) obtuvieron resultados favorables en la realización de una biotransformación con *E. fetida* para eliminar decaclorobifenilo y además se destacó la capacidad de las bacterias del intestino de la lombriz de tierra para degradar dicho contaminante. En consecuencia, complementar este proceso con procesos de biorremediación podría mejorar significativamente la eficiencia en la implementación de los biolechos.

3. Biorremediación aplicada a diferentes agro-residuos

El manejo de residuos agrícolas se enfrenta a desafíos crecientes debido al aumento en la producción, generando acumulaciones con composiciones variables que aumentan los riesgos ambientales, desde posibles incendios hasta infecciones. Este problema se agrava especialmente en el caso de residuos con altos niveles de nitrógeno y lignina, como los rastrojos de cereales o los restos de olivos, presentando notables desafíos ambientales. En España, liderada por Andalucía, se destinaron aproximadamente tres millones de hectáreas al cultivo de olivos (Losa, 2020), y surgieron nuevos productores en países como Argentina, Australia y Sudáfrica (Roig A et al., 2006), siendo Argentina un ejemplo destacado con un notable crecimiento en este sector, totalizando 90.000 hectáreas de plantaciones tradicionales y cultivos de alta densidad (Federación Olivícola Argentina, Subsecretaría de Agricultura de la Nación). Específicamente, el alpeorujo u orujo de oliva, un subproducto de la extracción de aceite de oliva, es un residuo sólido de color marrón con una composición rica en agua, aceite residual, fibra, potasio y polifenoles, caracterizándose por su baja concentración de metales pesados. A pesar de estas propiedades, su abundancia representa un desafío para las industrias debido a su alta fitotoxicidad, su potencial contaminante y los costos asociados a su eliminación adecuada (Medouni-Haroune et al., 2018).

La gestión inadecuada de estos residuos puede tener consecuencias ambientales negativas, destacando la importancia de un manejo adecuado antes de verterlos sin tratamiento en terrenos o cuerpos de agua (Arias-Estévez et al., 2008; Bermúdez-Couso et al., 2007; Espigares et al., 1997; Hildebrandt et al., 2008; Sánchez-Camazano et al., 2005; Vega et al., 2005). Frente a esta problemática, la biorremediación se presenta como una alternativa de investigación para convertir este tipo de residuo en recursos de alta calidad. Evaluar la viabilidad de este enfoque no solo contribuirá a una gestión efectiva de los residuos agrícolas, sino que también fomentará prácticas sostenibles en la agricultura, beneficiando tanto al medio ambiente como a la producción agrícola.

Objetivo general

Evaluar a escala de laboratorio estrategias de degradación de corrientes residuales con altas concentraciones de agroquímicos y de valorización de subproductos agroindustriales.

Objetivos Específicos

- Diseñar sistemas de biopurificación (biolechos a escala laboratorio) para el tratamiento de efluentes líquidos contaminados con agroquímicos.
- Incorporar bioensayos con oligoquetos terrestres y semillas para monitorear la degradación de los agroquímicos en las biomezclas empleadas.
- Diseñar y desarrollar un índice para el seguimiento de la degradación de los agroquímicos teniendo en cuenta los efectos morfológicos lesivos observados en la lombriz de tierra, *E. fetida*.
- Evaluar la toxicidad final de las biomezclas para establecer la inocuidad y posibilidad de su eventual reutilización como enmiendas o abonos.
- Evaluar el vermicompostaje como vía de valorización del alpeorujo.

Capítulo 1

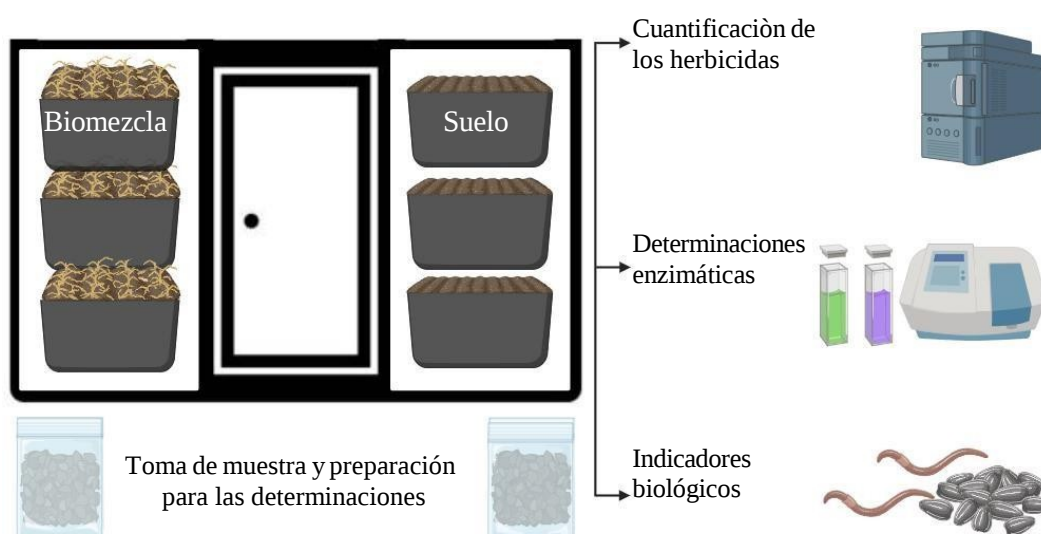
Diseño y desarrollo de un biolecho a escala de laboratorio para la remediación de agua contaminada con agroquímicos



Introducción

Los biolechos buscan la degradación de plaguicidas mediante la actividad de microorganismos estimulados por sus materiales constituyentes, entre los que se destacan el hongo de pudrición blanca y las bacterias que poseen enzimas lignolíticas de relevancia en el proceso de degradación. En este capítulo se detalla el trabajo de preparación de una biomezcla compuesta por rastrojo de trigo, resaca de río y suelo en proporciones específicas para favorecer la degradación de cinco herbicidas de amplio uso regional y mundial (atrazina, cletodim, prometrina, haloxifop-P-metilo y dicamba). Se realizó una cuantificación detallada de la degradación de todos los agroquímicos en la biomezcla y el monitoreo de las actividades enzimáticas involucradas en el proceso (FDA y FOX) durante el ensayo de degradación que se extendió por 210 días con registros periódicos. Además se incorporaron ensayos de degradación de los agroquímicos en suelo a los fines de comparar la degradación con la biomezcla.

Resumen gráfico



Objetivo

- Diseñar y desarrollar un biolecho a escala de laboratorio para la remediación de agua contaminada con agroquímicos

Materiales y métodos

1. Preparación de los materiales que componen la biomezcla

Los componentes que conformaron las biomezclas preparadas consistieron en rastrojo de trigo, resaca de río y suelo. El rastrojo de trigo y el suelo fueron obtenidos de una parcela ubicada en Monte Vera, provincia de Santa Fe, Argentina (Figura 3a). Se seleccionó específicamente el

período posterior a la cosecha para la adquisición de estos elementos. Esta decisión conlleva ventajas considerables, ya que implica que dichos componentes han estado previamente expuestos a agroquímicos, lo que, a su vez, posiblemente haya promovido la formación de una microflora adaptada en estos sustratos. Posteriormente, los materiales recolectados se transportaron a lo largo de una distancia de 15 km hasta el predio CONICET "Dr. Alberto Cassano", Santa Fe (Figura 3a). Las labores de preparación de los materiales se desarrollaron en el edificio de Planta Piloto del INTEC.

Para triturar el rastrojo de trigo, se utilizó una astilladora Bear Cat-5540 adaptada para trabajar junto a una maquinaria agrícola (Figura 3b y c). Esto permitió fragmentar el rastrojo hasta alcanzar dimensiones de 3 cm. Este material lignocelulósico, conocido por su densa estructura de fibras, proporcionó un entorno propicio para la proliferación de microorganismos altamente especializados en la degradación de los herbicidas objetivo. El suelo se extrajo de la capa superficial que abarcó los primeros 15 cm del perfil. Luego, se sometió a un proceso de desecación natural al aire libre. Una vez seco, se llevó a cabo un análisis visual para identificar y eliminar cualquier componente que pudiera obstaculizar el proceso, luego se tamizó a través de una malla con aberturas inferiores a 3 mm. La resaca de río fue un producto comercial, adquirido en el vivero Santa Isabel, ubicado en la Ruta 1 km 0,2 en Colastiné, Argentina. Fue utilizado directamente desde el envase, sin haber sido sometido a ningún tipo de proceso de modificación. Los materiales acondicionados pueden verse en la Figura 3b y sus principales características fisicoquímicas se presentan en la Tabla 1.

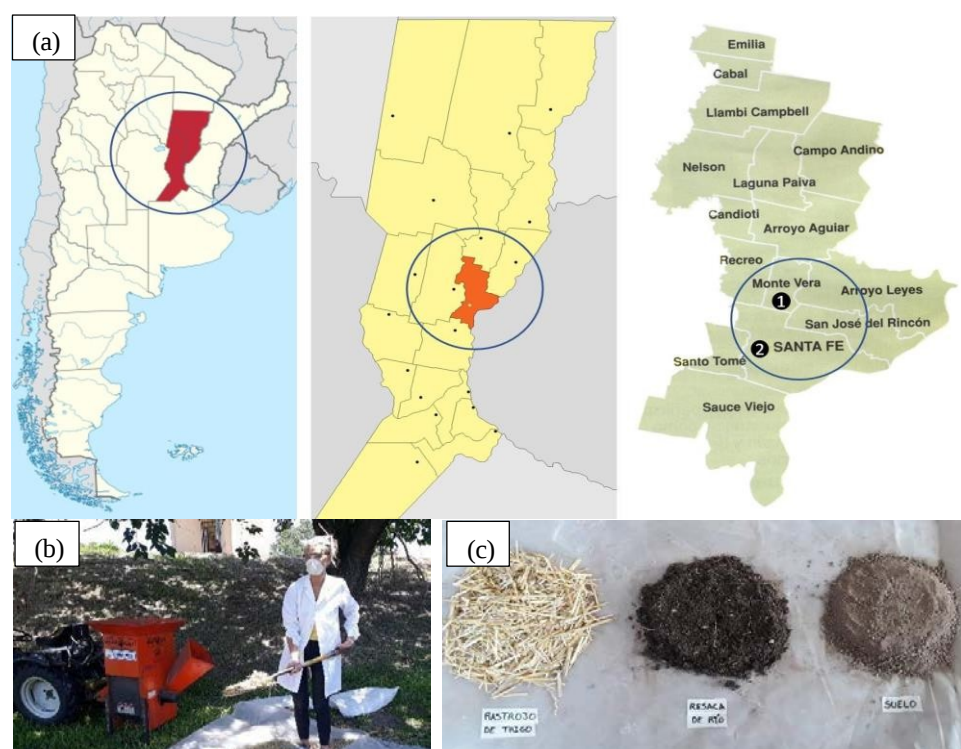


Figura 3. (a) Lugares de realización del ensayo y de extracción de los materiales 1) Monte Vera, 2) Santa Fe (b) Preparación de materiales para la construcción de la biomezcla; (c) Materiales previamente listos para mezclar.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los materiales que conforman la biomezcla (sobre peso seco).

	Rastrojo de trigo	Resaca de río	Suelo
pH	6,6	6,0	6,2
Conductividad Eléctrica (CE) (uS/cm)	1430	1090	2450
Materia orgánica (MO) (%)	92,2	3,4	5,5
Cenizas (%)	7,8	94,8	94,5
C/N	79,6	1,5	20,2

2. Armado y maduración de los biolechos

La combinación de materiales se llevó a cabo según las siguientes proporciones: 50% de rastrojo de trigo, 25% de resaca de río y 25% de suelo, medidos en términos de volumen. Esta mezcla fue dispuesta sobre una lámina de polietileno y sometida a una homogeneización meticulosa con la ayuda de una máquina mezcladora. Posteriormente, la mezcla se distribuyó en tres recipientes plásticos con dimensiones de 20 × 30 × 13 cm (Figura 4a-c). Además, se llevó a cabo paralelamente otro ensayo utilizando únicamente suelo como grupo de control para la comparación de la degradación con la biomezcla. Se utilizaron tres réplicas en cada caso.

Las unidades experimentales fueron dejadas en reposo durante un período de cuatro meses para permitir una adecuada maduración. A lo largo de este intervalo, se mantuvo un nivel de humedad constante dentro del rango del 60-70% mediante la adición controlada de agua del grifo; y la temperatura ambiente durante ese período se mantuvo en torno a los 29 ± 5 °C. Durante esta fase, se realizaron mediciones del pH, conductividad eléctrica (CE) y el contenido de materia orgánica (MO) en las muestras. Adicionalmente, se llevó a cabo una inspección visual diaria de las mezclas biológicas con el fin de detectar cualquier indicio de la presencia del hongo de pudrición blanca. Dado que este hongo presenta enzimas lignolíticas que tienen una importancia particular en nuestro estudio, debido a su capacidad demostrada para degradar agroquímicos, se dedicó especial atención a su detección y al monitoreo de las actividades enzimáticas relevante. Los métodos utilizados se describen detalladamente más adelante. Luego de la maduración de los materiales que conformaron la biomezcla, se procedió a la aplicación de los herbicidas.

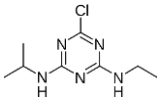
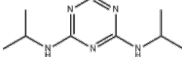
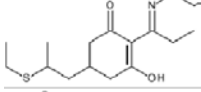
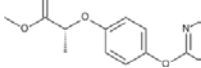
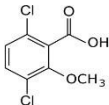


Figura 4. (a) Mezcla de todos los materiales en las proporciones adecuadas para la confección de la biomezcla; (b) Biomezcla a escala de laboratorio (triplicado); (c) Controles de suelo a escala de laboratorio (triplicado).

3. Pulverización de los herbicidas

Cada biomezcla y cada control con suelo se pulverizó sobre la superficie utilizando una solución de los herbicidas de manera que las concentraciones iniciales en la biomezcla fueron las siguientes: 75 mg/kg atrazina, 75 mg/kg prometrina, 65 mg/kg cletodim, 85 mg/kg haloxifop-P-metilo y 170 mg/kg dicamba. Las biomezclas se mezclaron y se dejaron equilibrar durante 24 h. Los herbicidas utilizados, en formulaciones comerciales, fueron: Indusquim 50% (v/v) para atrazina, Red Surcos 18,5% (v/v) para prometrina, Red Surcos 24% (v/v) para cletodim, Chimagro 52% (v/v) para haloxifop-P-metilo y Red Surcos 20% (v/v) para dicamba. El uso de estas formulaciones comerciales contribuyó a lograr una simulación más precisa de las condiciones agrícolas. Las propiedades fisicoquímicas de los herbicidas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los herbicidas empleados en el ensayo de degradación.

Principio activo	Fórmula química	Grupo químico	Solubilidad (mg/L) ^{a,b}	K _{oc} ^{a,b,c}	DT 50 (días) ^d
Atrazina (ATZ)		Triazina	35	100	75
Prometrina (PRO)		Triazina	33	400	60
Cletodim (CLE)		Oximas de ciclohexanodiona	5450	8000	0,55
Haloxifop-P-metilo (HAL)		Ariloxifenoxipropionato	7,9	Poca movilidad	55
Dicamba (DIC)		Acido benzoico	250000	3,45-34	7-28

^a Datos de PPDB: Base de datos de propiedades de herbicidas, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/es/index.htm>.

^b Solubilidad en agua a 20 °

^c Datos de PubChem: base de datos de sustancias químicas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

^d Tiempo para una degradación del 50% en el suelo (aeróbico) – Típico

4. Monitoreo integrado a lo largo del proceso de degradación de los herbicidas en la biomezcla

Se recolectaron muestras de la biomezcla siguiendo el esquema detallado en la Tabla 3. Este capítulo se centra en el análisis de la degradación de herbicidas en la biomezcla, así como en el monitoreo de las actividades enzimáticas. En el capítulo 2 se profundizará en los indicadores biológicos. Además, se llevó a cabo un monitoreo regular del pH, la conductividad eléctrica (CE) y la temperatura tanto en la biomezcla como en el entorno ambiental a lo largo de los 210 días del ensayo. En las cajas con suelo, solamente se supervisó la degradación de los herbicidas. Cada día del cronograma, se extrajeron aproximadamente 100 g de muestra de toda la profundidad de cada unidad experimental y de diversas ubicaciones. Posteriormente, las muestras recolectadas fueron sometidas a un proceso de secado natural en un entorno protegido de la luz, seguido de una molienda con mortero manual para garantizar la homogeneidad en los análisis posteriores.

Tabla 3. Cronograma de monitoreo de los biolechos.

Día	Herbicidas (*)	Enzimáticos		Indicadores biológicos		
		FDA	FOX	Germinación (IG)	Evitación (Ia)	Lesion (Ii)
S/P (**)		√	√			
0	√	√		√	√	√
5	√					
10	√	√	√			
15	√					
20	√	√	√			
30	√	√	√	√	√	√
45	√					
60	√	√	√	√	√	√
75	√					
90	√			√	√	√
120	√	√	√	√	√	√
150	√			√	√	√
210	√			√	√	√

(*) Herbicidas: ATZ, PRO, CLE, HAL y DIC

(**) S/P: sin pulverizar

4.1. Monitoreo analítico de la degradación de los herbicidas

El seguimiento de degradación de los herbicidas se realizó mediante cromatografía líquida de ultra performance acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) en los laboratorios de servicios analíticos del Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC) de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral. Las metodologías utilizadas se encuentran especificadas en el material complementario M.1.

4.2. Monitoreo de actividad enzimática

4.2.1. Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA)

Se siguió la técnica de Schnurer & Rosswall (1982) con adaptaciones de Lescano et al. (2018). Esta determinación se realizó agregando 6 ml de una solución tampón de fosfato de potasio 60 mM (pH = 7,6) en presencia de FDA a 1 g de la biomezcla secada al aire colocada en tubos de 15 ml. Se preparó un control con cada biomezcla sin sustrato FDA. Las muestras se agitaron y se incubaron a 25 °C durante 60 min. Después de la incubación, se agregaron 6 ml de acetona a todos los tubos para detener la reacción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3200 rpm durante 5 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros de nylon de 0,45 µm. La absorbancia se midió

a 490 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer®. La concentración de fluoresceína liberada se calculó como referencia a la curva de calibración realizada con soluciones estándar de fluoresceína. Los resultados se expresaron como μmoles de fluoresceína liberada por kilogramo de suelo/biomezcla en un minuto ($\mu\text{moles}/\text{kg min}$).

4.2.2. Actividad de las enzimas fenoloxidasas (FOX)

Esta técnica se realizó de acuerdo a Castillo et al, (1994) y Tortella et al. (2012).

Se agitan 10 g de la biomezcla secada al aire (150 rpm, 2 h) con 25 ml de un tampón de ácido succínico/láctico 100 mM (pH 4,5). Las muestras se centrifugan (4000 rpm, 20 min). Se recoge el sobrenadante de cada muestra, se filtra a través de filtros de nylon 0,45 μm . El medio de reacción consiste en 600 μl de ácido 3,3-dimetiloaminobenzoico (DMAB), 200 μl de hidrazona de 3-metilo-2-benzotiazolinona (MBTH), 60 μl de sulfato de manganeso (MnSO_4), 2,9 ml de la muestra filtrada y la reacción se inicia con la adición de 20 μl de H_2O_2 10 mM. La reacción se sigue en un espectrofotómetro Perkin Elmer a 590 nm por 10 min. Se hace una regresión lineal de la curva y considerando las diluciones realizadas, el peso de la muestra, el coeficiente de extinción molar $53000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Castillo et al., 1994) y la longitud de la cubeta, se realiza el cálculo que se expresa en $\mu\text{moles}/\text{kg min}$; como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto.

4.3. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos

El pH y conductividad eléctrica sobre los extractos de los materiales se midieron en suspensiones de las muestras en agua destilada en una proporción de (1:2,5 p/v), que se agitó en orbital a 150 rpm durante 2 horas y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Finalmente, se midieron utilizando un medidor multiparamétrico HACH ® HQd Field Case. La temperatura en las biomezclas se midió mediante un termómetro digital durante todo el período del ensayo. El contenido de materia orgánica se obtuvo gravimétricamente por ignición a 550 °C durante 2h, como la diferencia entre el peso seco original y las cenizas (Sharma & Garg, 2018).

5. Análisis estadístico

En el análisis de la degradación de los herbicidas, se compararon todos los días de muestreo de la biomezcla pulverizada o suelo pulverizado con el primer día de muestreo. En el seguimiento de la hidrólisis del compuesto FDA y de la actividad de las enzimas fenoloxidasas, se empleó el mismo procedimiento, además de analizar las diferencias específicas en cada punto temporal. Además, se calcularon los índices de correlación de Pearson entre la actividad de las enzimas fenoloxidasas y las concentraciones residuales de los herbicidas. Los resultados se expresaron como medias $\pm$ errores estándar. Las diferencias significativas entre medias se evaluaron mediante ANOVA unidireccional y una prueba post hoc de Tukey con un nivel de significancia establecido en $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Minitab.

Resultados y discusión

1. Etapa de maduración de los materiales para generar la biomezcla

A través de la observación visual se logró constatar la homogeneización integral de los materiales constituyentes de la biomezcla. Durante el mes inicial del proceso de maduración de los materiales, se confirmó la presencia del hongo de pudrición blanca, como se evidencia en la Figura 5. Este hongo, reconocido por su inherente capacidad para descomponer la lignina, incluyendo el rastrojo de trigo, adquiere relevancia debido a que las enzimas ligninolíticas asociadas han demostrado ser idóneas para la degradación de los agroquímicos. Se complementó el análisis exploratorio mediante la supervisión de las actividades enzimáticas (FDA y FOX), cuyos resultados específicos serán analizados en detalle posteriormente (véase figuras 13 y 14), siendo estos mencionados como resultados anteriores a la pulverización de los herbicidas.



Figura 5. Fotografías que muestran la aparición del hongo de pudrición blanca durante la fase de maduración.

2. Degradación de los herbicidas en la biomezcla y comparación con la degradación en el suelo

El herbicida ATZ y CLE (Figura 6 y 7) presentaron las tasas de degradación más acelerada en la biomezcla. La ATZ se degradó significativamente ($p < 0,05$) a los 15 días, representando una reducción del 95% en comparación con la concentración inicial. Se encontraron resultados comparables en el estudio de Ten et al. (2016), quienes reportaron una degradación de ATZ semejante en una biomezcla compuesta por suelo, rastrojo de trigo y turba durante un lapso de 15 a 30 días. El CLE experimentó una disminución de 36% al quinto día de degradación y en el día 15 se constató una degradación significativa ($p < 0,05$) del 95%. Estos resultados representan un gran avance de la tecnología de los biolechos, ya que hasta ahora había una escasez de evidencia científica o estudios concluyentes sobre la degradación de CLE.

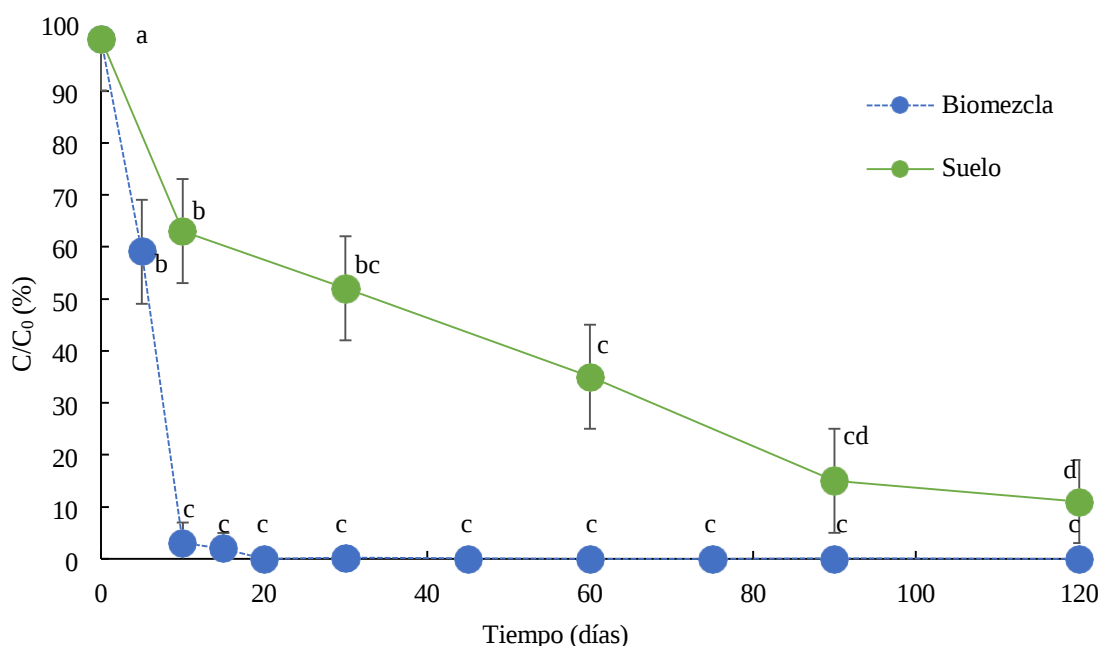


Figura 6. Evolución temporal de las concentraciones residuales de atrazina; datos correspondientes a la biomezcla (representada mediante los puntos experimentales celestes) y al control (puntos experimentales verde), expresados como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para el herbicida inoculado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores del mismo tratamiento en días diferentes.

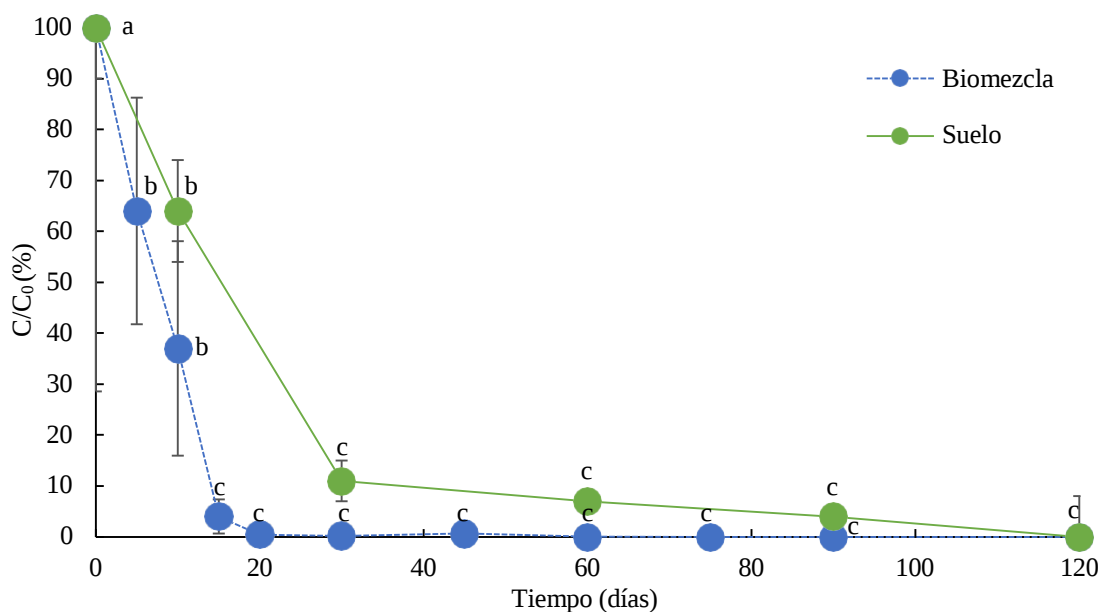


Figura 7. Cambios en las concentraciones residuales de cletodim a lo largo del tiempo; datos correspondientes a la biomezcla (representada mediante los puntos experimentales celestes) y al control (puntos experimentales verde), expresados como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para el herbicida inoculado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores del mismo tratamiento en días diferentes.

En la Figura 8 se muestra la degradación del herbicida PRO, el cual ha sido prohibido en Europa pero continúa siendo empleado en distintos países como Australia, Canadá, China y Estados Unidos (Hu et al., 2021; J. Liu et al., 2018; Velisek et al., 2015; Zhou et al., 2012). Los resultados

obtenidos revelaron una reducción significativa del 40% en la concentración residual de este herbicida tras un periodo de 10 días ($p < 0,05$). Este hallazgo adquiere relevancia al contrastarse con una investigación previa realizada por Masís-Mora et al. (2019), quienes, al utilizar una biomezcla compuesta por fibra de coco, compost y tierra de cultivo en proporciones de 2:1:1, lograron una vida media de eliminación (DT50) superior a 200 días. Posteriormente, se evidenciaron reducciones adicionales notables ($p < 0,05$) en la concentración de PRO después de un mes de ensayo, alcanzando porcentajes de degradación del 95%, en concordancia con los hallazgos de Lescano et al. (2022). Este proceso contrasta con el control de suelo, donde, después de 120 días, el herbicida persistió en un 35%.

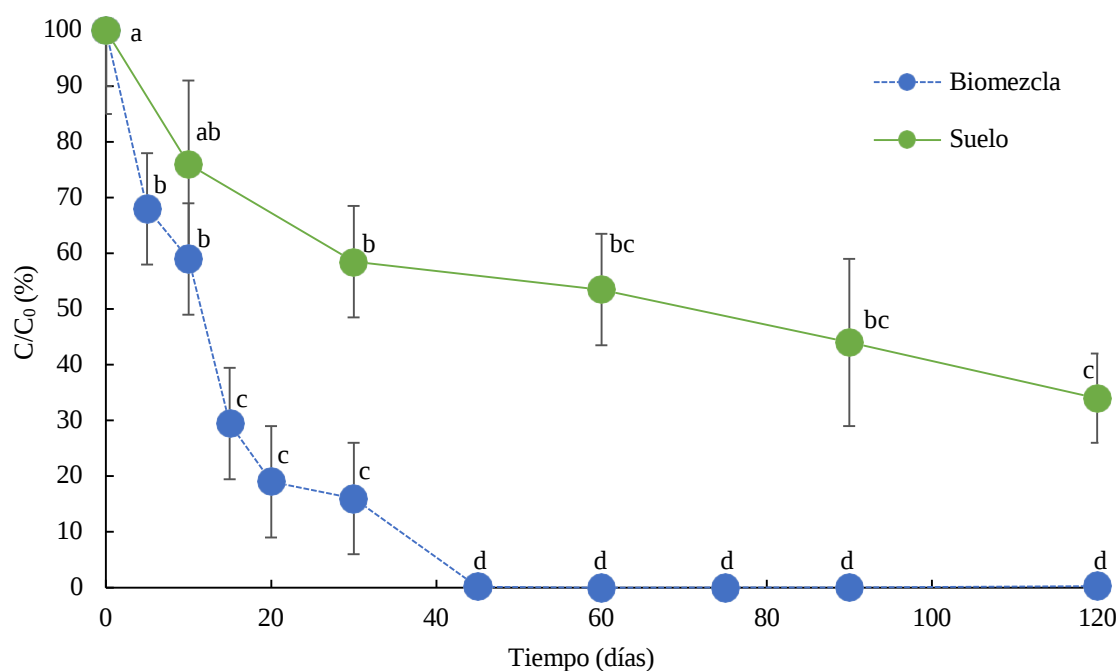


Figura 8. Variación a lo largo del tiempo de las concentraciones residuales de prometrina; datos correspondientes a la biomezcla (representada mediante los puntos experimentales celestes) y al control (puntos experimentales verde), expresados como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para el herbicida inoculado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores del mismo tratamiento en días diferentes.

Con respecto a los herbicidas HAL (Figura 9) y DIC (Figura 10), se observó una degradación significativa ($p < 0,05$) superior al 95% después de dos meses de ensayo en la biomezcla. En cuanto al dicamba, no se encontraron informes científicos sobre su eliminación en biomezclas. Actualmente, el uso de este herbicida en combinación con glifosato ha experimentado un aumento a nivel mundial, principalmente debido a la adopción de cultivos genéticamente modificados de soja, maíz y algodón que son resistentes al dicamba, ofreciendo una solución para el control de malezas resistentes al glifosato (López-Puertollano et al., 2022; Mariani et al., 2015).

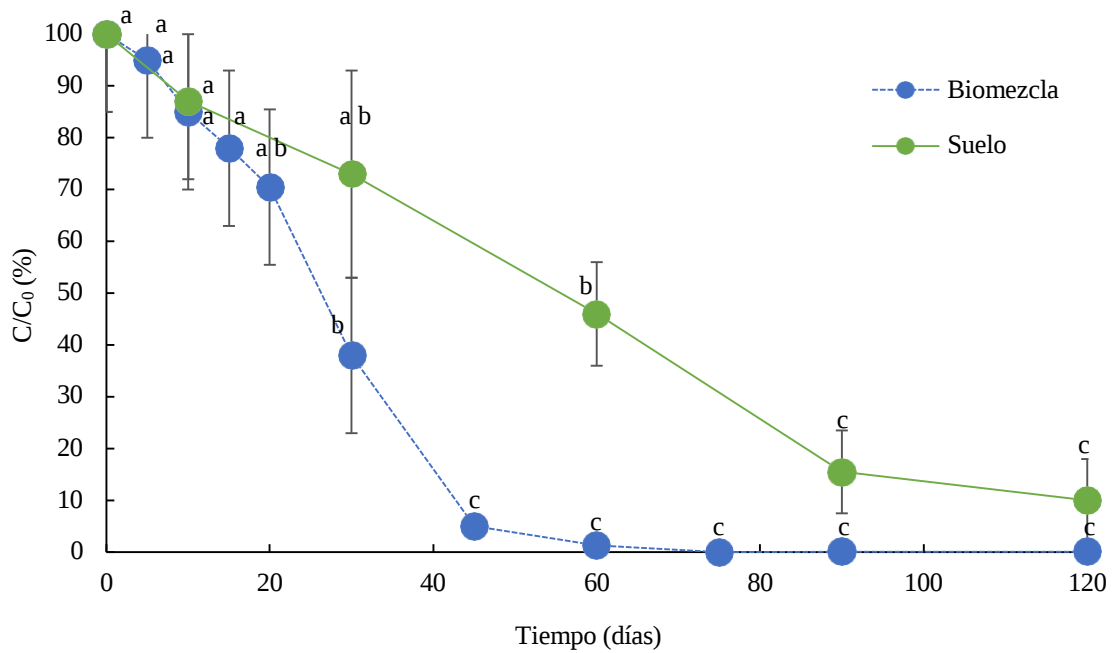


Figura 9. Tendencia temporal de las concentraciones residuales de haloxifop-P-metilo; datos correspondientes a la biomezcla (representada mediante los puntos experimentales celestes) y al control (puntos experimentales verde), expresados como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para el herbicida inoculado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores del mismo tratamiento en días diferentes.

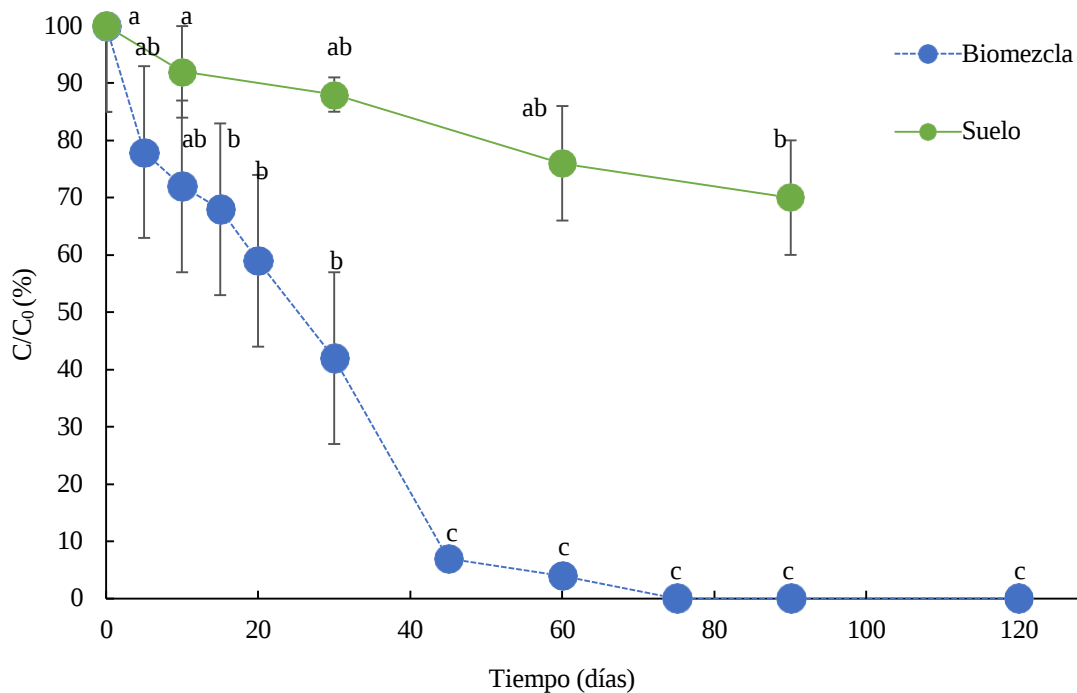


Figura 10. Variación a lo largo del tiempo de las concentraciones residuales de dicamba; datos correspondientes a la biomezcla (representada mediante los puntos experimentales celestes) y al control (puntos experimentales verde), expresados como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para el herbicida inoculado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores del mismo tratamiento en días diferentes.

Los resultados revelan la capacidad inherente de la biomezcla para reducir los compuestos a niveles prácticamente indetectables. Se destaca especialmente que la velocidad de degradación de los herbicidas en el suelo es menor en comparación con la tasa lograda por la biomezcla, lo cual respalda la hipótesis de que el proceso con la biomezcla es más rápido y eficiente. La Figura 11 muestra comparativamente la degradación de todos los herbicidas en el suelo, mientras que la Figura 12 muestra la comparación para el caso de la biomezcla. En el transcurso del primer mes de degradación en los ensayos con suelo, se evidenció que la mayoría de los herbicidas no lograron reducirse a la mitad de sus concentraciones iniciales con excepción del CLE. Al concluir el ensayo, tanto la PRO como el DIC aún mantenían un 60% de sus concentraciones iniciales. En el suelo al final del ensayo (es decir, a los 120 días), se detectaron concentraciones significativas para la mayoría de los herbicidas ($3,4 \pm 1,2$ mg/kg ATZ, $10,9 \pm 4,3$ PRO, $4,9 \pm 2,3$ HAL y $138,7 \pm 22,7$ DIC). En un contraste notable, en la biomezcla, ATZ y CLE exhibieron una disminución prácticamente completa antes de transcurrir 20 días, a excepción del DIC, y una alta remoción del resto de los herbicidas entre los días 45 y 60 día, lo cual resalta la importancia del uso de biomezclas en el diseño de los biolechos.

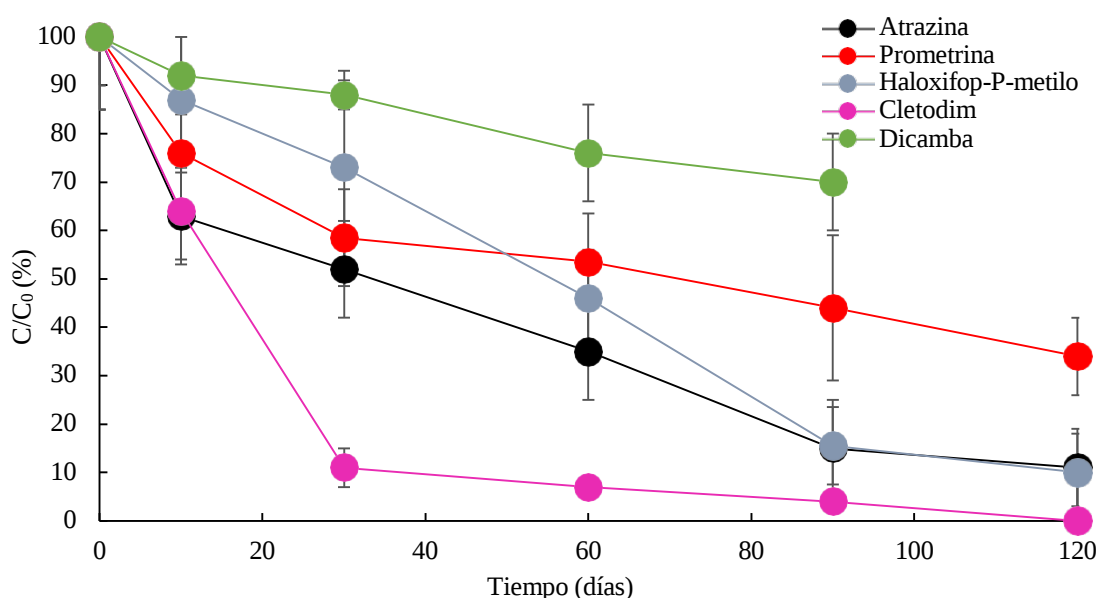


Figura 11. Evolución temporal de las concentraciones residuales de todos los herbicidas en el suelo, presentadas como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para todos los herbicidas inoculados.

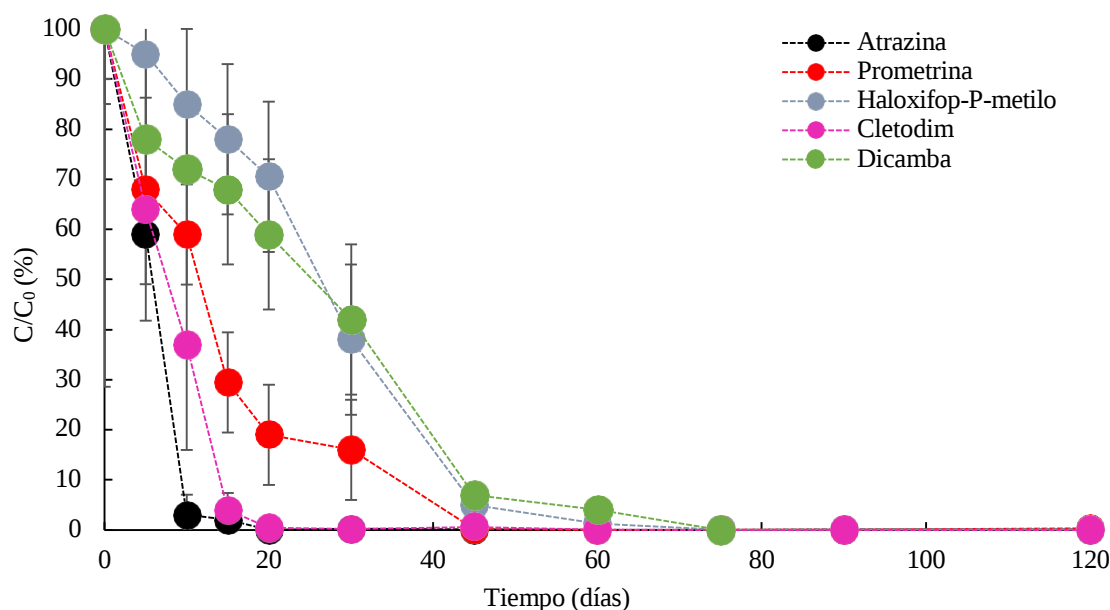


Figura 12. Variación a lo largo del tiempo de las concentraciones residuales de todos los herbicidas en la biomezcla, expresadas como la concentración relativa a la concentración inicial (C/C_0) para todos los herbicidas inoculados.

3. Fluctuaciones en la actividad enzimática: Hidrólisis de Fluoresceína Diacetato (FDA) y enzimas fenoloxidasas (FOX)

Los resultados de las mediciones de la actividad enzimática por FDA (Figura 13) no mostraron cambios estadísticamente significativos en relación al día anterior y posterior a la aplicación de los herbicidas. No obstante, se observó un aumento en la actividad hidrolítica sobre el compuesto FDA, alcanzando su punto máximo en el día 20 ($79,82 \mu\text{g/g h}$), para luego disminuir en el día 30 ($64,60 \mu\text{g/g h}$). En el segundo mes de estudio, la actividad hidrolítica sobre el compuesto FDA descendió a $46,42 \mu\text{g/g h}$. Por último, al finalizar el ensayo (día 120), la actividad enzimática disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a $34,64 \mu\text{g/g h}$. Esto representa una reducción del 51,5% en comparación con la actividad hidrolítica sobre el compuesto FDA previos a la aplicación de los herbicidas. Los hallazgos son consistentes con los reportados por Ten et al. (2016), quienes observaron un aumento en la actividad enzimática por FDA a los 30 días, seguido de una disminución a los 60 y 120 días. El control con la biomezcla sin pulverizar exhibió una ligera inclinación hacia la disminución, aunque no alcanzó significancia estadística. Es importante considerar que ciertos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a los herbicidas y sus metabolitos, lo que podría resultar en una disminución temporal de su actividad enzimática. Sin embargo, en este estudio se plantea la posibilidad de que la inhibición de la actividad hidrolítica sobre el compuesto FDA esté relacionada con la degradación gradual del material lignocelulósico. Durante la etapa de maduración de la biomezcla antes de la pulverización de los herbicidas, se ha observado que la presencia de rastrojo de trigo estimuló el crecimiento de los microorganismos lignolíticos de interés para la degradación de los herbicidas (Coppola et al., 2007). Por lo tanto, es plausible que la disminución progresiva de este recurso haya influido en la actividad hidrolítica

sobre el compuesto FDA. Aunque el agotamiento de este recurso es un fenómeno natural, la disminución de la actividad enzimática medida por FDA en la biomezcla indica una reducción en su capacidad degradativa, lo que enfatiza la necesidad de reemplazar parcial o completamente el material.

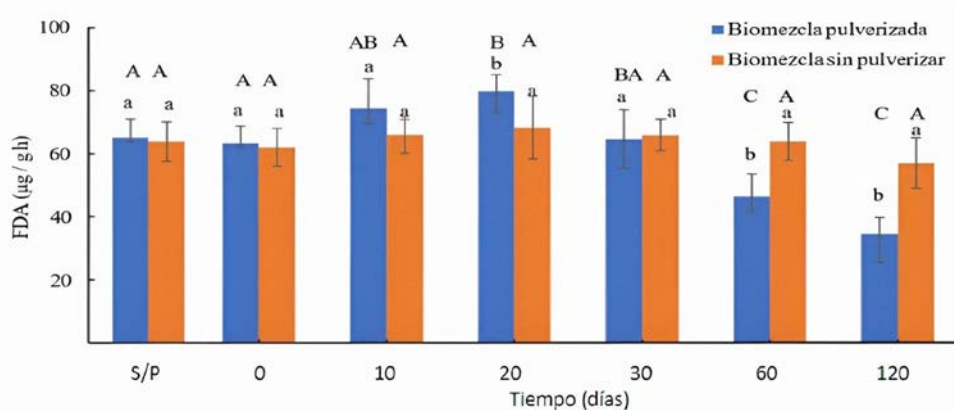


Figura 13. Dinámica de la actividad enzimática medida por FDA en la biomezcla pulverizada y sin pulverizar. Las letras minúsculas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la biomezcla pulverizada y sin pulverizar en cada tiempo. Además, las letras mayúsculas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la biomezcla pulverizada y sin pulverizar en cada día de muestreo.

En relación a la actividad de fenoloxidasas (Figura 14), se puede apreciar un aumento significativo ($p < 0,05$) al día siguiente de la adición de los herbicidas. A partir del día 10, la actividad de fenoloxidasas se mantiene relativamente estable alrededor de $1,50 \mu\text{moles/kg min}$, con pequeñas fluctuaciones. Este aumento inicial de la actividad de fenoloxidasas podría indicar una respuesta defensiva de los organismos frente a los herbicidas, ya que estas enzimas desempeñan un papel crucial en la desintoxicación y degradación de los compuestos. No obstante, la exposición prolongada y la acumulación de productos de degradación de los herbicidas podrían llevar a una reducción en las respuestas enzimáticas. Después de 60 días, se observa un regreso en los niveles de actividad de fenoloxidasas, similares a la biomezcla sin pulverizar, registrando un valor de $0,86 \mu\text{moles/kg min}$ en el día 120. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Ten et al. (2016), quienes investigaron una biomezcla contaminada con atrazina, clorpirifos e iprodiona. En su investigación, también observaron valores iniciales de actividad enzimática que variaron entre $0,5$ y $1,2 \mu\text{mol/kg min}$, los cuales disminuyeron con el paso del tiempo. Cabe destacar que en el grupo control, donde se utilizó la biomezcla sin pulverizar, se evidenció también una disminución significativa del 26% y 33% a los 60 y 120 días, respectivamente, posiblemente debido a procesos biológicos inherentes al sistema estudiado. Los valores del índice de Pearson indican una correlación negativa entre la actividad de las fenoloxidasas y los niveles de herbicidas residuales durante el primer mes del ensayo. Posteriormente, cuando los niveles de herbicidas eran prácticamente indetectables, la actividad de las fenoloxidasas regresó a sus valores iniciales, sugiriendo una posible recuperación.

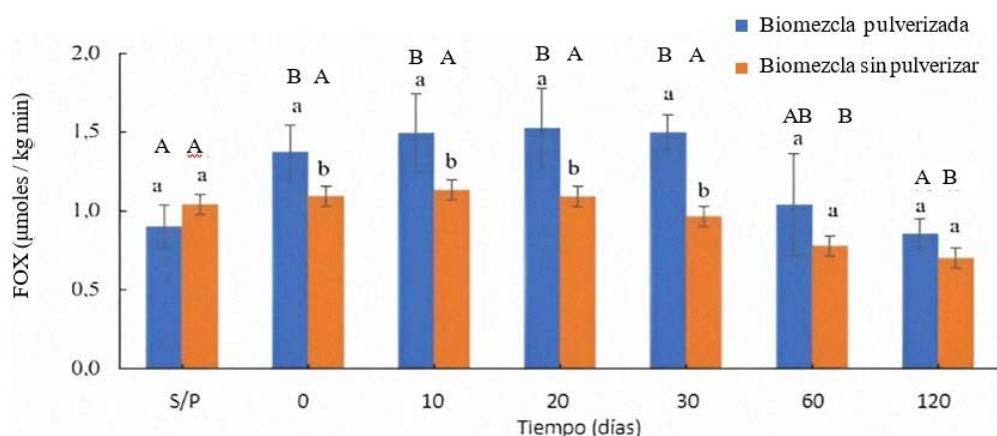


Figura 14. Variación de la actividad FOX en la biomezcla pulverizada y sin pulverizar. Las letras en negrita denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) en la biomezcla pulverizada el ensayo de yo de degradación.

4. Descripción de las observaciones de los parámetros fisicoquímicos

Se registró la temperatura, materia orgánica, pH y conductividad a lo largo del ensayo, los valores se presentan en la Tabla 4. Las temperaturas en las biomezclas mantuvieron una tendencia mesofílica desde su preparación, con una leve disminución de 30 a 24 ± 3 °C. El pH se mantuvo cercano a la neutralidad durante todo el ensayo. En cuanto al contenido de materia orgánica, tanto en la biomezcla control como en la biomezcla pulverizada con los herbicidas, observó una reducción gradual a lo largo del tiempo, pasando de un $15 \pm 1,2$ % a un $7,4 \pm 0,8$ %. Este fenómeno representa un proceso de transformación gradual que ocurre de manera natural en materiales expuestos a procesos de biorremediación. Sin embargo, un aspecto con potenciales implicaciones en la calidad del sustrato final es la conductividad eléctrica. Se ha identificado un aumento considerable ($p < 0,05$) después de 30 días en la biomezcla pulverizada en comparación con la biomezcla control, lo cual puede atribuirse principalmente a la mineralización de la materia orgánica, elevándose de 388 a 480 ± 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos a lo largo del ensayo de degradación de los herbicidas.

Día	T (°C)		pH		MO (%)		CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
	B S/T	Biomezcla pulverizada	B S/T	Biomezcla pulverizada	B S/T	Biomezcla pulverizada	B S/T	Biomezcla pulverizada
0	30 $\pm$ 3	30 $\pm$ 3	6,92 $\pm$ 0,1	6,87 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 1,2	13,5 $\pm$ 1,2	392 $\pm$ 16	370 $\pm$ 13
30	29 $\pm$ 2	28 $\pm$ 3	6,89 $\pm$ 0,2	6,39 $\pm$ 0,1	13,5 $\pm$ 1,2	11,6 $\pm$ 1,2	388 $\pm$ 15	480 $\pm$ 15
60	30 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3	6,76 $\pm$ 0,2	6,38 $\pm$ 0,1	12,9 $\pm$ 1,0	9,9 $\pm$ 1,1	378 $\pm$ 20	467 $\pm$ 20
90	27 $\pm$ 3	26 $\pm$ 2	6,70 $\pm$ 0,1	6,10 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,9	8,2 $\pm$ 1,2	395 $\pm$ 16	483 $\pm$ 18
120	28 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3	6,76 $\pm$ 0,2	6,82 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 1,1	7,4 $\pm$ 0,9	396 $\pm$ 19	478 $\pm$ 15

B S/P: biomezcla sin pulverizar

Conclusión

El ensayo de degradación reveló que, la prometrina y el dicamba aún conservaban altas concentraciones iniciales en el suelo al finalizar el experimento, es decir, después de 120 días. En contraste, en la biomezcla, la mayoría de los herbicidas mostraron una disminución prácticamente total a los 75 días. Este hecho subraya la capacidad inherente de la biomezcla para reducir los compuestos a niveles prácticamente indetectables.

En cuanto a las mediciones de las actividades enzimáticas los valores reportados al final del ensayo indican que la biomezcla posee aún suficiente actividad para iniciar otro ciclo de aplicación de herbicidas, fundamentalmente debido a la actividad alta residual por fenoloxidasas. Estos hallazgos subrayan la importancia de continuar investigando la dinámica temporal y las complejidades de las respuestas enzimáticas frente a la degradación de herbicidas en biomezclas. Se sugiere explorar la posibilidad de revertir la reducción de la actividad hidrolítica sobre el compuesto de FDA mediante la adición de materiales lignocelulósicos frescos o sometiendo el sustrato a la acción de lombrices de tierra.

Capítulo 2

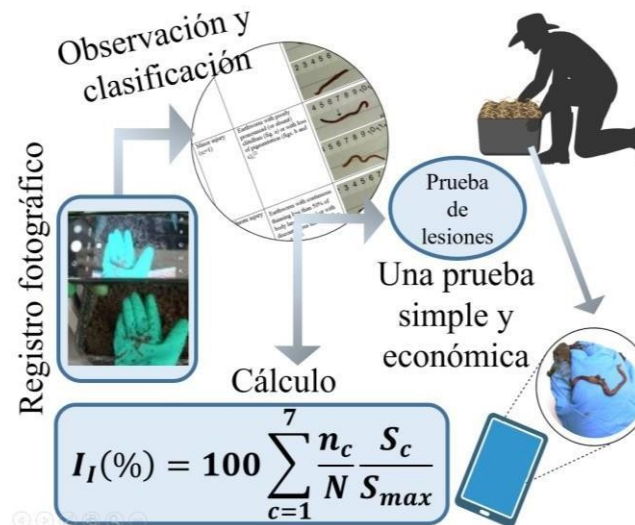
Incorporación de los bioensayos con oligoquetos terrestres y semillas en el monitoreo de los herbicidas en las biomezclas: desarrollo de una nueva prueba de monitoreo sobre E. fetida



Introducción

Este capítulo se centró principalmente en investigar y proponer un Índice de lesión basado en la especie *Eisenia fetida* expuesta a herbicidas. Para validar dicho índice, se llevaron a cabo una serie de experimentos. Primero se analizó la relación entre el índice y la concentración de cada herbicida inoculado individualmente en la biomezcla, y luego se analizó la relación funcional del índice con todos los herbicidas aplicados simultáneamente. Finalmente, en una segunda fase, se validó la utilidad del índice al incorporarlo en el monitoreo del ensayo de degradación de los cinco herbicidas en la biomezcla (Capítulo 1). Además los resultados obtenidos fueron comparados con pruebas biológicas estándares, como la prueba de evitación con *E. fetida* y la prueba de germinación de semillas con *L. sativa*.

Resumen gráfico



Objetivos

- Incorporar bioensayos con oligoquetos terrestres y semillas para monitorear la degradación de los herbicidas en las biomezclas empleadas.
- Diseñar y desarrollar un índice para el seguimiento de la degradación de los agroquímicos teniendo en cuenta los efectos morfológicos lesivos observados en la lombriz de tierra, *E. fetida*.

Materiales y métodos

Se llevaron a cabo ensayos con el fin de validar la prueba de lesión, empleando los materiales y agroquímicos especificados en las Tablas 1 y 2 para la creación de las unidades experimentales.

1. Prueba de lesión (Ii) en *E. fetida*

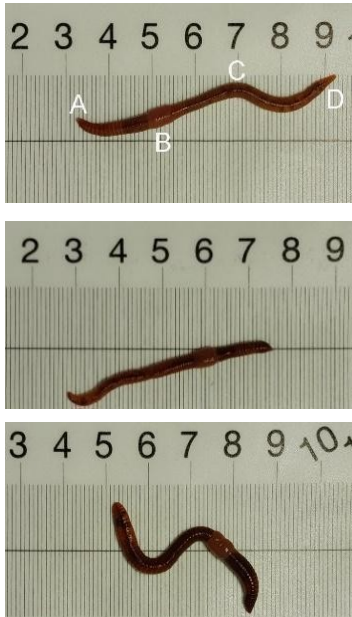
1.1. Lombrices utilizadas

El tipo de lombriz utilizada en este trabajo como bioindicador es *E. fetida*. Las condiciones para la cría de lombrices *E. fetida* son temperatura de 25 ± 2 °C, luz artificial constante, humedad alrededor del 60% y alimentación semanal siguiendo la metodología de Masin & Rodríguez, 2012. Las lombrices seleccionadas para las pruebas biológicas son clitelados adultos (longitud media: $7,5 \pm 2,0$ cm, ancho medio: $0,50 \pm 0,11$ cm y biomasa media: $0,41 \pm 0,04$ g/ ind). Los individuos son de color rojo oscuro y no presentan lesiones morfológicas.

1.2. Categoría de las lesiones

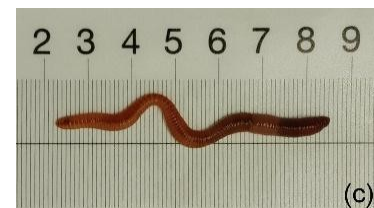
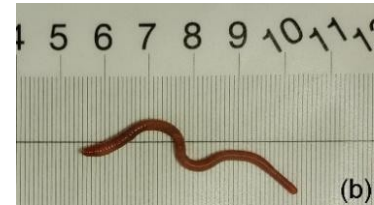
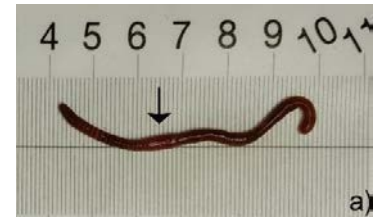
Se propuso una clasificación en siete categorías en función de la gravedad de las lesiones que puede sufrir una lombriz *E. fetida* durante la exposición a contaminantes. Cada categoría propuesta se describe y muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Descripción de categorías de las lesiones con patrones fotográficos de referencia correspondientes.

Categoría de lesión (puntuación de categoría)	Descripción de la gravedad de la lesión.	Patrones de referencia fotográfica
Ileso ($s_1=0$)	alteración morfológica visible ⁽¹⁾	

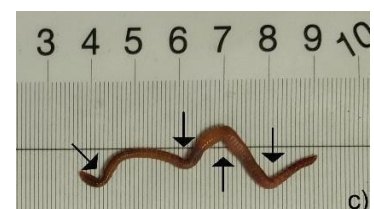
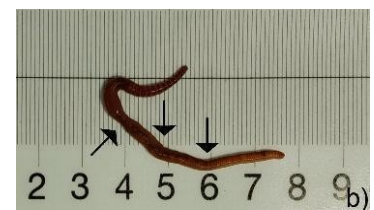
Lesión menor ($s_2=1$)

Lombriz de tierra con clitelo poco pronunciado (o ausente) (figura a) o con pérdida de pigmentación (figuras b y c).⁽²⁾



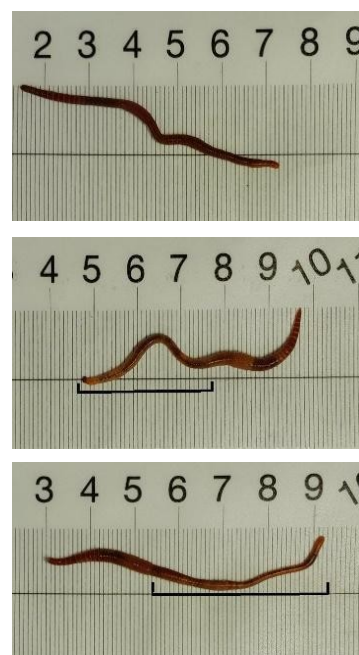
Lesión moderada ($s_3=2$)

Lombriz de tierra con adelgazamiento continuo inferior al 50% de la longitud corporal (figura a) o con adelgazamiento discontinuo (figuras b y c).⁽³⁾



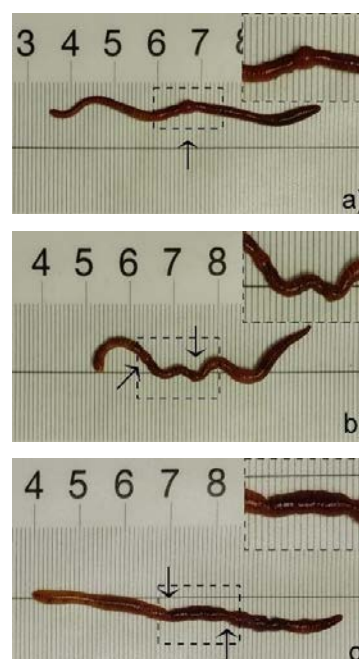
Lesión seria ($s_4=3$)

Lombriz de tierra con adelgazamiento mayor al 50% de la longitud corporal. ⁽⁴⁾



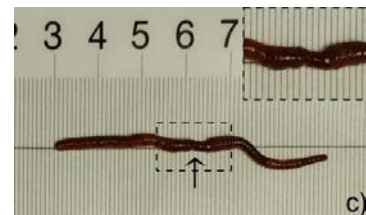
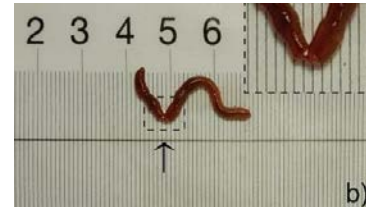
Lesión grave ($s_5=4$)

Lombriz con ampollas (figura a) y/o con constricciones (figuras b y c) en sus partes posteriores. ⁽⁵⁾



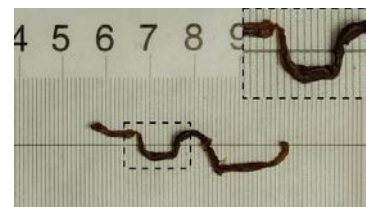
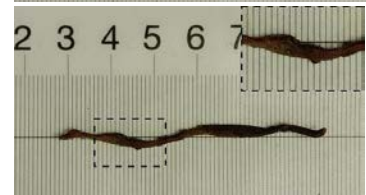
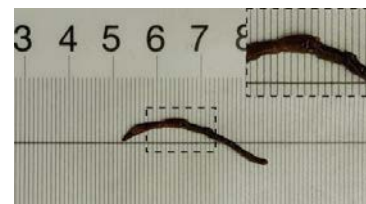
Lesión mayor ($s_6 = 5$)

Lombriz con ampollas rotas o llagas (figura a), y/o con fragmentación (figura b) y necrosis en partes posteriores (figura c).⁽⁶⁾



Muerte ($s_7 = 6$)

Muerte del organismo⁽⁷⁾



⁽¹⁾ ileso: la lombriz de tierra adulta ilesa está formada por segmentos musculares conectados por anillos que le proporcionan flexibilidad y movilidad. Estos segmentos están coloreados entre rojo y morado debido a la presencia de un pigmento subepidérmico, mientras que los anillos son de color amarillo pálido. La anatomía se divide en cuatro zonas principales: (A) la cabeza, que contiene el prostomio, el cerebro, el corazón y las vesículas seminales; (B) el clitelo, que es una sección más gruesa (una fusión de varios segmentos) presente en ejemplares adultos; (C) la sección posterior, donde no se encuentran órganos notables; (D) la cola al final (Gupte et al., 2013; Nunes et al., 2016).

⁽²⁾ Lesión menor: La lombriz muestra signos de estrés menor como reducción o pérdida del clitelo (ver figura a) o despigmentación general o parcial de su cuerpo (áreas de color rosa pálido, ver

figuras b y c) (Gupte et al., 2013; Nunes et al., 2016).

⁽³⁾ Lesión moderada: la lombriz experimenta debilidad en los anillos que le proporcionan estructura y firmeza. Esto resulta en un adelgazamiento continuo de los segmentos del cuerpo en menos del 50% de la longitud total (ver figura a), o en un adelgazamiento discontinuo (ver flechas que indican áreas de adelgazamiento discontinuo en las figuras b y c) (Chakra Reddy & Venkateswara Rao, 2008).

⁽⁴⁾ Lesión seria: la lesión empeora cuando el adelgazamiento excede el 50% del cuerpo, lo que resulta en la pérdida completa de la textura anillada. Esta condición aumenta el riesgo de fragmentación y la consiguiente exposición de los órganos internos (Chakra Reddy & Venkateswara Rao, 2008).

⁽⁵⁾ Lesión grave: en esta etapa, aparecen ampollas en la pared corporal debilitada (ver figura a) y, en algunos casos, se producen constricciones en las partes posteriores (ver figuras b y c) (Homa et al., 2016). Estas lesiones pueden obstruir los conductos internos, afectando la función digestiva y excretora. En algunos casos, puede producirse una secreción excesiva de moco, lo que dificulta la respiración y favorece la deshidratación de la lombriz.

⁽⁶⁾ Lesión mayor: las etapas avanzadas de las ampollas provocan la ruptura de la cutícula (es decir, ampollas rotas) y la posterior fragmentación en la parte posterior del cuerpo, y ocasionalmente se pueden observar áreas necróticas (ennegrecidas) (Chakra Reddy & Venkateswara Rao, 2008).

⁽⁷⁾ Muerte: La muestra está inactiva y necrótica (tejido opaco, completamente deshidratado y ennegrecido, ver figuras a y b) o con pérdida excesiva de moco (parcialmente deshidratado, ver figuras c).

1.3. Procedimiento de la prueba propuesta

Sobre la base de la clasificación anterior, la prueba de lesión se llevó a cabo según el siguiente procedimiento:

Se colocan diez lombrices de tierra *E. fetida* en una caja de vidrio (15×10×10 cm) que contiene 750 g de biomezcla pulverizada con el o los herbicidas correspondientes al 60% de humedad. La caja se cubre con una película plástica perforada a modo de tapa para permitir el intercambio gaseoso y se incuba a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo una intensidad de luz entre 400 y 800 lux con un fotoperiodo de 16 h:8 h luz: oscuridad durante 4 días. Después del período de exposición, se retira cada lombriz, se limpia cuidadosamente y se coloca longitudinalmente sobre una superficie blanca junto a una regla para el registro fotográfico. Se utiliza la cámara de un teléfono celular para capturar las mejores imágenes. La gravedad de las lesiones de cada individuo expuesto se evalúa considerando las alteraciones morfológicas identificadas en el registro fotográfico en relación con los patrones de referencia. En la Tabla 5 se describen las diferentes gravedades de las lesiones que puede sufrir una lombriz de tierra después de la exposición, que se agrupan en las denominadas categorías. A continuación, se asigna una puntuación de categoría de gravedad

de la lesión (S_c) a cada lombriz de tierra fotografiada, y esta puntuación se identifica en función de las categorías de gravedad descritas en la Tabla 5. Luego, una vez que cada lombriz de tierra ha sido clasificada, el promedio de Índice de Lesión (I_l) se calcula de la siguiente manera:

$$I_l(\%) = 100 \sum_{c=1}^7 \frac{n_c S_c}{N S_{max}} \quad (1)$$

donde n_c es el número de individuos por categoría, S_c es la puntuación de la categoría, S_{max} es la puntuación de la categoría más grave (es decir, $S_{max} = 6$) y N es el número total de lombrices por prueba o réplica (es decir, $N = 10$). La prueba se realiza por triplicado. El índice propuesto fue validado como se describe en la siguiente sección.

2. Diseño y análisis de experimentos para la validación de la prueba de lesión

En primer lugar, se realizaron experiencias con relaciones bivariadas entre el índice de lesión y una serie de concentraciones de cada herbicida en forma individual para poder estimar un índice de lesión del 50% (CE50). Una vez obtenidos los valores, se ajustó un modelo de regresión lineal simple para calcular las CE50. Las concentraciones, medidas en mg de herbicidas por kg de biomezcla, se convirtieron en unidades adimensionales, denominadas Unidades Tóxicas, dada la variabilidad en los efectos generados por los diferentes herbicidas (por ejemplo, mientras que la CE50 del dicamba fue de 81 mg/kg, la correspondiente a la prometrina fue de 117 mg/kg). Posteriormente, se implementó un diseño experimental Box-Behnken utilizando el software Design-Expert 7.0 para explorar relaciones multivariadas, combinando cuatro de los herbicidas y excluyendo la prometrina debido a su similitud química con la atrazina. Aunque este modelo cuadrático podría haber permitido ajustar funciones no lineales, los resultados mostraron una linealidad tan marcada que tanto el sinergismo como el antagonismo fueron insignificantes, sugiriendo que la mezcla era aditiva. Por lo tanto, se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple, derivando un polinomio que permitió la construcción de una superficie de respuesta. Finalmente, se realizó el análisis de generalización del modelo utilizando el herbicida prometrina por ser del mismo grupo químico que uno de los herbicidas utilizados en el diseño experimental previo (atrazina). Se ajustó otro modelo de regresión lineal múltiple considerando los cinco herbicidas.

2.1. Diseño experimental para las determinaciones de CE50

La CE50 es la concentración requerida del herbicida para obtener un valor del 50% de I_l , que puede determinarse matemáticamente derivando la función de mejor ajuste. Para la determinación de la CE50 de cada herbicida, se pulverizó una muestra de biomezcla sobre la superficie utilizando la solución del herbicida correspondiente en forma individual, se mezcló y se dejó equilibrar durante 24 h. Luego se estimó el I_l para cada concentración de cada herbicida aplicado. La Tabla 6 muestra el diseño experimental para cada herbicida.

Tabla 6. Diseño experimental para el análisis de las regresiones Lineales, necesarias para la confección de la superficie de respuesta.

Herbicida	Concentración (mg/kg)	I_I (%)
Atrazina (ATZ)	50	26,67
	90	50,00
	100	54,17
	135	80,00
Cletodim (CLE)	50	24,17
	100	48,33
	110	52,50
	165	80,00
Prometrina (PRO)	50	24,17
	100	44,17
	150	50,83
	225	95,00
Haloxifop-P-metilo (HAL)	50	21,33
	100	43,33
	150	52,50
	225	90,00
Dicamba (DIC)	35	31,67
	50	35,00
	60	40,00
	85	53,33
	100	54,17

2.2. Diseño experimental para realizar la superficie de respuesta

Para la validación multivariada del índice de lesión (I_I), se utilizó un diseño experimental para determinar las combinaciones de cuatro herbicidas (ATZ, CLE, HAL y DIC) a aplicar para obtener datos apareados que se ajusten a una Superficie de Respuesta. Una Superficie de Respuesta es un gráfico tridimensional con concentraciones de componentes individuales en Unidades Tóxicas en los ejes x e y (cuando los factores independientes son dos) y la variable de respuesta (I_I) en el eje z. Esta representación se puede utilizar para predecir la toxicidad de cualquier combinación de componentes basándose en los modelos de regresión no lineal que forman la superficie de respuesta (Karmoker et al., 2019). La Unidad Tóxica (UT) es una forma de expresar la cantidad (concentración) de una sustancia tóxica (herbicida), es una variable adimensional normalizada con respecto a la CE50 para cada herbicida considerado. Si la concentración del herbicida es igual a su CE50, luego, la UT es igual a uno. La principal utilidad de las unidades tóxicas es clasificar las interacciones de mezclas como aditivas, sinérgicas o antagonicas. La aditividad significa que la toxicidad de la mezcla es igual a la suma de las toxicidades de los componentes individuales. Los efectos sinérgicos ocurren cuando la toxicidad experimental de la mezcla es mayor que la suma de las toxicidades individuales. Por el contrario, los efectos antagonicos ocurren cuando la toxicidad experimental de una mezcla es menor de lo que se predeciría mediante la aditividad.

Para crear la superficie de respuesta se debe ajustar la siguiente relación:

$$I_I = \text{función} (UT_{ATZ}, UT_{CLE}, UT_{HAL}, UT_{DIC}) \quad (2)$$

donde:

$$UT_{ATZ} = \frac{ATZ(mg/kg)}{CE50_{ATZ}(mg/kg)}; \quad (3)$$

$$UT_{CLE} = \frac{CLE(mg/kg)}{CE50_{CLE}(mg/kg)} \quad (4)$$

$$UT_{HAL} = \frac{HAL(mg/kg)}{CE50_{HAL}(mg/kg)} \quad (5)$$

$$UT_{DIC} = \frac{DIC(mg/kg)}{CE50_{DIC}(mg/kg)} \quad (6)$$

En las ecuaciones (3) a (6), recordar que CE50 es la concentración de cada herbicida que produce un valor I_I del 50 %.

Los diseños experimentales de Box-Behnken permiten modelar la superficie de respuesta y se utilizan para calibrar modelos cuadráticos completos. Además, estos diseños experimentales son rotatables y, para un número reducido de factores (cuatro o menos), requieren menos pruebas. Al evitar los extremos del espacio del diseño experimental, permite trabajar con combinaciones extremas de factores (Box & Behnken, 1960). El diseño Box-Behnken se considera más eficiente y poderoso que otros, como el diseño factorial completo de tres niveles, el diseño compuesto central y el diseño Doehlert, a pesar de su pobre cobertura del extremo del espacio de diseño no lineal (Karmoker et al., 2019).

La Tabla 7 muestra el diseño Box-Behnken de 4 factores. Los tres niveles de concentración (inferior, medio y superior expresados en mg/kg) utilizados para cada factor fueron los siguientes: [45, 90, 135], [55, 110, 165], [75, 150, 225], [35, 70, 105], para las cuatro variables independientes (ATZ, CLE, HAL y DIC), respectivamente. Luego, con base en este diseño experimental, se calcularon los valores de I_I .

Tabla 7. Diseño experimental Box-Behnken con los cuatro herbicidas ATZ, CLE, HAL y DIC (variables independientes).

Corrida	ATZ (mg/kg)	CLE (mg/kg)	HAL (mg/kg)	DIC (mg/kg)	I_I (%)
1	45	55	150	70	58,33
2	45	165	150	70	76,67
3	135	55	150	70	70,00
4	135	165	150	70	96,67
5	90	110	75	35	55,00
6	90	110	75	105	65,00
7	90	110	225	35	88,33
8	90	110	225	105	96,67
9	45	110	150	35	63,33
10	45	110	150	105	70,00
11	135	110	150	35	80,00
12	135	110	150	105	90,00
13	90	55	75	70	55,00
14	90	55	225	70	81,67
15	90	165	75	70	66,67
16	90	165	225	70	98,33
17	45	110	75	70	58,33
18	45	110	225	70	86,67
19	135	110	75	70	66,67
20	135	110	225	70	96,67
21	90	55	150	35	61,67
22	90	55	150	105	68,33
23	90	165	150	35	83,33
24	90	165	150	105	91,67
25	90	110	150	70	70,00

El diseño experimental presentado en la Tabla 7 tuvo en cuenta todos los grupos químicos a los que pertenecen los compuestos a pulverizar en la biomezcla (ATZ, CLE, HAL y DIC), pero no incluyeron la PRO porque pertenece al grupo de las triazinas, es decir, al mismo grupo que la ATZ. Después, para validar la superficie de respuesta ajustada a los cuatro herbicidas, se empleó un quinto herbicida del mismo grupo químico que uno de los utilizados. Se hizo una validación cruzada, sustituyendo el ATZ por PRO en ciertos puntos de interés (corrida). Así, TU_{PRO} viene dado por:

$$UT_{PRO} = \frac{PRO(mg/kg)}{CE50_{PRO}(mg/kg)} \quad (7)$$

La Tabla 8 muestra el diseño experimental donde la ATZ se reemplazó por PRO (ver ejecuciones equivalentes en la Tabla 6) para comparar el I_I medido que resulta cuando la combinación de estos cuatro herbicidas (PRO, CLE, HAL y DIC) se aplicó con el $I_{I \text{ estimado}}$ utilizando el modelo ajustado y las UT correspondientes.

Tabla 8. Diseño experimental que incluye la PRO en lugar de ATZ.

Corrida	PRO (mg/kg)	CLE (mg/kg)	HAL (mg/kg)	DIC (mg/kg)	I_I (%)
1	75	55	150	70	61,67
2	75	165	150	70	80,00
3	225	55	150	70	73,33
4	225	165	150	70	98,33
5	150	165	150	105	83,30
6	150	110	150	70	85,00

3. Monitoreo integrado de la biomezcla mediante indicadores biológicos

A continuación, se presentan las pruebas ecotoxicológicas estándares que se emplearon para monitorear el ensayo de degradación de los cinco herbicidas en la biomezcla descrita en el Capítulo 1.

3.1. Prueba de germinación de semillas con *L. sativa*

La prueba de germinación de semillas se realizó según EPA, 1996 con ligeras modificaciones para muestras de biomezcla. Se colocan veinte semillas de *L. sativa* en una placa de Petri que contiene 15 g de muestra de biomezcla pulverizada al 50% de humedad. Simultáneamente también se colocan veinte semillas en una placa de Petri pero que contiene 15 g de muestra de biomezcla de control. Los controles se preparan mediante biomezcla sin aplicación de herbicidas. Las placas de Petri se incuban a 22 ± 2 °C en la oscuridad durante 5 días. Después de este período, se mide el porcentaje de semillas germinadas y la longitud de las raíces para calcular el Índice de germinación (IG) de la siguiente manera:

$$GI(\%) = 100 \frac{GS}{GC} \frac{ES}{EC} \quad (8)$$

donde *GS* es el número de semillas germinadas en la muestra, *GC* el número de semillas germinadas en el control, *ES* la longitud promedio de las raíces en la muestra y *EC* la longitud promedio de las raíces en el control (López-Puertollano et al., 2022; Zucconi, 1985). La prueba se ejecuta por quintuplicado.

3.2. Prueba de evitación con *E. fetida*

La prueba de evitación se realiza según ISO 17512-1, 2008 con ligeras modificaciones. La prueba se realiza en una caja de vidrio (15 × 10 × 10 cm) dividida en dos secciones por un separador de plástico. Una de las secciones se llena con 250 g de biomezcla control y la otra con 250 g de biomezcla pulverizada biomezcla. Se retira el separador de plástico y se colocan 10 lombrices en la línea de separación. La caja se cubre con una película plástica perforada a modo de tapa para permitir el intercambio gaseoso y se incuba a 25 ± 2 °C, bajo una intensidad de luz entre 400 y 800 lux con un fotoperiodo de 16 h:8 h luz:oscuridad durante 48 h. Después de 48 h de incubación, se reinserta el separador de plástico y se registra el número de lombrices encontradas en cada sección. La distribución aleatoria de organismos en ausencia de contaminación se confirmó mediante una prueba de evitación con biomezcla de control en ambos lados de la caja (Hund- Rinke & Wiechering, 2001; Yearley et al., 1996). Se considera que las lombrices en la línea de separación con la porción cefálica en la biomezcla de control y las lombrices muertas han evitado la biomezcla pulverizada. Los resultados se presentan en gráficos en términos de respuesta neta promedio (NR) expresada como porcentaje y calculada de la siguiente manera:

$$NR(\%) = 100 \frac{C - T}{N} \quad (9)$$

donde C es el número de lombrices observadas en la biomezcla control, T es el número de lombrices observadas en la biomezcla pulverizada con los herbicidas, N es el número total de lombrices de tierra por prueba o réplica (es decir, $N = 10$) (Amorim et al., 2008). Una respuesta positiva (+) indica evitación y una respuesta negativa (-) indica preferencia por la biomezcla rociada. La prueba se realiza por triplicado.

3.3. Prueba de lesión con *E. fetida*

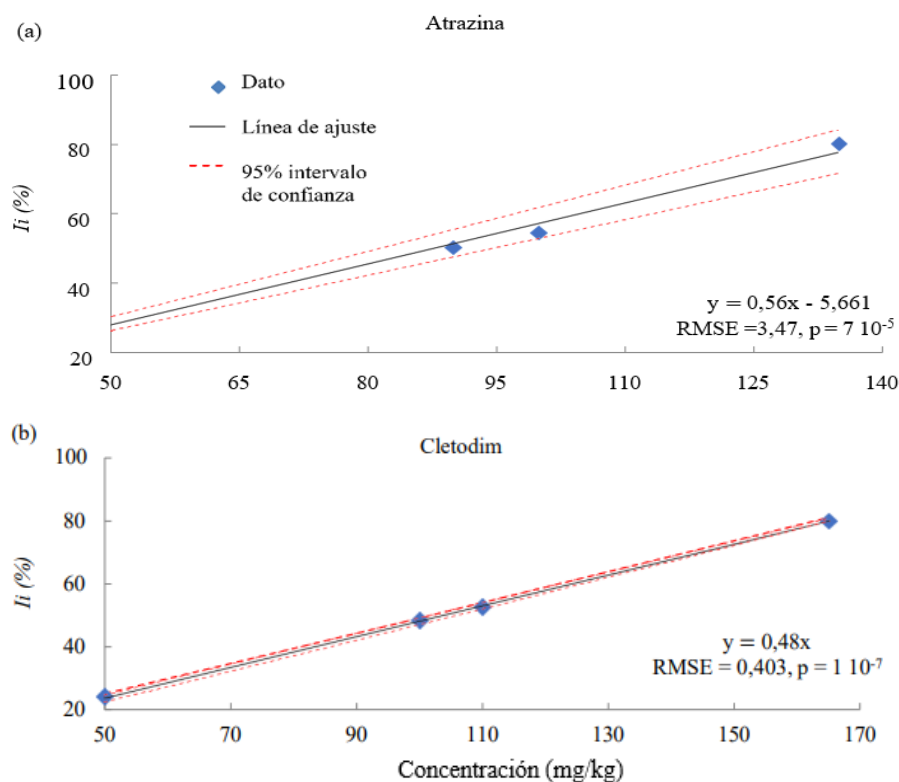
Se aplicó la prueba de lesión y el cálculo del Índice para monitorear el ensayo de degradación de los cinco herbicidas en la biomezcla descrito en el Capítulo 1. La metodología usada fue detallada en el apartado 1.2 de este capítulo.

Resultados y discusión

1. Determinaciones EC50

La Figura 15 muestra el diagrama de dispersión o gráfico de las variables sumadas de cada modelo de regresión lineal ajustado junto con el intervalo de confianza y la bondad de ajuste (RMSE: error cuadrático medio). La presentación del modelo incluye la fórmula del modelo, los coeficientes estimados y los estadísticos descriptivos del modelo.

Las relaciones lineales ajustadas para cada herbicida mostraron que existió una relación lineal significativa (RMSE bajo y valor p bajo) entre el índice propuesto y la concentración de cada herbicida. Todas las fotografías utilizadas para determinar el índice y los valores calculados se presentan en el material complementario M.2.



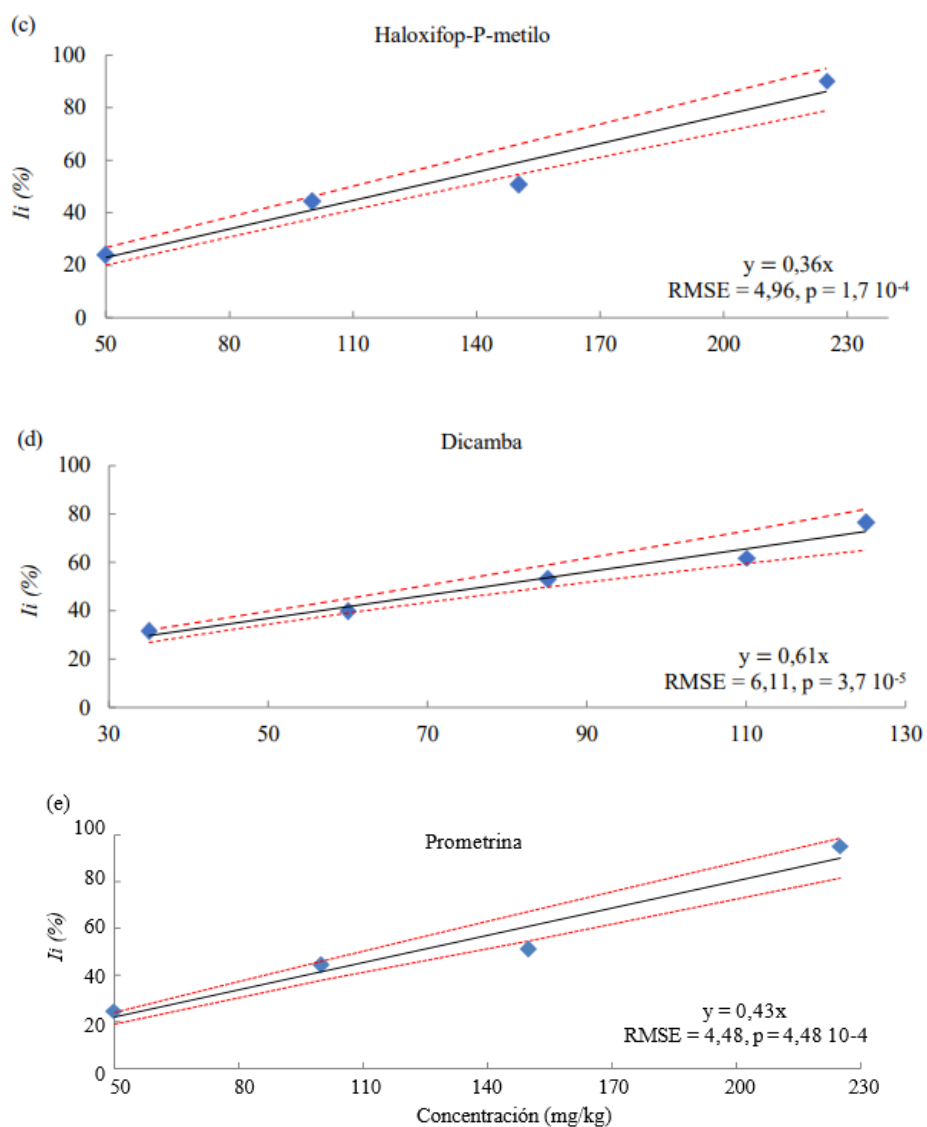


Figura 15. Gráfico de dispersión y correlaciones lineales ajustadas para el índice de lesiones en relación con las concentraciones de: a) ATZ; b) CLE; c) HAL; d) DIC y e) PRO

En una curva dosis-respuesta, la CE50 es la concentración de un herbicida a la que se observa el 50% del efecto (índice de lesión) (Figura 15). La concentración requerida para producir un efecto del 50 %, CE50, se calcula a partir de las relaciones ajustadas. Los valores obtenidos fueron:

$$CE50_{ATZ} = 88,81 \frac{mg}{kg}$$

$$CE50_{CLE} = 103,52 \frac{mg}{kg}$$

$$CE50_{HAL} = 137,74 \frac{mg}{kg}$$

$$CE50_{DIC} = 81,43 \frac{mg}{kg}$$

$$CE50_{PRO} = 117,10 \frac{mg}{kg}$$

2. Superficie de respuesta

En base a la evidencia de linealidad presentada en el apartado anterior, se ajustó el siguiente modelo de regresión lineal múltiple:

$$Y = 14,99 UT_{ATZ} + 19,25 UT_{CLE} + 28,47 UT_{HAL} + 10,56 UT_{DIC} \quad (10)$$

donde RMSE = 2,91 y los valores p de cada estimación de coeficiente fueron 10^{-9} , 4×10^{-12} , 10^{-15} y 4×10^{-6} , respectivamente. En este trabajo existió una relación de regresión lineal significativa entre la respuesta (índice de lesión) y las variables (herbicidas: UT_{ATZ} , UT_{CLE} , UT_{HAL} , UT_{DIC}) ya que el RMSE fue muy bajo y los valores p estuvieron por debajo del nivel de significancia predeterminado de 0,01. Por tanto, el modelo lineal fue significativo.

La Figura 16 muestra el gráfico diagnóstico del modelo de regresión lineal. En particular, la Figura 16a muestra la superficie ajustada de un modelo lineal ajustado cuando HAL y DIC son iguales a 1 unidad tóxica. La Figura 16b muestra una gráfica de probabilidad normal de los residuos del modelo lineal ajustado. Esto muestra cómo se compara la distribución de los residuos con una distribución normal con varianza equivalente. El gráfico de probabilidad pareció ser razonablemente recto, es decir, un ajuste razonable a los residuos distribuidos normalmente y tampoco hubo valores atípicos en el diagrama de dispersión de los residuos. La Figura 16c muestra el apalancamiento de cada muestra del diseño experimental Box-Behnken para tres niveles; en este estudio mostró que no hay puntos con alto apalancamiento. La distancia de Cook para cada muestra (o número de fila) se muestra en la Figura 16d. Hubo dos puntos con una gran distancia de Cook, sin embargo, estuvieron muy cerca del límite, lo que significa que no fueron atípicos y por tanto, el ajuste es fiable:

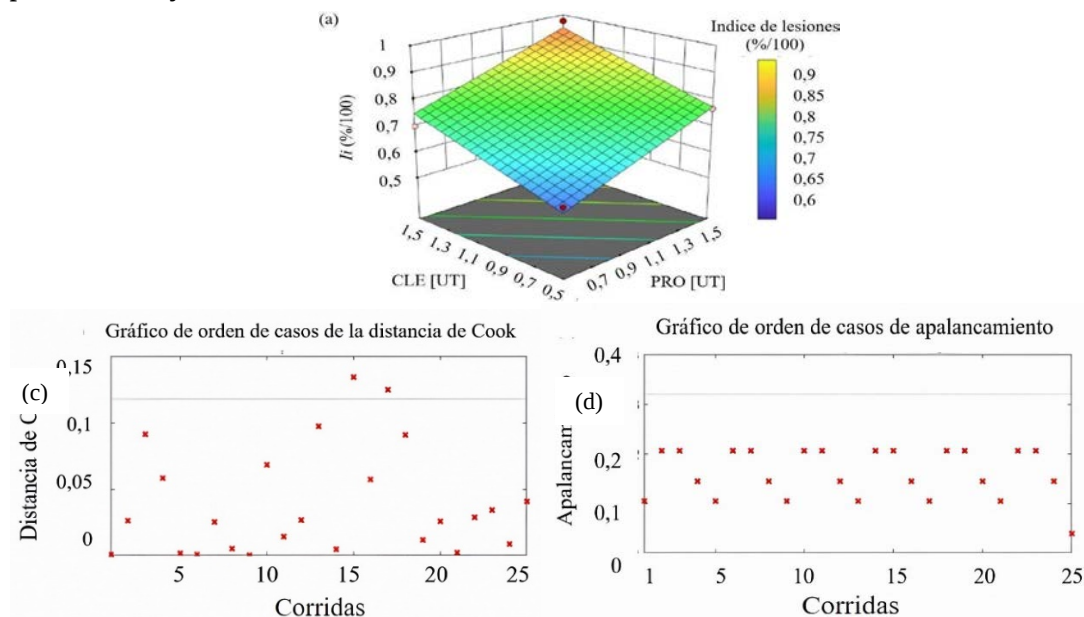


Figura 16. (a) Representación de la superficie de respuesta cuando HAL y DIC son equivalentes a 1 (UT); (b) Gráfico de probabilidad normal de los residuos; (c) Visualización de los valores de apalancamiento de las observaciones (números de fila) en el modelo ajustado; (d) Evaluación de la distancia de Cook para cada muestra (número de fila).

Las fotografías empleadas para los experimentos de los 4 herbicidas y luego su validación con la sustitución de atrazina por prometrina y los valores calculados se muestran en el material complementario M.3.1 y M.3.2.

3. Análisis de generalización del modelo

La Figura 17a muestra el índice de lesión versus el índice de lesión estimado usando el modelo lineal (Ec. 8), y la Figura 17b muestra el residual versus el número de observaciones (o número de fila). El primer gráfico muestra una alta correlación y el segundo gráfico muestra un pequeño error, lo que confirma la generalización del modelo.

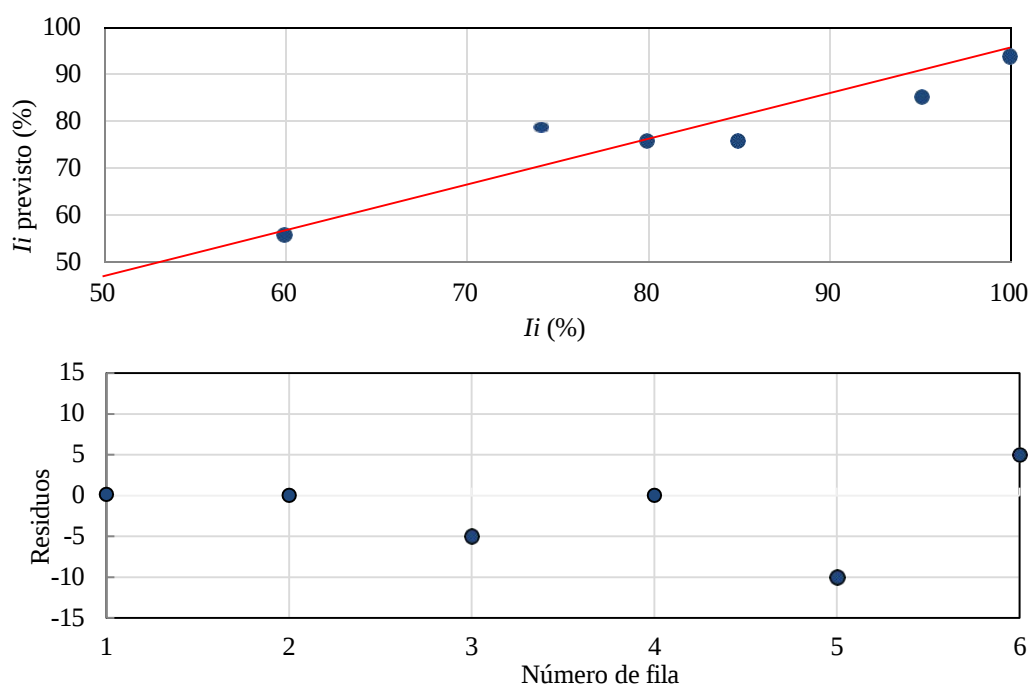


Figura 17. Evaluación de la generalización del modelo: (a) Comparación entre el índice de lesión estimado y el índice de lesión observado; (b) Representación de los residuos en función del número de fila.

4. Comparación de los indicadores biológicos en el monitoreo de la biomezcla

La Figura 18 a, b y c muestra los resultados obtenidos por las tres pruebas aplicadas en la biomezcla durante 210 días con el fin de comparar la sensibilidad de estas pruebas para detectar toxicidad. Las pruebas de germinación de semillas son ampliamente utilizadas para evaluar la calidad de los sustratos (Luo et al., 2018). El índice de germinación (IG) es un indicador de los factores que afectan la germinación y el crecimiento de las raíces. La Figura 18a muestra la evolución temporal del IG. Hasta el día 60, el IG fue nulo, lo que indica fitotoxicidad en la biomezcla a pesar de la alta degradación de los herbicidas (Figura 18, capítulo 1). Posteriormente, el IG aumentó hasta alcanzar el 70% al final del ensayo. Según Zucconi (1985), valores de IG superiores al 60% indican sustratos que no son fitotóxicos y valores superiores al 80% se consideran como sustratos maduros. Este resultado demuestra la alta sensibilidad de *L. sativa* a bajas concentraciones residuales de herbicidas y/o a la presencia de sus metabolitos.

Las lombrices de tierra poseen un alto número de quimiorreceptores y terminaciones nerviosas en los segmentos corporales, que contribuyen a su capacidad para reaccionar a los químicos en su entorno. Esta sensibilidad, junto a sus capacidades locomotoras, determina la presencia o evitación de las lombrices en un hábitat adverso. La Figura 18b muestra que la respuesta neta (RN) de las pruebas de evitación fue de 100% en los días 0 y 60 (evitación total), y a partir del día 90 la RN comienza a disminuir muy levemente, alcanzando un valor del 50% a los 150 días. Al final del ensayo de degradación se alcanzó un valor negativo, indicando una preferencia del 25% por la biomezcla pulverizada. Este resultado indica que la biomezcla no sería tóxica, ya que una evitación >80% del sustrato analizado se considera tóxico (Hund-Rinke & Wiechering, 2001). En este caso, *E. fetida* muestra alta sensibilidad a concentraciones residuales de herbicidas y/o a posibles metabolitos de la degradación de herbicidas, como ocurrió en el bioensayo con *L. sativa*. La Figura 18c muestra la evolución temporal del índice de lesión calculado según la ecuación (1). Al inicio se registra un índice del 83% lo que indica una lesión severa tal como se describe en la Tabla 5: estados avanzados de las ampollas conducen a la ruptura de la cutícula (es decir, ampollas rotas) y posterior fragmentación en la parte posterior del cuerpo y ocasionalmente se pueden observar áreas necróticas (ennegrecidas); luego, el índice de lesión se reduce a un valor del 50% a los 60 días. Durante este tiempo, los herbicidas mostraron una alta degradación (> 98% para ATZ, CLE, HAL, PRO y > 95% para DIC) (ver Figura 11). Después de eso, el índice continúa disminuyendo desde lesiones moderadas hasta individuos sin lesión. Las fotografías de cada lombriz lesionada se encuentran en el material complementario M.4.

Como se puede observar, la prueba propuesta es más sensible a diferentes concentraciones de herbicidas, mientras que las otras dos pruebas no lo son, ya que su respuesta muestra cambios más pronunciados a medida que avanza el tiempo (es decir, a medida que disminuye la concentración total de herbicidas). Es decir, las pruebas de germinación y evitación se saturan en el estado de alta toxicidad hasta el día 120. Por lo tanto, la prueba de lesión mostró una mejor relación con la degradación de los herbicidas que la prueba de evitación y la prueba de germinación de semillas, lo que permite su aplicación directa para controlar la desintoxicación de la biomezcla.

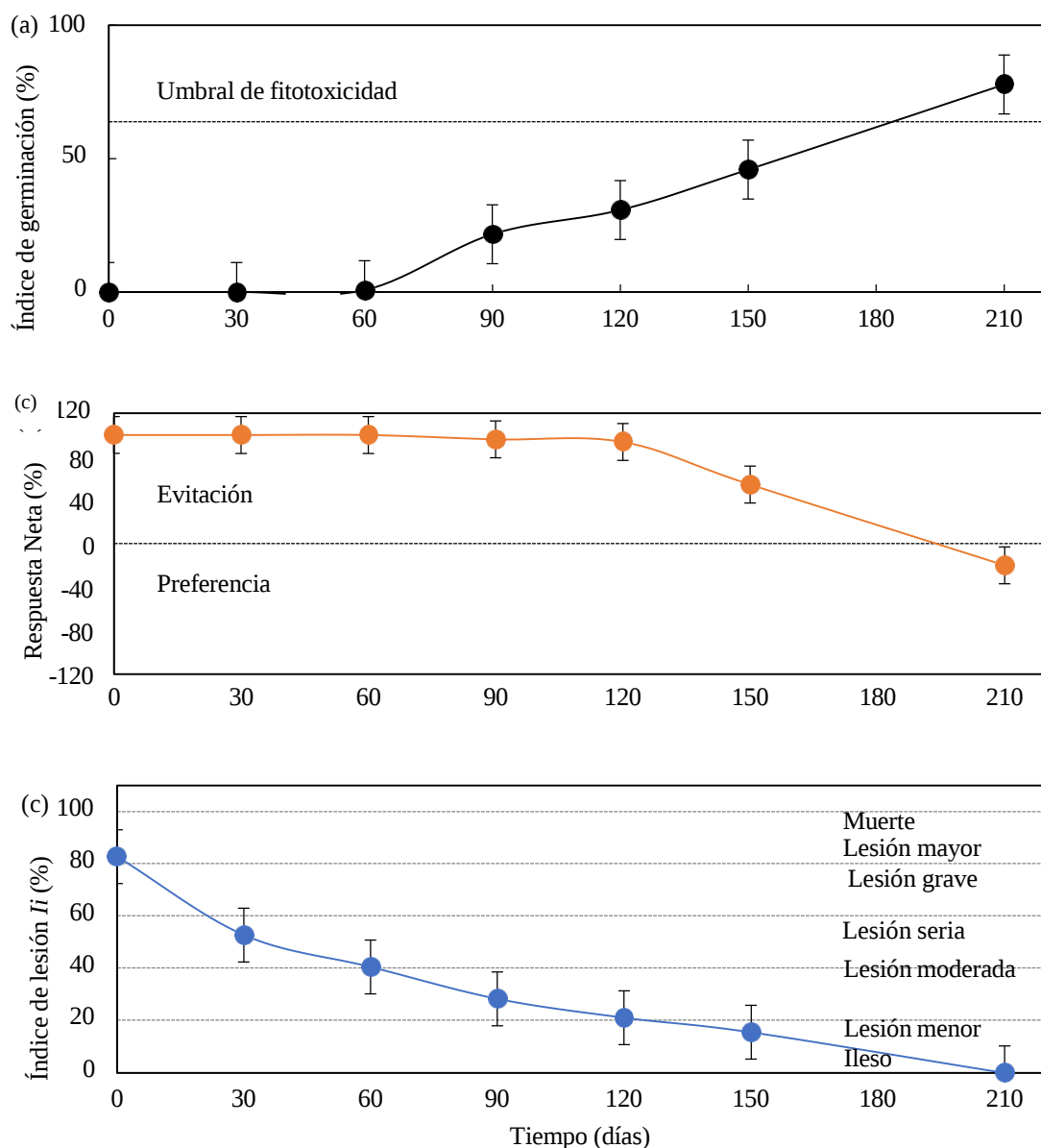


Figura 18. Evaluación comparativa de los tres índices: IG, RN e I_i .

La Figura 19 muestra la tendencia del índice de lesión versus la degradación promedio global de los herbicidas, donde se puede observar cómo el índice disminuye a medida que aumenta el porcentaje de degradación global de todos los herbicidas. En el día 60 el índice tiene un valor del 40% correspondiente a un porcentaje de degradación global del 98%. A partir del día 90, el porcentaje promedio de degradación se puede considerar casi del 100% ya que las concentraciones de los cinco herbicidas se encuentran por debajo de sus límites de detección; sin embargo, el índice disminuye verticalmente desde un valor de 28% a 7%, lo que indica que los posibles metabolitos tóxicos generados (no analizados) se fueron degradando a medida que avanzaba el ensayo. Finalmente, recién el día 210 el índice registró ausencia de lesiones en las lombrices, lo que podría estar reportando una disminución significativa en los metabolitos.

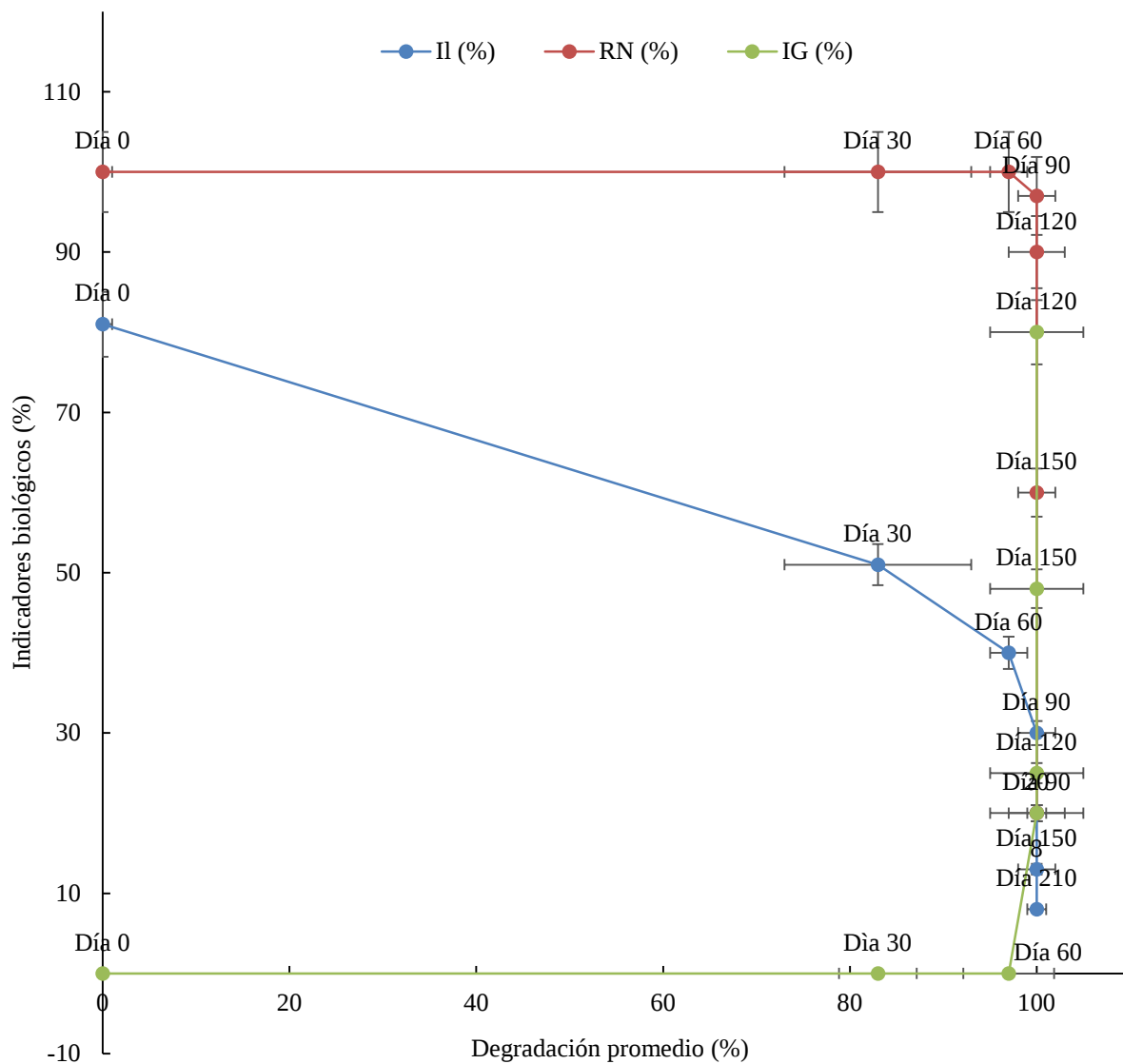


Figura 19. Representación de la relación entre el índice de evitación y la degradación promedio de los herbicidas para cada día de muestreo.

4.1. Predicción del índice de lesión. Uso del modelo de regresión lineal múltiple

Usando el modelo de regresión lineal múltiple, el índice en el día 0 del estudio de caso se pudo estimar usando la siguiente ecuación (ver Ec. 10):

$$I_I = 14,99 (UT_{ATZ} + UT_{PRO}) + 19,25 UT_{CLE} + 28,47 UT_{HAL} + 10,56 UT_{DIC} \quad (11)$$

Los valores resultantes son $I_{I \text{ estimado}} = 74\%$, mientras que el valor calculado con la Ec. (1) es $I_{I \text{ calculato}} = 83\%$. Se puede observar que el Índice está subestimado al utilizar el modelo, pero con un error razonable del 9%. Sin embargo, cabe señalar que este modelo no se pudo utilizar para predecir el índice en otros momentos de prueba debido a la presencia de metabolitos no medidos. Por lo tanto, no se tuvieron en cuenta en la derivación del modelo.

Conclusión

En un biolecho la completa mineralización de contaminantes o su transformación en compuestos menos perjudiciales no puede ser detectada solo mediante análisis químicos; durante el proceso, se deben realizar pruebas biológicas para garantizar la desintoxicación. Se encontró que un índice basado en el daño visualmente apreciable a *E. fetida* fue útil para el biomonitoreo in situ de una biomezcla contaminada con cinco agroquímicos (atrazina, cletodim, prometrina, haloxifop-P-metilo y dicamba). El índice mostró una buena relación con la degradación de pesticidas, lo cual es apropiado para controlar la desintoxicación de la biomezcla. El índice propuesto es una prueba simple y económica con un amplio rango de sensibilidad que podría ser utilizada por agricultores o usuarios de biolechos para monitoriar el proceso de degradación. Además, para facilitar el uso de la prueba, la clasificación del daño y el cálculo del índice podrían automatizarse mediante reconocimiento de patrones en una aplicación.

Capítulo 3

Evaluación de la toxicidad residual en biomezclas desgastadas y su posterior reciclaje para su potencial reutilización como enmienda

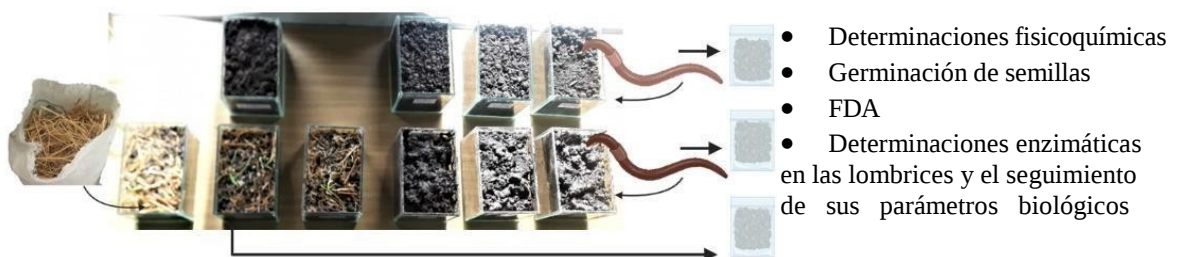


Introducción

La biomezcla no puede ser utilizada indefinidamente sin reemplazarla por materiales frescos cada cierto período, ya que su capacidad degradativa disminuye progresivamente. Esta situación, junto con la posibilidad de que la degradación de los herbicidas en la biomezcla genere metabolitos, resalta la importancia de desarrollar estrategias para su reciclaje, lo que permite una gestión sostenible de los biolechos.

Este estudio se enfoca en abordar la condición deteriorada de las biomezclas, reconociendo su potencial contaminante y la importancia de adoptar técnicas efectivas y sostenibles para su gestión. La biorremediación se presenta como un enfoque clave, haciendo hincapié en la biotransformación como una estrategia viable y económicamente eficiente. La integración de estos procesos no solo busca descontaminar las biomezclas desgastadas, sino también reciclarlas y mejorar sus propiedades para su futura reutilización, ya sea como enmiendas o fertilizantes en la agricultura. En este trabajo se puso especial énfasis en procesos que involucren la participación de las lombrices de tierra y la incorporación de materiales disponibles en la región. Por lo que se exploraron dos formas de biotransformación: la realizada con las lombrices de tierra *E. fetida* y *Aporrectodea trapezoides*, y la llevada a cabo mediante la adición de rastrojo de trigo. Con el propósito de evaluar estos procesos, se analizaron los parámetros fisicoquímicos, los macronutrientes presentes, así como los aspectos biológicos y bioquímicos relacionados con las lombrices de tierra involucradas.

Resumen gráfico



Objetivo

- Evaluar la toxicidad final de las biomezclas para establecer la inocuidad y posibilidad de su eventual reutilización como enmiendas o abonos.

Materiales y métodos

1. Preparación y armado de los tratamientos

Después de completar los ensayos de 120 días, en la semana siguiente se utilizó una parte de la biomezcla para iniciar una nueva investigación. La parte restante de la biomezcla continuó su monitoreo con los test biológicos hasta los 210 días. En esta investigación se prepararon los tratamientos con la biomezcla desgastada con *E. fetida* (BEF), la biomezcla desgastada con *A. trapezoides* (BAT), la biomezcla desgastada con la adición de rastrojo de trigo (BR) y el control de la biomezcla desgastada (BST) en cajas de vidrio con dimensiones de $15 \times 10 \times 10$ cm. Cada unidad experimental se recubrió con una película plástica perforada para permitir el intercambio gaseoso. Se llevaron a cabo tres réplicas de cada tratamiento. En cada caja, se colocaron 1000 g de biomezcla desgastada y se introdujeron 30 lombrices de tierra *E. fetida* cliteladas, con una biomasa promedio de 350 ± 25 mg, para el tratamiento BEF.

Para el tratamiento BAT, se introdujeron 10 lombrices de tierra *A. trapezoides* cliteladas, con una biomasa promedio de 1050 ± 25 mg. La elección de incorporar *A. trapezoides* se basó en su extensa distribución geográfica, su dominancia en una variedad de suelos, su capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas y su destacada tasa de reproducción.

En el caso del tratamiento BR, se mezcló la biomezcla desgastada con rastrojo de trigo en una proporción de 50:50 en volumen antes de colocarla en la caja. El proceso de vermirremediación se llevó a cabo durante un período de 90 días. En el estudio realizado, todos los ensayos se mantuvieron con un contenido de humedad de $70 \pm 4\%$ y la temperatura promedio se mantuvo alrededor de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

2. Evaluación de la estabilidad, madurez y calidad de los sustratos finales

La toma de muestra se efectuó siguiendo la metodología delineada en el primer capítulo. La evaluación de los procesos de biorremediación se realizó en conformidad con las directrices para los indicadores de estabilidad, madurez y calidad establecidas por el marco normativo para la producción, registro y aplicación de compost en Argentina (SGAyDS, 2019). El cronograma de muestreo y las determinaciones realizadas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Cronograma de las determinaciones para los tratamientos.

Día	Parámetros fisicoquímicos							IG	FDA	Lombrices de tierra			
	NH_4^+	MO	pH	CE	C/N	CO_2	Macronutrientes			Reproducción Biomasa	PT	AchE	LDH
0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
45									✓				
90	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

2.1. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos

El pH, la conductividad eléctrica, la temperatura y el contenido de materia orgánica se realizó según la metodología descrita en el capítulo 1. Las concentraciones de amonio se determinaron utilizando el método de Azul de Indofenol (Kit Wiener Lab. para Uremia) (Laos, et al., 2002). Para el análisis químico de macronutrientes (K, Mg, Na, Ca) las muestras fueron sometidas a digestión utilizando el método EPA 200.2 (Martín et al., 1994). La digestión involucra un ataque fuerte con ácidos inorgánicos fuertes y altamente oxidantes, asegurando la completa solubilización de todas las formas de macronutrientes. Posteriormente, estas alícuotas fueron sometidas a un proceso de tercerización para su ulterior análisis en un espectrómetro ICP-MS₄. Además, se llevó a cabo la determinación del fósforo disponible, extraíble o asimilable (P), que constituye el fósforo inorgánico absorbido principalmente por las plantas en las formas de PO_4^{3-} y PO_4H^- . Este proceso se realizó extrayendo una alícuota mediante la digestión de las muestras según el procedimiento EPA 200.2 (Martín et al., 1994). Una vez obtenido el extracto, se aplicó el método más comúnmente empleado para la determinación del contenido de fósforo, utilizando el método del ácido ascórbico-molibdato (Murphy y Riley 1962).

2.2. Producción de CO_2 o tasa de respiración

La técnica permite cuantificar la actividad microbiana total del sustrato de manera indirecta midiendo la actividad heterótrofa total. El método se basa en captar el dióxido de carbono (CO_2) liberado durante la respiración aeróbica por la muestra de suelo en una solución alcalina y transformarlo en carbonato, para luego ser medido como un índice de la tasa de respiración (Cooperband & Middleton 1996; Isermeyer, 1952). Se colocaron en frascos con tapa 10 gramos de sustrato con una humedad aproximada del 60%, dispuestos en recipientes plásticos. También se situó un recipiente con 10 ml de NaOH (1 N) y una porción de agua destilada. Se incluyó un blanco para determinar el CO_2 presente en el aire, colocando únicamente la trampa de NaOH en el mismo frasco. Se llevaron a cabo al menos 3 réplicas de las muestras. Los frascos se sellaron herméticamente y se incubaron a 25°C durante 72 horas en una estufa o sala con temperatura controlada, representativa y coherente con la presencia de los microorganismos que se deseaban evaluar. Cada 24 horas, se retiraron los frascos del lugar de incubación, se abrieron y se retiró la trampa de NaOH (Erlenmeyer), incluyendo la del blanco. Se añadieron 2 ml de la solución de BaCl_2 y se agitó manualmente hasta que apareció un precipitado blanco. Luego, se agregaron unas gotas de fenolftaleína y se tituló en el mismo Erlenmeyer con HCl (0,5 N) hasta que el viraje fue de rosa a incoloro. Después, las trampas se volvieron a llenar con NaOH y se colocaron nuevamente en los frascos para continuar con la incubación. Este procedimiento se repitió cada 24 horas hasta completar las 72 horas de incubación. La cantidad de C- CO_2 producida se calculó a partir de la diferencia en el consumo de HCl entre cada muestra y el blanco. La tasa respiratoria

promedio (mg C-CO₂/kg h), corregida por la humedad, se determinó a partir del promedio de la producción de C-CO₂ de los últimos dos días de incubación.

2.3. Prueba de germinación de *L. sativa* y crecimiento y reproducción de las lombrices de tierra de *E. fetida* y *A. trapezoides*

En concordancia con lo expuesto en el capítulo 2, las lombrices utilizadas en los experimentos fueron adquiridas del bioterio de INTEC, mientras que las semillas fueron suministradas por el programa Pro Huerta. Con el propósito de evaluar la fitotoxicidad de las biomezclas, se llevaron a cabo ensayos de germinación de semillas de *L. sativa*, determinando los Índices de Germinación (IG) mediante el método descrito en el inciso 3.1 del capítulo 2 para evaluar la fitotoxicidad de las biomezclas, y pruebas de evitación con *E. fetida*, según la metodología descrita previamente. Los parámetros biológicos de las lombrices, incluyendo crecimiento, supervivencia y fecundidad, fueron registrados en el estudio. Se realizaron mediciones que abarcaron desde la biomasa poblacional inicial y final hasta el recuento de organismos juveniles y ootecas. Una ooteca es la cápsula protectora que alberga los huevos de la lombriz de tierra.

La evaluación de la biomasa se llevó a cabo a nivel de grupo (pool) de lombrices, registrando su peso antes de ser introducidas en las unidades experimentales. Al término del experimento, cada unidad experimental fue invertida con cuidado mediante el uso de una bandeja para depositar el sustrato, con el fin de detectar la presencia de cada individuo adulto de lombriz de tierra. Esto implicó la identificación y el recuento tanto de individuos juveniles como de todas las ootecas presentes. Además, se efectuó un registro fotográfico de la excavación de las lombrices, es decir, la formación de galerías y la producción de bioagregados en los días 0, 30, 60 y 90.

2.3.1. Evaluación del contenido proteico y de las actividades enzimáticas LDH y AchE

Las lombrices de tierra seleccionadas al azar fueron separadas y almacenadas en la oscuridad durante 24 h para evacuar sus intestinos. Para estas técnicas se llevó a cabo la metodología empleada y puesta a punto en Lammertyn, et al 2021. Lombrices de tierra limpias (n = 6) se homogeneizaron en tampón de fosfato pH 7,2 (1:6 p/v) (Ultraturrax® T25 basic IKA labortechnik) a 24000 rpm durante 1 min. Se corrieron triplicados. Los homogeneizados se centrifugaron a 9000g durante 30 min a 4 °C para obtener la fracción S9 (fracciones microsomal y citosólica). Después de la centrifugación, los sobrenadantes se recogieron para las determinaciones desarrolladas a continuación. Los procedimientos se llevaron a cabo en baño de hielo.

El contenido de Proteína Total (PT) en la fracción S9 se cuantificó con un kit comercial basado en el método colorimétrico de Biuret. Se incubaron 0,05 mL del homogeneizado y 2 mL del reactivo (13 mmol L⁻¹ ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)/Cu en NaOH y alquil aril poliéter) a 37 °C durante 15 min. Se leyó la absorbancia a 540 nm (UV/Vis Perkin Elmer Lambda 35) y se determinó el contenido de proteína en base a una curva de calibración con una solución estándar de albúmina (Proti2 Wiener lab®).

La actividad de LDH se determinó utilizando el kit comercial Wiener lab. basado en determinaciones cinéticas colorimétricas. Para la LDH, se añadió una cantidad de 0,04 mL del homogeneizado a 2 mL de reactivo (NADH en solución tampón fosfato pH 7,2, que contenía piruvato y NaCl) y se midió la absorbancia a 340 nm una vez por minuto durante 3 min a 37 °C. La actividad enzimática específica se expresó como nmol de p-NPP hidrolizada por minuto por mg de proteína.

La actividad de AChE se determinó según el método descrito en Ellman et al., 1961. El medio de reacción consistió en 50 µl del homogeneizado, tampón fosfato pH 8, DTNB 0,01 M y AcSCI 0,075 M como sustrato. La cinética se registró espectrofotométricamente a 412 nm. La actividad enzimática específica se expresó como nmol de acetiltiocolina hidrolizada por min por mg de proteína, calculada con un coeficiente de extinción molar de $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico comparativo entre los tratamientos BEF y BAT en comparación con el control de la biomezcla sin tratar (BST) para la evaluación de los macronutrientes utilizando la prueba t de Student. Además, se llevó a cabo un análisis estadístico para examinar el efecto de las lombrices sobre la biomasa de cada especie a los 0 y 90 días, así como sobre las concentraciones de proteínas totales, LDH y AChE, utilizando también la prueba t de Student. Todos los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviaciones estándar, para lo cual se utilizó el programa Minitab® (versión 17.1.0). Respecto a la FDA, se continuó con el mismo enfoque estadístico descrito en el capítulo 1, ampliándolo con los datos obtenidos en este estudio.

Resultados y discusión

1. Indicadores de estabilidad y madurez

A continuación, se muestran los indicadores de estabilidad y madurez en el día 90, siendo comparados con los valores de referencia (SGAyDS, 2019) según se detalla en la Tabla 10. Se observó una reducción del 33% en la tasa de dióxido de carbono en el tratamiento con *E. fetida* en comparación con BST, situando el valor por debajo del límite máximo. Sin embargo, el tratamiento con *A. trapezoides* no mostró cambios evidentes, sugiriendo la necesidad de más tiempo para alcanzar los valores deseados. Todos los tratamientos exhibieron niveles muy bajos de amonio lo cual está relacionado con el bajo contenido de nitrógeno de la biomezcla original. El índice de germinación, un indicador crucial de la madurez del sustrato final, cumplió con el estándar superior al 60% (Tabla 10). Investigaciones anteriores indican que valores por debajo de este umbral pueden perjudicar el crecimiento de las plantas. En este estudio, los valores finales para BEF y BAT cumplieron con el estándar, destacando la mejora en la calidad de los sustratos biorremediados en relación a la biomezcla desgastada (BST) para promover el crecimiento de las plantas.

Tabla 10. Comparación de los valores BST, BEF, BAT con los indicadores de estabilidad y madurez según SGAYDS, 2019.

	Estabilidad y madurez	BST	BEF	BAT
Producción de CO ₂	< 120 mg de CO ₂ /kg h	160	107	159
Amonio (NH ₄ ⁺)	< 400 mg N-NH ₄ /kg	11,03	12,5	12
Índice de germinación	> 60%	51,6	80,3	80,4

2. Indicadores de calidad

Los sustratos se dividen en dos categorías principales: Clase A y Clase B (SGAYDS, 2019). La Clase A establece estándares más rigurosos en comparación con la Clase B, lo que resulta en una calidad superior. Todos los valores de referencia de acuerdo con los parámetros de calidad, así como los valores obtenidos para cada tratamiento específico, se presentan en detalle en la Tabla 11. En relación al contenido de carbono, los valores de BET y BAT se mantuvieron en concordancia con el control BST, alrededor de $3,72 \pm 0,27$ % en términos generales, salvo en el caso de BR, donde los valores fueron 26% más bajos. En términos de contenido de nitrógeno, BAT y BST presentaron valores similares en el rango de $0,35 \pm 0,2$ %, mientras que tanto BEF como BR mostraron una disminución del 18%. Estas variaciones resultaron en relaciones de carbono/nitrógeno diferente para los sustratos pertenecientes a la Clase A. Por otro lado, la conductividad eléctrica se mantuvo constante dentro de los intervalos establecidos para los sustratos de la Clase B.

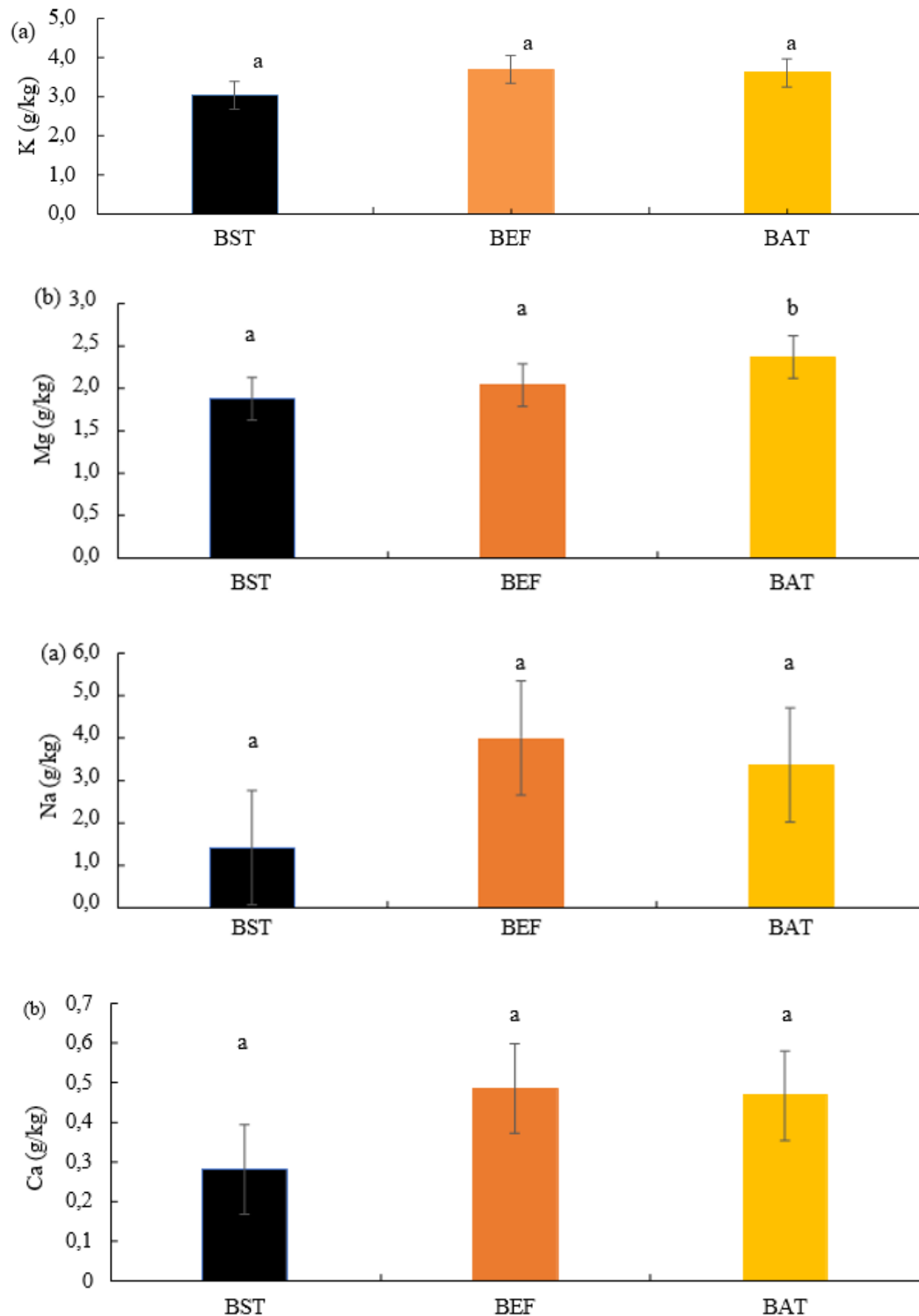
Tabla 11. Comparación de los valores BST, BEF, BAT con los indicadores de calidad según SGAYDS, 2019.

	Calidad		BST	BEF	BAT
	Clase A	Clase B			
pH		5,0 – 8,5	6,8	7,0	6,9
Olores	No debe presentar olores		No presenta	No presenta	No presenta
Humedad		< 60	70	72	75
CE (dS/m)	<4	<6	4,7	4,9	5,0
Relación C/N	<20	<30		9,6	10,2
MO (%)		<20	7,8	17,3	19,3

3. Dinámicas de los macronutrientes

Los macronutrientes juegan un papel crucial en el crecimiento óptimo de las plantas, y por lo tanto, se determinaron los niveles finales en los sustratos sometidos a biotransformaciones con *E. fetida* y *A. trapezoides*. En líneas generales, los tratamientos BET y BAT no revelaron aumentos significativos en los contenidos de potasio (Figura 20a), sodio (Figura 20c), calcio (Figura 20d) y fósforo (Figura 20e) en comparación con el control de la biomezcla desgastada, BST. Con excepción del magnesio (Figura 20b), donde el control BST mostró un valor de $1,87 \pm 0,28$ g/kg, la biotransformación con *A. trapezoides* experimentó un aumento significativo ($p > 0,05$), alcanzando un valor de $2,37 \pm 0,28$ g/kg. En contraste, la biotransformación con *E. fetida* no

mostró variaciones significativas en comparación con BST ($1,84 \pm 0,3$ g/kg). Este fenómeno podría atribuirse al hecho de que, en general, los bioagregados producidos por las lombrices de tierra contienen concentraciones más elevadas de macronutrientes en comparación con un sustrato no intervenido. Investigaciones previas han demostrado que estos bioagregados poseen alrededor de siete veces más potasio y el doble de calcio en comparación con el suelo circundante (Bhadauria y Saxena, 2010; Julka, 2008).



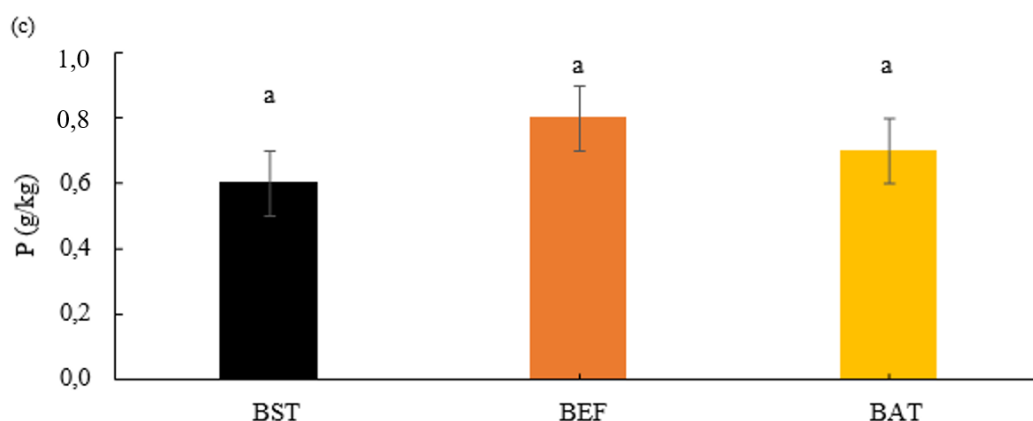


Figura 20. Comparación de los contenidos de macronutrientes (a) K; (b) Mg; (c) Na; (d) Ca; (e) P en los tratamientos BEF y BAT y la biomezcla desgastada (BST). Las letras distintas destacan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de exposición.

4. Efectos en las lombrices de tierra *E. fetida* y *A. trapezoides*

4.1. Impacto en la supervivencia, biomasa y reproducción

Las dos especies implicadas en los procesos exhibieron un rendimiento destacado y no se registró mortalidad en ninguna de las biotransformaciones. La Figura 21 ilustra los efectos en la biomasa poblacional de las lombrices de tierra al inicio y al final de las biotransformaciones. Se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la biomasa de la lombriz *E. fetida* a lo largo de los 90 días del período de estudio. Al comienzo del experimento, la biomasa total fue de $10,3 \pm 0,7$ g, mientras que al final aumentó a $14,0 \pm 0,3$ g, representando un incremento del 36 %. Estos hallazgos sugieren un impacto positivo en el crecimiento y desarrollo de *E. fetida*. En el caso de *A. trapezoides*, la biomasa presentó valores semejantes.

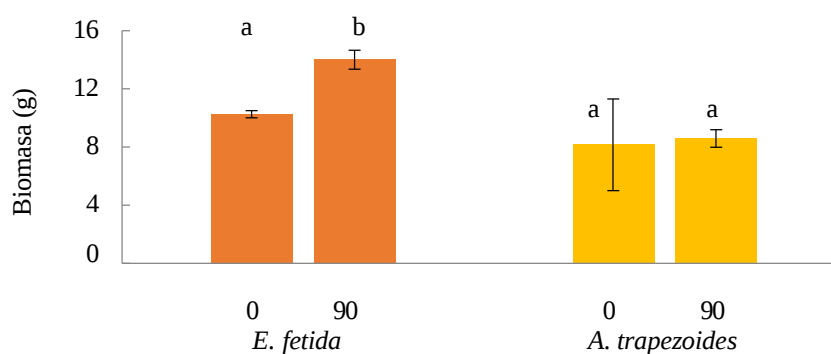


Figura 21. Evaluación de los cambios en la biomasa de las lombrices de tierra *E. fetida* y *A. trapezoides*. Las letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al concluir las biotransformaciones, se llevaron a cabo observaciones detalladas sobre los parámetros de reproducción de las lombrices de tierra. En el caso de *E. fetida*, se registró un promedio de 45 ± 9 ootecas. Esta notable producción de ootecas indica un ciclo reproductivo exitoso para esta especie. Además, se encontraron 53 ± 10 individuos juveniles, lo que confirma que la población está experimentando un crecimiento activo. Por otro lado, en el tratamiento con

A. trapezoides, se registró un promedio de 18 ± 3 ootecas. Es importante tener en cuenta que aunque este número es menor en comparación con *E. fetida*, sigue siendo un indicador positivo de reproducción. Además, es necesario considerar que este resultado puede estar influenciado por el número inicial de las lombrices de tierra en cada transformación biológica, el cual fue menor en el caso de *A. trapezoides*. Sin embargo, no se encontraron individuos juveniles en BAT, lo cual es un aspecto a tener en cuenta en relación con su crecimiento poblacional.

En relación a la actividad de las lombrices de tierra, al finalizar las biotransformaciones, se ha demostrado que estas contribuyen significativamente a mejorar la estructura de la biomezcla envejecida (Figura 22). Se resalta la creación de túneles, conductos cilíndricos generados por las lombrices durante su desplazamiento, los cuales facilitan el movimiento del agua, mejoran la aireación y sirven como vías para el crecimiento de las raíces de las plantas. Además, se ha observado la formación de bioagregados, que son agrupaciones de partículas del sustrato unidas por una matriz orgánica producida por las propias lombrices de tierra. Todo esto contribuye a establecer una estructura del sustrato que es tanto estable como resistente.



Figura 22. Sustratos finales. Además, se muestra el trabajo de las lombrices de tierra en cuanto a la excavación de lombrices (líneas negras) y actividades de lanzamiento (marcadas con líneas blancas) (a) BST; (b) BEF; (c) BAT.

4.2. Estudio del contenido proteico y de las actividades enzimáticas en las lombrices

Los parámetros de supervivencia, la biomasa y la reproducción antes mencionados depende del eficiente sistema eliminador de radicales de las lombrices de tierra, que incluye proteínas y enzimas especiales.

En la Figura 23a se observó un incremento (22%) estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el contenido proteico de *E. fetida*, con valores de $1,59 \pm 0,04$ mg/g en el día 0 y $1,94 \pm 0,09$ mg/g después de 90 días de exposición. En contraste, *A. trapezoides* no mostró diferencias significativas en el contenido proteico. Aunque algunos estudios han reportado disminuciones en el contenido de proteínas, este no parece ser el caso para los herbicidas evaluados en este estudio (Ismail et al., 1997; Li et al., 2019).

Después del proceso de biorremediación, se observó que LDH no tuvo cambios estadísticamente significativos (Figura 23b). LDH es una enzima metabólica involucrada en la producción de energía anaeróbica, el reciclaje de NADH y la gluconeogénesis (Rico et al., 2016; Tripathi et al., 2011). Los autores encontraron que la actividad de LDH en *E. fetida* dependía del tipo de plaguicida al que está expuesta pero también de la concentración utilizada; por ejemplo, el tebuconazol aumentó los niveles de LDH en concentraciones más bajas, pero la inhibió en las más altas. Algunos autores también han encontrado que la LDH en otras especies de lombrices de tierra disminuyó al aumentar las dosis de un insecticida (Tripathi et al., 2009).

Durante el proceso de biorremediación en *E. fetida*, no se evidenciaron cambios en la actividad enzimática de AchE. Al estudiar *A. trapezoides*, se observó un incremento significativo ($P < 0,05$) en la actividad de la AchE. En este caso, los valores experimentaron un aumento del 71%, partiendo de $32,74 \pm 3,11$ nmol/ min mg de proteína y llegando a $55,97 \pm 4,3$ nmol/ min mg de proteína al concluir el mismo período (Figura 23c). Es fundamental destacar que la AchE desempeña un papel crucial al prevenir la persistencia de impulsos nerviosos, especialmente aquellos dirigidos a los músculos y aquellos que circulan a través de fibras colinérgicas del sistema nervioso autónomo (Bello-Ramírez et al., 2000; Joshi & Sharma, 2011). A diferencia de los hallazgos presentados en este estudio, otras investigaciones han señalado la inhibición de la AchE en *Eisenia Andrei*, específicamente para exposición a los insecticidas endosulfán, temefos, malatión y pirimifos- metilo (Stepić et al., 2013), así como para deltametrina (Velki & Hackenberger, 2013). En este contexto, el comportamiento de AchE en *A. trapezoides* muestra una falta de especificidad frente a diversos herbicidas y sustratos; por lo que es valioso investigar su comportamiento en cada situación específica.

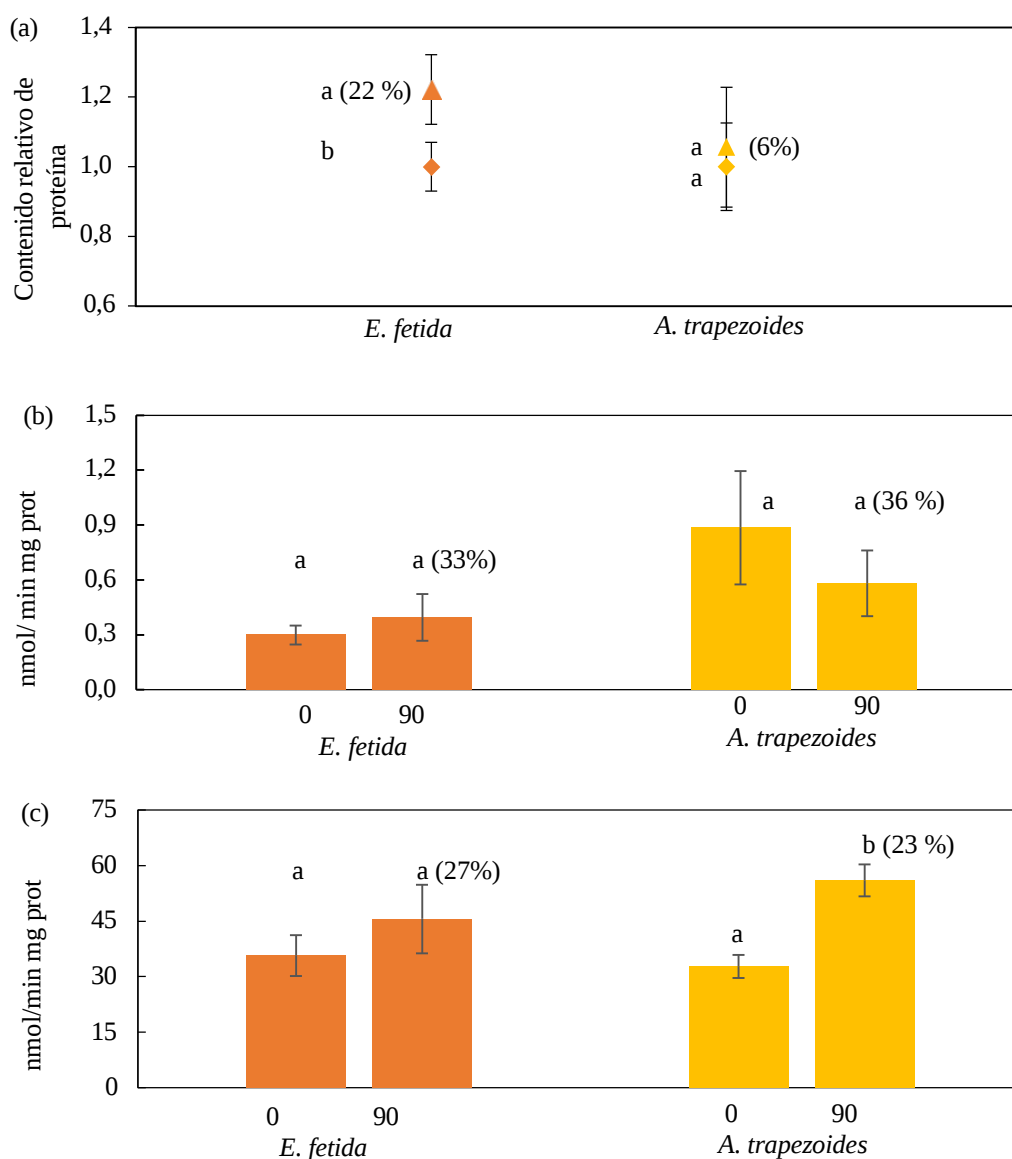


Figura 23. (a) Variación en el contenido de proteína de las lombrices de tierra *E. fetida* y *A. trapezoides*; (b) Variación en las actividades enzimáticas de Lactato Deshidrogenasa; (c) Variación en la Acetil Colinesterasa. Letras distintas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5. Análisis de biotransformación BR: evaluación enzimática por FDA y la descomposición del rastrojo de trigo

La Figura 24 muestra los resultados de la actividad enzimática evaluada mediante el uso de FDA, expandiendo la información presentada en la Figura 13 del Capítulo 1 para los días 120, 165 y 210. Se incluye un análisis estadístico para cada día entre grupos, es decir, entre la biomezcla desgastada y el tratamiento BR. Como se discutió previamente en el primer capítulo, se observó una disminución progresiva en la actividad enzimática por FDA durante el primer mes del ensayo, en correlación con la desaparición visual del rastrojo de trigo. Estos cambios fueron documentados fotográficamente desde la preparación de la biomezcla (Tabla12, imagen a), marcando el inicio

del proceso dinámico con la aparición del hongo de pudrición blanca a los 14 días de maduración (Tabla 12, imagen b).

Después de la aplicación de herbicidas y el consecuente aumento en la actividad enzimática, se evidenció un deterioro en la biomezcla, inicialmente caracterizado por la descomposición casi completa del rastrojo de trigo (Tabla 12, imágenes c y d).

A los 120 días del inicio del ensayo de degradación, la cantidad de biomezcla se dividió en dos partes. En una de ellas, se añadió un 50% adicional de rastrojo de trigo (BR) (Tabla 12, imágenes e y f), mientras que la otra se sometió a monitoreo mediante pruebas biológicas. En el día 145, la adición de rastrojo de trigo resultó en una recuperación significativa ($p < 0,05$) del 49% en la actividad enzimática medida mediante FDA (Figura 24), y un aumento significativo ($p < 0,05$) del 66% después de 90 días, equivalente al día 210 (Figura 24).

La observación de la biotransformación de la biomezcla desgastada (BR) revela la reaparición del hongo de pudrición blanca en dos instancias específicas: días 165 y 210 (Tabla 12, imágenes g y h). A pesar de estas asociaciones, persisten interrogantes respecto a la estrategia óptima de recomposición del rastrojo de trigo en la biomezcla, sugiriéndose la realización de investigaciones adicionales para determinar los cambios positivos y mejorar la metodología en cuanto al momento adecuado para la recomposición del material.

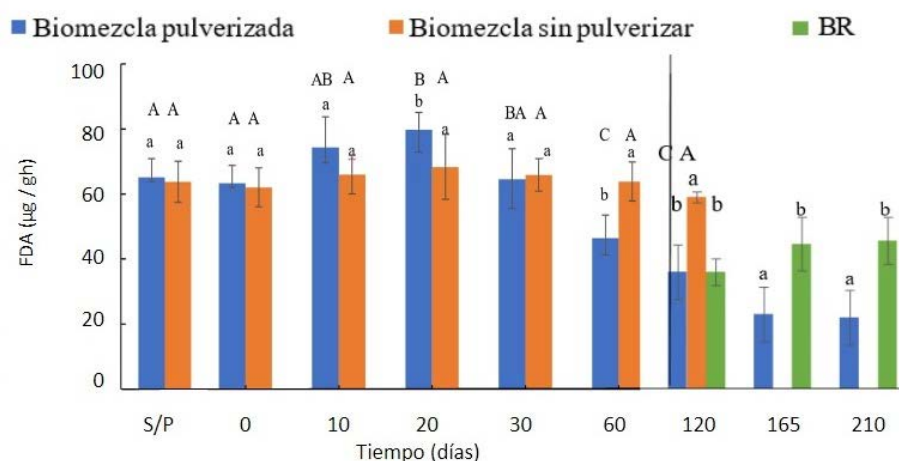


Figura 24. Integración de los resultados de la actividad hidrolítica sobre el compuesto de FDA, tanto de los ensayos de degradación presentados en el capítulo 1 como de los obtenidos en la posterior biorremediación.

Tabla 12. Dinámica de los cambios visuales en la biomezcla

	Duración de cada etapa del ensayo	Tiempo (días)	Inspección visual
Maduración de la biomezcla	45 días	0	(a) 
		14	(b) 
Ensayo de degradación de los herbicidas	120 días	0	(c) 
		60	(d) 
		120	(e) 
Ensayo de transformación biológica	90 días	120	(f) 
		165	(g) 
		210	(h) 

Conclusión

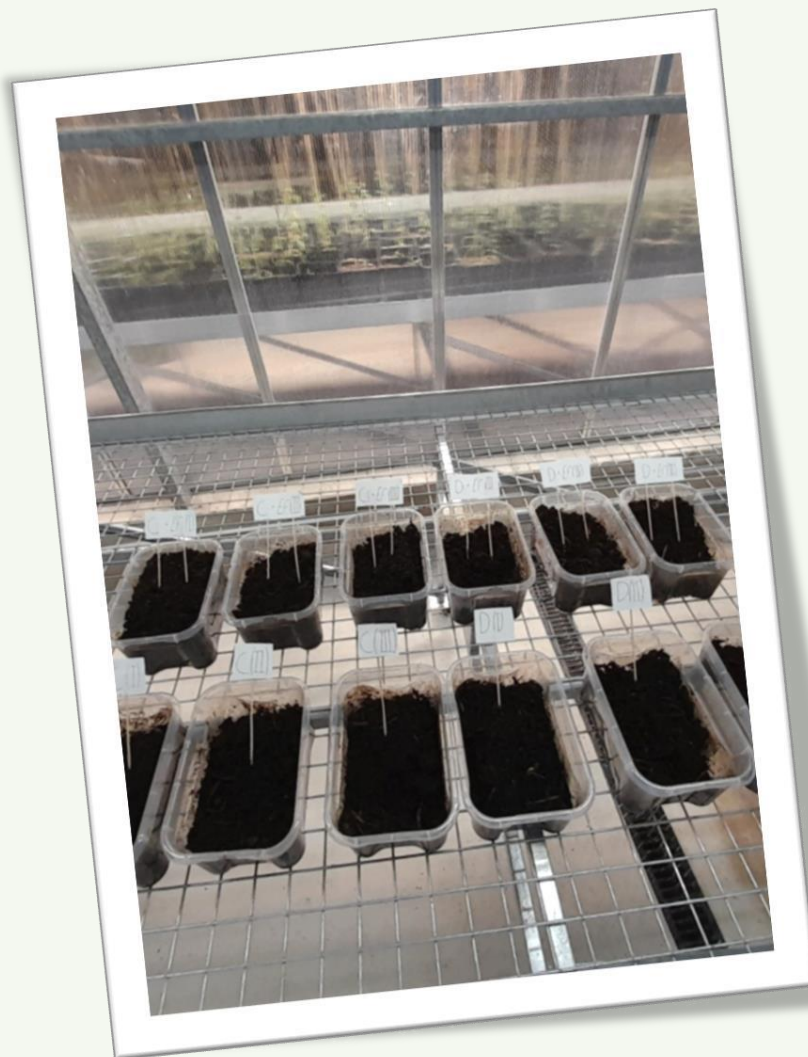
La biomezcla residual pudo reciclarse eficientemente incorporando la acción de las lombrices de tierra. Los procesos de vermitransformación con *E. fetida* y *A. trapezoides* permitieron obtener sustratos estables y maduros para ser utilizados como biofertilizantes. Es decir, se logró reciclar un residuo que puede ser considerado peligroso en un sustrato con valor para uso agrícola.

La especie *E. fetida* tuvo un mejor desempeño en cuanto a biomasa, reproducción y los biomarcadores ensayados.

El tratamiento con rastrojo de trigo se destacó como una vía prometedora para la continuidad de la biomezcla desgastada, ofreciendo no solo una solución para la degradación continúa de agroquímicos, sino también una oportunidad para revitalizar estos biolechos para su futura reutilización. Sin embargo, se enfatiza la necesidad de investigaciones adicionales para perfeccionar la estrategia de recomposición del material, garantizando su aplicación efectiva en la gestión sostenible de las biomezclas.

Capítulo 4

Biorremediación de residuos agrícolas en cultivos de olivar



Introducción

En el contexto de una estancia de investigación respaldada por una subvención de la Universidad de Jaén, España, este capítulo se centra en la biorremediación de agro-residuos específicos en la región de Jaén. Durante esta experiencia, se llevó a cabo un intercambio enriquecedor de conocimientos y técnicas, con énfasis en la conversión de residuos agropecuarios en recursos de alta calidad para la agricultura.

La investigación se focalizó en abordar la gestión de desechos generados durante el proceso de extracción de aceite de oliva, en el contexto del aumento en la producción global de este aceite. Particularmente, el alpeorujo u orujo de oliva, un subproducto resultante de la extracción del aceite, caracterizado por ser un residuo sólido de tonalidad marrón con una composición rica en agua, aceite residual, fibra, potasio y polifenoles. A pesar de sus propiedades favorables, la abundancia de este residuo plantea retos para las industrias debido a su alta fitotoxicidad, riesgos de contaminación y los gastos asociados a su eliminación adecuada.

En este contexto, la investigación se enfocó en la gestión ambientalmente responsable y económicamente viable de los residuos derivados de la industria del aceite de oliva, prestando especial atención al alpeorujo. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la viabilidad de la biorremediación a través de procesos de biotransformación, utilizando materiales fácilmente disponibles y contando con la colaboración de lombrices de tierra. La evaluación se centró en diversos parámetros, tales como las propiedades físicoquímicas, la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, el análisis de la abundancia de la comunidad microbiana, la riqueza metabólica del sustrato, la diversidad funcional específica de la comunidad microbiana (ecoplacas) y el desempeño de las lombrices de tierra involucradas en el proceso. Cada uno de estos parámetros seleccionados proporcionó información clave sobre la calidad final de los sustratos y su potencial para ser reutilizados en la agricultura a lo largo de dichos procesos. Los resultados obtenidos evidenciaron la efectividad de los tratamientos en la biorremediación de residuos agrícolas, destacando aquellos que incorporaron la presencia de las lombrices de tierra. Además, se sugiere que la continuidad del experimento podría maximizar los beneficios, permitiendo la obtención de una enmienda orgánica de alta calidad.

Objetivo

- Evaluar el vermicompostaje como vía de valorización del alpeorujo.

Materiales y métodos

1. Recolección de agro-residuos

Los tratamientos se llevaron a cabo en el Instituto Universitario de Investigación en Olivar y Aceite de Oliva, Universidad de Jaén (España). El orujo de oliva (también denominado alpeorujo)

y las hojas de olivo se obtuvieron de una almazara situada en Puente del Obispo (Jaén). El estiércol vacuno se obtuvo de una explotación ganadera de Mancha Real (Jaén) y el estiércol equino se adquirió en una planta de compostaje local y se aprovechó directamente de su envase (Figura 25). Las propiedades fisicoquímicas de estas materias primas se muestran en la Tabla 13.



Figura 25. (a) y (b) Ubicación en donde se llevó a cabo el ensayo; (c) Sitios de extracción de los materiales: 1) Universidad de Jaén, 2) mancha real y 3) puente del Obispo; (d) Materiales/agro-residuos.

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas de los materiales empleados (sobre peso seco).

Variables	Alperujo	Estiércol vacuno	Estiércol equino	Hojas de olivo
pH (1:2.5)	4,8	7,47	6,21	Nd
Materia orgánica (%)	72,0	41,2	55,8	85,4
N (%)	1,25	1,62	3,19	1,04
C (%)	50,2	21,8	38,8	49,1
K (mg/g)	0,83	0,6	13,9	1,76
Mg (mg/g)	0,82	nd*	6,14	1,01
Na (mg/g)	0,29	Nd	4,22	0,26
Ca (mg/g)	0,71	Nd	3,3	34,9
P (mg/g)	0,27	3,04	4,39	0,68
Zn (mg/g)	26,3	30,5	91,5	22,1
Cu (mg/g)	14,5	55,3	43,1	69,0
Mn (mg/g)	7,56	50,1	47,5	59,6
Ni (mg/g)	6,23	2,34	15,3	18,7
Fe (mg/g)	93,2	300,6	370,9	654,3
Cr (mg/g)	5,65	7,56	2,73	2,76

*nd = no detectado.

2. Diseño Experimental

Se implementó un diseño factorial completamente anidado para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en diversas variables de interés. Los tratamientos que fueron identificados con los códigos: OLB, OLBE, OLH, OLHE y O (descritos en 2.1.). Todos los tratamientos tuvieron dos etapas, como se muestra en la Figura 26. En la primera etapa, se llevó a cabo una mezcla compuesta por alpeorujó, estiércol (vacuno o equino), y hojas de olivo en proporciones específicas (70% alpeorujó, 20% estiércol, 10% hojas de olivo), con el objetivo de brindar una base sólida y uniforme para el compostaje. Esta mezcla se sometió a un periodo inicial de 45 días en cajas de dimensiones 30 x 20 x 20 cm. La humedad de los tratamientos se mantuvo en aproximadamente 50 ± 10 % reemplazando la pérdida de agua semanalmente. La temperatura ambiente promedio se reguló a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Además, los tratamientos se mezclaron cada 14 días para permitir la aireación y la homogeneización durante la biorremediación.

En la segunda etapa, se realizó una subdivisión del material en cajas de 15 x 10 x 10 cm, replicando este proceso en triplicado. En los tratamientos OLBE y OLHE, se introdujo *E. fetida* durante la etapa 2, con el propósito de evaluar su efecto en el proceso de compostaje. Durante 45 días adicionales, se llevó a cabo el compostaje adicional. Se implementó asignación aleatoria y replicación para asegurar resultados robustos.

2.1. Descripción detallada de los tratamientos

OLB: Se mezclaron alpeorujó, estiércol vacuno y hojas de olivo en proporciones 70%, 20%, 10% p/v. Tras 45 días, el material se dividió en tres réplicas, y cada subdivisión fue sometida a 45 días adicionales de tratamiento.

OLBE: Proveniente de OLB (45 días), se dividió en tres réplicas, y cada subdivisión fue sometida a 45 días más de tratamiento con la introducción de *E. fetida* durante el mismo período.

OLH: Se combinó alpeorujó, estiércol equino y hojas de olivo en proporciones 70%, 20%, 10% p/v. Después de 45 días, el material se dividió en tres réplicas, y cada subdivisión fue sometida a 45 días más de tratamiento.

OLHE: Derivado de OLH (45 días), se dividió en tres réplicas, y cada subdivisión fue sometida a 45 días más de tratamiento, con la introducción de *E. fetida* durante el mismo período.

O: Tratamiento exclusivo del alpeorujó. Aunque no se realizaron modificaciones, se aplicó el mismo procedimiento respecto a las subdivisiones (etapas 1 y 2).

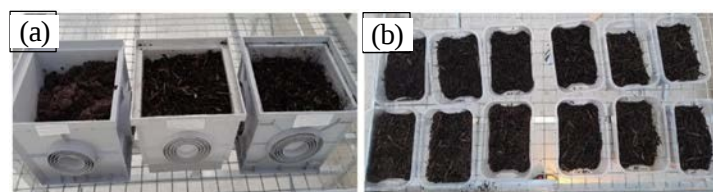


Figura 26. Tratamientos en las diferentes etapas del experimento, (a) Etapa 1 y (b) Etapa 2, ambas con una duración de 45 días.

3. Lombrices de tierra utilizadas

Las lombrices de tierra utilizadas en los experimentos fueron de la especie *E. fetida* (Figura 27), proporcionadas por una empresa de cría de oligoquetos terrestre y aclimatadas en el invernadero de la Universidad de Jaén a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, luz artificial constante, $50 \pm 10\%$ de contenido de humedad, alimentación semanal siguiendo la metodología detallada en (Masin & Rut Rodríguez, 2012; OECD, 1984). Todos los individuos se encontraban en estadios adultos con un peso corporal promedio de $300 \pm 25 \text{ mg}$, con un clitelo bien desarrollado (engrosamiento glandular que sólo se desarrolla en la etapa reproductiva). Antes de ser expuestas, las lombrices de tierra fueron colocadas en recipientes oscuros y aireados (cajas de vidrio con láminas de plástico perforadas para garantizar el intercambio gaseoso) durante 24 horas para vaciar sus intestinos. La temperatura se controló mediante un termómetro digital durante todo el período de biotransformación.



Figura 27. (a) Lombrices de tierra antes de someterse a los procesos de biotransformación; (b) Lombrices de tierra al inicio del ensayo en las unidades experimentales.

4. Muestreo y variables de medición

Al principio y al final del experimento, se recogieron alrededor de 100 g de muestras de cinco puntos diferentes en la capa superior, media e inferior de cada unidad experimental. Una vez recolectadas, las muestras se secaron en estufa (40°C) y se molieron a $<1 \text{ mm}$ con un molino de cuchillas. Las determinaciones realizadas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Cronograma de la toma de muestras para las medidas de las distintas variables: el contenido en materia orgánica, el pH, la conductividad eléctrica, la producción de CO_2 , la relación C/N, los macronutrientes, NH_4^+ NH_3^- , microelementos, actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP), Perfil de utilización de fuentes de carbono (ecoplacas) y parámetros biológicos de las lombrices (biomasa y reproducción).

Día	T	MO	pH	CE	CO_2	C	N	Macronutrientes	NH_4^+	NH_3^-	Micro elementos	ALP	Ecoplacas	Lombrices
0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20		✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓			
45		✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	
60	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓			
90	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓

Las lombrices de tierra utilizadas en los experimentos fueron de la especie *E. fetida*, proporcionadas por una empresa de cría de oligoquetos terrestre y aclimatadas en el invernadero de la Universidad de Jaén a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, luz artificial constante, $50 \pm 10 \%$ de contenido de humedad, alimentación semanal siguiendo la metodología detallada en Masin, C. E., & Rodríguez (2012) y OECD (1984). Todos los individuos se encontraban en estadios adultos con un peso corporal promedio de $300 \pm 25 \text{ mg}$, con un clitelo bien desarrollado (engrosamiento glandular que sólo se desarrolla en la etapa reproductiva). Antes de ser expuestas, las lombrices de tierra fueron colocadas en recipientes oscuros y aireados (cajas de vidrio con láminas de plástico perforadas para garantizar el intercambio gaseoso) durante 24 horas para vaciar sus intestinos. La temperatura se controló mediante un termómetro digital durante todo el período de compostaje.

4.1. Determinación de variables fisicoquímicos

El pH se determinó en una mezcla de material y agua desionizada (1:2.5 p/v) y se midió con un pHmetro HACH®HQd Field Case. El contenido de materia orgánica se obtuvo gravimétricamente por ignición a 550°C , como la diferencia entre el peso seco original y las cenizas (Nelson & Sommers, 1983). Respecto al contenido de CHN, una vez pesada la biomasa, se molió completamente hasta pulverizar una alícuota de entre 20 y 100 g con un molino de martillos con tamiz de 1 mm. El carbono y el nitrógeno se analizaron en un analizador elemental automático (Leco TruSpect Micro). Se llevó a cabo la digestión perclórico-nítrica (3:5 v/v) de una porción de la biomasa molida, siguiendo el protocolo del método EPA 200.2 (Martín et al., 1994). Este método se empleó para realizar el análisis químico de macronutrientes (P, K, Mg, Na, Ca) y micronutrientes (Cu, Zn y Mn). Las muestras fueron digeridas utilizando y posteriormente analizadas mediante un espectrómetro ICP-MS (Agilent 7900). Las concentraciones de nitrato y amonio se evaluaron utilizando los métodos colorimétricos de Shinn, 1941 y Laos, et al. 2002 (1966), respectivamente. Para llevar a cabo el análisis, se prepararon extractos en una solución de KCl 2 M (1:10; sustrato: extractante), agitándolos a 150 rpm durante 2 horas. Posteriormente, se filtraron y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Zuzi modelo 4201/50 a una longitud de onda de 520 nm. La producción de CO_2 se midió según el procedimiento detallado en la sección 2.2 de Materiales y Métodos del Capítulo 3 (Isermeyer, 1952).

4.2. Dinámica de la actividad fosfatasa alcalina (ALP)

La elección de seguir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP) como indicador biológico se fundamenta en su participación en el ciclo del fósforo, un macronutriente esencial en sustratos destinados a la agricultura. Con el objetivo de evaluar esta actividad, se recolectaron muestras en intervalos de 0, 45 y 90 días de tratamiento, utilizando el método del p-NPP, conforme al procedimiento descrito por Tabatabai y Bremner en 1969. El procedimiento consistió en agregar el sustrato p-nitrofenil fosfato a 1 gramo de muestra, seguido de una incubación de 1 hora en un

baño maría a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de hidróxido de sodio, luego se llevó a cabo la filtración y finalmente se cuantificó la cantidad de p-nitrofenol (PNP) liberado mediante un análisis colorimétrico a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Zuzi modelo 4201/50.

4.3. Perfil de utilización de fuentes de carbono de la comunidad microbiana

Se utilizaron Biolog EcoPlates™ para analizar el uso de diversas formas de carbono por parte de las comunidades microbianas de las mezclas, lo que permite, mediante análisis colorimétrico y posterior tratamiento matemático, establecer la huella metabólica de los microorganismos de las mezclas. La medición de los perfiles fisiológicos a nivel comunitario se basa en el método Biolog EcoPlates™, una técnica que caracteriza la diversidad metabólica del suelo mediante una prueba estándar en el que se inoculan extractos diluidos de suelo en un kit con 96 pocillos, que incluyen 3 réplicas de 32 diferentes fuentes de carbono más un control (Gałązka et al., 2017; Garland, JL y Mills, 1991; Grzadziel et al., 2019). Estas fuentes de carbono representan distintos grupos de sustratos que son metabolizados más habitualmente por las bacterias: 1) Aminas y amidas, 2) Aminoácidos, 3) Carbohidratos, 4) Ácidos carboxílicos, y 5) Polímeros. Las fuentes de carbono pueden verse en la Tabla 15.

Tabla 15. Fuentes de carbono involucradas.

	A2 β-Metilo-D-Glucósido	A3 Ácido D-Galactónico γ-Lactona	A4 L-Arginina
	B2 D-Xilosa		
B1 Éster Metílico del Ácido Pirúvico		B3 Ácido D-Galacturónico	B4 L-Asparagina
C1 Tween 40	C2 i-Eritritol	C3 Ácido 2-Hidroxibenzoico	C4 L-Fenilalanina
		D3 Ácido 4-Hidroxibenzoico	
D1 Tween 80	D2 D-Manitol		D4 L-Serina
E1 α-Ciclodextrina	E2 N-Acetil-D-Glucosamina	E3 Ácido γ-Aminobutírico	E4 L-Treonina
F1 Glucógeno	F2 Ácido D-Glucosamínico	F3 Ácido Itacónico	F4 β-Hidroxi-Glicil-L-Glutámico
G1 D-Celobiosa	G2 Glucosa-1-Fosfato	G3 Ácido α-Ceto-butírico	G4 Feniletilamina
H1 α-D-Lactosa	H2 D,L-α-Glicerol Fosfato	H3 Ácido D-Málico	H4 Putrescina

La utilización de cada fuente de carbono por los microorganismos del extracto de suelo libera electrones que mantenían unidos los enlaces covalentes reduciendo el tetrazolio que hay en cada uno de los pocillos, generando color violeta/púrpura cuya intensidad, en comparación con el

control, se determina colorimétricamente por absorbancia a 590 nm (O.D. 590nm-control – O.D. 590nm-sustrato). Por lo tanto, a mayor actividad metabólica sobre una fuente de carbono concreta, el color púrpura será más intenso, lo que se traduce en mayor absorbancia con respecto al control. En este estudio, 24 h antes de la inoculación en placa, se añadieron 10 g de las mezclas en un vaso de precipitado y se hidrataron con 3 ml de agua destilada. Tras 24 h, se añadieron 100 ml de una solución de NaCl (0,85%) y se agitó durante 30 min. Se cogieron 20 ml del sobrenadante, se filtraron por una malla de 53 micras y se inocularon 120 µl de este filtrado a cada pocillo (Figura 28). La placa se incubó en estufa a 28 °C durante 120 h y se midió en un lector de placas computarizado.

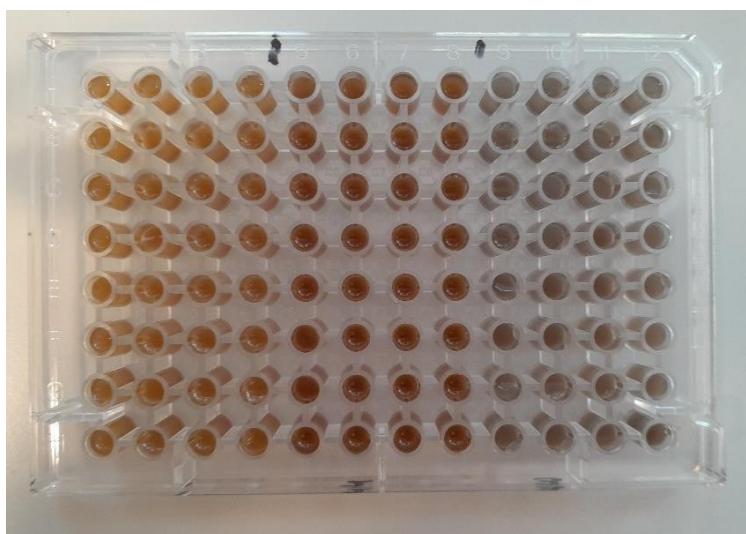


Figura 28. Fotografía de una Ecoplaca durante la ejecución de la técnica.

Una vez se obtuvo la absorbancia de cada pocillo se calcularon los siguientes índices:

Respuesta metabólica promedio (AMR): representa el promedio de densidad óptica de todas las fuentes de carbono en relación al control. La AMR es un indicador de la actividad metabólica global, que puede mostrar abundancia promedio, de la comunidad microbiana en una muestra de suelo, en este caso en la mezcla. Esta variable también puede calcularse para cada grupo de sustratos de la muestra, promediando únicamente los pocillos de cada tipo de sustrato (Garland, JL y Mills, 1991).

$$AWCD = \frac{\sum(C - R)}{n}$$

Siendo C la lectura del sustrato en el pocillo (O.D. 590); R lectura del control en el pocillo (O.D.590); n número de sustratos en un EcoPlate™ (n = 31)

Riqueza metabólica de la comunidad microbiana (Richness, S): representa la suma de sustratos en los que se ha determinado positivamente que hay actividad metabólica; que se traduce en el número de pocillos con desarrollo de color (número de sustratos utilizados con DO590 ≥ 0,25) (Jałowiecki et al., 2016).

Diversidad (H'): para cuantificar la diversidad funcional específica de la comunidad microbiana se aplicó el índice de Shannon-Weaver (Hill et al., 2003)

$$H' = \sum_{i=1}^N \rho_i (\ln \rho_i)$$

Siendo ρ_i la densidad óptica del pocillo i (equivalente al número de individuos de la especie i en el índice tradicional), N la suma de la densidad óptica total obtenida para todas las fuentes de carbono (equivalente al número total de individuos de cualquier especie en el índice tradicional), y S el número total de fuentes de carbono utilizados.

4.4. Crecimiento y reproducción de las lombrices de tierra de *E. fetida*

Se registraron parámetros biológicos como el crecimiento, la supervivencia y la fecundidad de las lombrices, utilizando mediciones que abarcaron desde la biomasa poblacional inicial y final hasta el recuento de organismos juveniles y ootecas. Este enfoque metodológico también contempló el registro fotográfico de la excavación de las lombrices, como se describe detalladamente en el inciso 2.2 del capítulo 3.

5. Análisis Estadístico

El contenido de materia orgánica (MO), pH, CO₂, amonio y nitrato, se realizó una prueba t de Student comparando los tratamientos con el control con alpeorujó (O) en el inicio y al final del experimento. Para el análisis de fosfatasa alcalina (ALP), se llevó a cabo una prueba t de Student comparando los tratamientos con el control con alpeorujó en los días 0, 45 y 90. En cuanto al contenido de carbono (C%), nitrógeno (N%), relación C/N, y los contenidos de macronutrientes y microelementos, se realizó una comparación entre todos los tratamientos y el control con alpeorujó en todos los momentos de muestreo. La evaluación del aumento de biomasa de las lombrices se realizó mediante una prueba t de Student comparando el mismo tratamiento al inicio y al final del experimento. Todos los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviaciones estándar, para lo cual se utilizó el programa Minitab® (versión 17.1.0).

Resultados y discusión

1. Dinámicas de la temperatura, materia orgánica y pH en las mezclas

Los cambios en la temperatura permiten monitorizar la intensidad y duración de los procesos de biotransformación y, en general, la evolución de los procesos de transformación biológica. A lo largo de todo el experimento la temperatura presentó valores mesófilos, cercanos a la temperatura ambiente, tal como se muestra en la Tabla 16. En todos los tratamientos se observó en todos los tratamientos un aumento de temperatura, de entre 3-4°C con respecto al control con solo alpeorujó,

posiblemente debido a la degradación de compuestos de carbono lábiles proporcionados por el estiércol de vaca y las hojas de olivo.

Tabla 16. Temperatura mensual de cada tratamiento (O, OLB, OLBE, OLH y OLHE). La temperatura ambiente fue $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

Días T ($^\circ\text{C}$)	O	OLB	OLBE	OLH	OLHE
30	$29 \pm 1,5$	$32 \pm 3,8$	$32 \pm 3,8$	$33 \pm 3,4$	$33 \pm 3,4$
60	$29 \pm 0,6$	$30 \pm 4,3$	$29 \pm 4,9$	$29 \pm 1,9$	$28 \pm 2,7$
90	$29 \pm 1,3$	$27 \pm 1,4$	$28 \pm 2,1$	$25 \pm 0,9$	$24 \pm 0,8$

No hubo cambios significativos en la dinámica de la temperatura de las mezclas debido a la presencia de lombrices; los valores de OLBE y OLHE no difirieron de aquellos de OLB y OLH. Durante todo proceso de transformación biológica, el contenido en materia orgánica cambió (Figura 29a). Los niveles de materia orgánica en el control con alpeorujó (O) se mantuvieron más o menos constante alrededor del $66,1 \pm 4,4\%$ a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, en la mezcla con estiércol vacuno (OLB), se observó una tendencia de descenso, especialmente a partir de los 20 días de incubación (Figura 29a). El contenido de materia orgánica inicial promedió $85,7 \pm 8,3\%$ y éste descendió ($p < 0,05$) hasta valores promedios de $51,2 \pm 1,5\%$ en el día 90 (Figura 29a). El tratamiento con *E. fetida* (OLBE) mostró una disminución similar ($p < 0,05$), alcanzando un contenido final de $52,7 \pm 1,1\%$ en el día 90 (Figura 29a). No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en los cambios en el contenido en materia orgánica con estiércol de vacuno debido a la presencia de *E. fetida*. Esta tendencia descrita para OLB y OLBE fue similar para aquellas mezclas con estiércol de equino (OLH). Inicialmente, promedió $74,9 \pm 21,8\%$, y al final del ensayo se redujo en casi un 22 % ($58,5 \pm 10,1\%$) (Figura 29a). En el tratamiento con *E. fetida* (OLHE), se observó una disminución ($p < 0,05$) y el valor final fue de $49,1 \pm 26,4\%$ (Figura 29a), menor al encontrado para este estiércol sin *E. fetida*, sin que las diferencias fueran significativas. Los niveles de materia orgánica final fueron óptimos y se encuentran en línea con los niveles establecidos como guías para enmiendas orgánicas, de acuerdo con la normativa vigente (Real Decreto, 2013; SGAYDS, 2019). Los valores de pH (Figura 29b) se encontraron en el rango óptimo para el desarrollo de bacterias (6,0-7,5) y hongos (5,5-8,0) (Amir et al., 2005). En el grupo de control con alpeorujó (O), el pH se mantuvo constantemente bajo, alrededor de $4,8 \pm 0,2$, a lo largo del ensayo. La adición de estiércol al alpeorujó, con o sin lombrices de tierra, elevó el pH inicial de las mezclas a alrededor de 6. Durante los 90 días, todos los tratamientos mostraron un aumento en el pH, alcanzando valores entre 6,8 y 7,9. La degradación de ácidos en las primeras etapas de descomposición y la mineralización del nitrógeno orgánico, que produce amonio como intermediario, explican este aumento en los valores de pH. Esta neutralización es beneficiosa para el crecimiento de las plantas, ya que facilita la solubilización de los nutrientes

presentes en el sustrato. En este estudio, las transformaciones biológicas estabilizaron el pH y redujeron el contenido en materia orgánica, siendo esta tendencia más pronunciada en los procesos de biotransformación con la asistencia de lombrices de tierra. Varios estudios han documentado que el proceso de biotransformación con la asistencia de lombrices de tierra de diferentes desechos conduce a un aumento del pH (Paul et al., 2020), y la disminución de la materia orgánica y la estabilización neta se atribuye a la mineralización de la materia orgánica y al consumo por parte de las lombrices de tierra, convirtiéndola en biomasa de lombrices de tierra, lo cual se discutirá más adelante (Lin et al., 2019; Mondal et al., 2020; Tripathi & Bhardwaj, 2004).

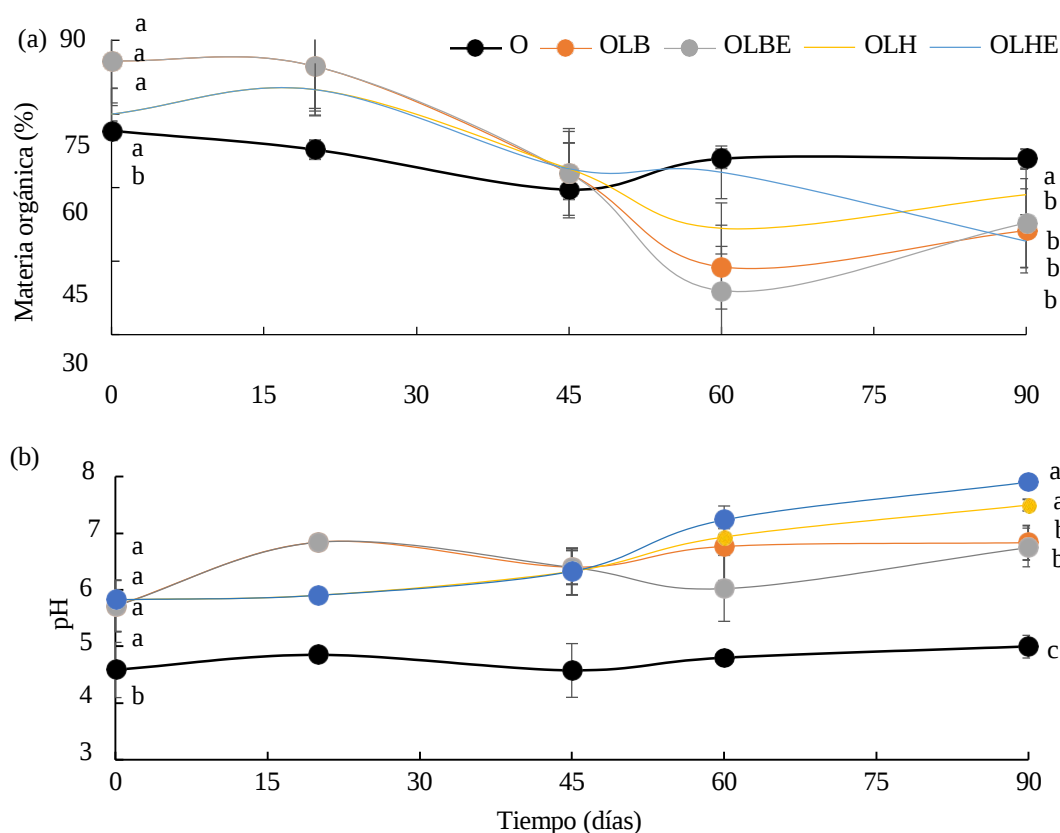


Figura 29. (a) Cambios en el contenido de materia orgánica, y (b) pH a lo largo del período de biotransformación en distintos tratamientos (OLB, OLBE, OLH, OLHE) y el grupo de control con alpeorujó (O) Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

2. Producción de CO₂ de los tratamientos

Durante el proceso de biotransformación se proporcionó suficiente aireación volteando regularmente la mezcla, lo que disminuyó el nivel de CO₂ en las mezclas y evitó las condiciones anaeróbicas (Haug, 1993). Los cambios en la producción de dióxido de carbono por parte de los microorganismos aeróbicos se muestran en la Figura 30. Al inicio del experimento, se observó una alta producción de CO₂ en los tratamientos distintos al control con alpeorujó (O), con valores entre $1503,4 \pm 138 \mu\text{g C-CO}_2/\text{g d}$ y $1563,6 \pm 250,3 \mu\text{g C-CO}_2/\text{g d}$ para aquellos con estiércol

vacuno y estiércol equino, respectivamente. Los valores fueron significativamente superiores a los medidos para el control con alpeorajo (O), entorno a $1240 \mu\text{g C/g d}$. Durante la biorremediación se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la tasa de respiración para todos los tratamientos. Los valores de producción de CO_2 al final del experimento fueron de $650,8 \pm 230 \mu\text{g C-CO}_2/\text{g d}$, $510,6 \pm 121,9 \mu\text{g C-CO}_2/\text{g d}$, $954,7 \pm 220 \mu\text{g C-CO}_2/\text{g d}$ y $620,9 \pm 71 \mu\text{g C-CO}_2/\text{g d}$ para los tratamientos OLB, OLBE, OLH y OLHE, respectivamente. El descenso en la emisión de CO_2 durante la transformación biológica de fuentes de materia orgánica es una dinámica típica que está relacionada con la degradación primero de fuentes lábiles de carbono orgánico y bajos valores de emisión de CO_2 después porque el carbono orgánico que va quedando es de naturaleza más refractaria. No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) debido a la presencia de *E. fetida*, con la excepción del tratamiento con alpeorajo más estiércol de equino y *E. fetida* que mostró valores finales de emisión de CO_2 inferiores al tratamiento comparable pero sin la lombriz. Al final del periodo de 90 días de incubación, la emisión diaria de CO_2 del control con alpeorajo fue superior a las mezclas, a excepción de OLH.

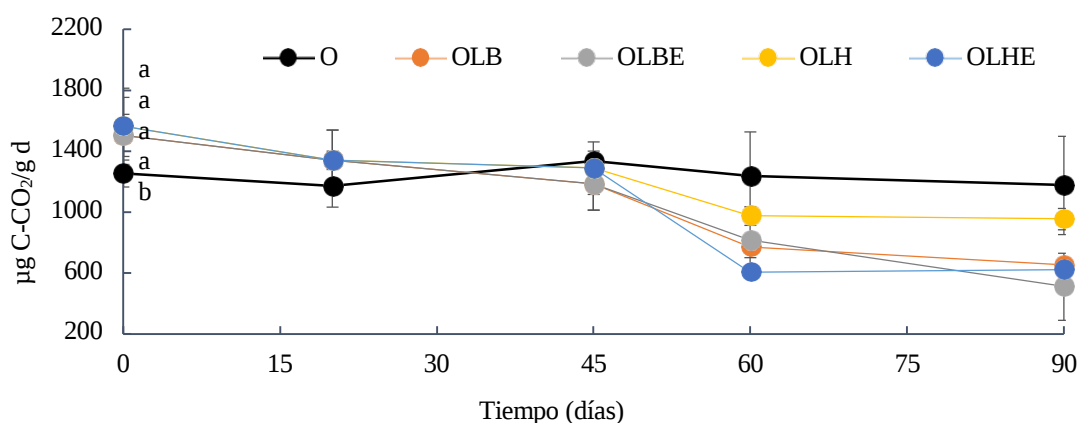


Figura 30. Cambios en la producción de CO_2 para los tratamientos durante el tiempo de biotransformación. Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

3. Variaciones en los contenidos de Carbono y Nitrógeno y la relación C/N

En el estudio se evaluaron los niveles de carbono y nitrógeno en los diferentes tratamientos. En las unidades experimentales control con alpeorajo (O), los niveles de carbono (Figura 31a) se mantuvieron estables alrededor del $53,2\% \pm 3,8\%$, mientras que los niveles de nitrógeno se mantuvieron alrededor del $1,4\% \pm 0,13\%$. En las mezclas con estiércoles, se observó una ligera disminución en el contenido de carbono, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los valores obtenidos fueron $28,2\% \pm 3,2\%$, $27,8\% \pm 2,6\%$, $26,4\% \pm 3,8\%$ y $28,3\% \pm 4,6\%$ para los tratamientos OLB, OLBE, OLH y OLHE, respectivamente. En efecto, al contrastar cada uno de los tratamientos con los valores del control con alpeorajo (O) como referencia, se evidencia de manera consistente una significancia estadística ($p < 0,05$) en todos los intervalos de tiempo

analizados. Además, en el día 90 se destaca que el tratamiento OLHE con *E. fetida* que disminuyó de manera significativa frente a O y OLB.

En cuanto al contenido de nitrógeno (Figura 31b), a los 20 y 45 días, se observó un incremento significativo en OLBE en comparación con O. A los 60 días, todos los tratamientos presentaron un aumento con respecto a O. Sin embargo, al finalizar el experimento de 90 días, solo OLBE exhibió un aumento significativo en comparación con O.. El incremento en el contenido en nitrógeno orgánico total se debió, posiblemente, a la combinación de dos hechos. Por una parte, hubo una concentración de elementos debido a la pérdida de material durante la incubación y la inexistencia de pérdidas significativas de nitrógeno por desnitrificación o por volatilización de amonio. En el caso de los tratamientos con estiércol equino, el aumento no fue significativo y se mantuvo en torno a 1,6% $\pm 0,2\%$.

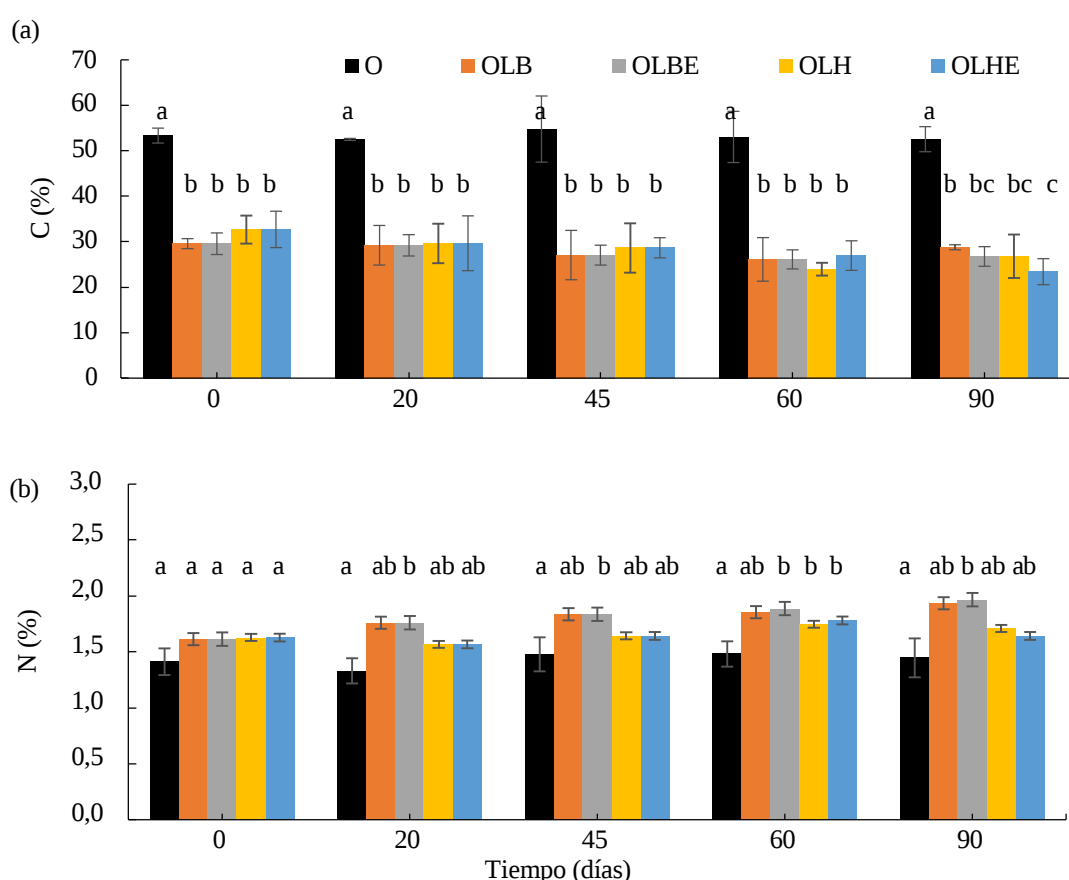


Figura 31. Variaciones en los contenidos de (a) carbono (C %) y (b) nitrógeno (N %). Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

Estas tendencias fueron evidenciadas a través de la observación de relaciones carbono/nitrógeno (C/N) más apropiadas para sustratos destinados a futuros usos en la agricultura. Inicialmente, se observaron relaciones C/N en torno a 19,2 durante los primeros 45 días, consistentes con los valores reportados por Biyada et al., (2021), durante la fase de maduración de un compost con

residuos textiles. Posteriormente, estas relaciones disminuyeron a 14,6, como se ilustra en la Figura 32. Relaciones C/N entre 15 y 20 indican que hubo degradación de la materia orgánica, demostrando así un avanzado grado de maduración en el sustrato.

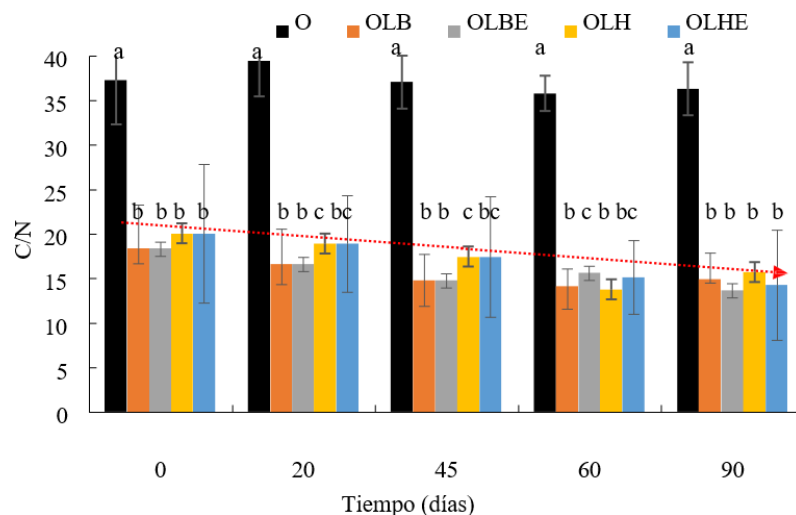
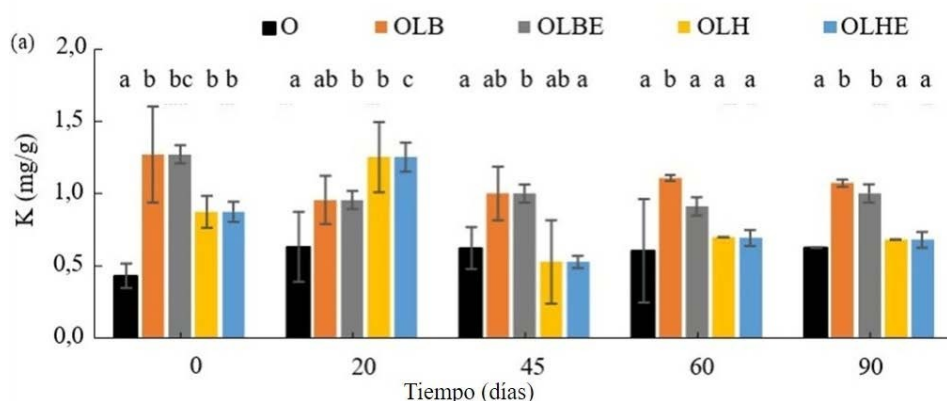


Figura 32. Relaciones C/N a lo largo del proceso de biotransformación en los diferentes tratamientos (OLB, OLBE, OLH, OLHE) y el control con alpeorujó (O). Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

4. Dinámica de los principales macronutrientes

Los macronutrientes, como el potasio, magnesio, sodio, calcio y fósforo, desempeñan roles fundamentales en diversos procesos fisiológicos de las plantas. Estos procesos incluyen la síntesis de proteínas, la fotosíntesis y la regulación del equilibrio hídrico. El contenido de estos macronutrientes tras el proceso de biorremediación es una expresión del valor potencial de éstos como fertilizantes, y la magnitud y la dinámica de los cambios se deben principalmente al tipo de material utilizado en cada tratamiento. Los valores correspondientes a cada nutriente en los distintos tratamientos se muestran en la Figura 33 (a-e).



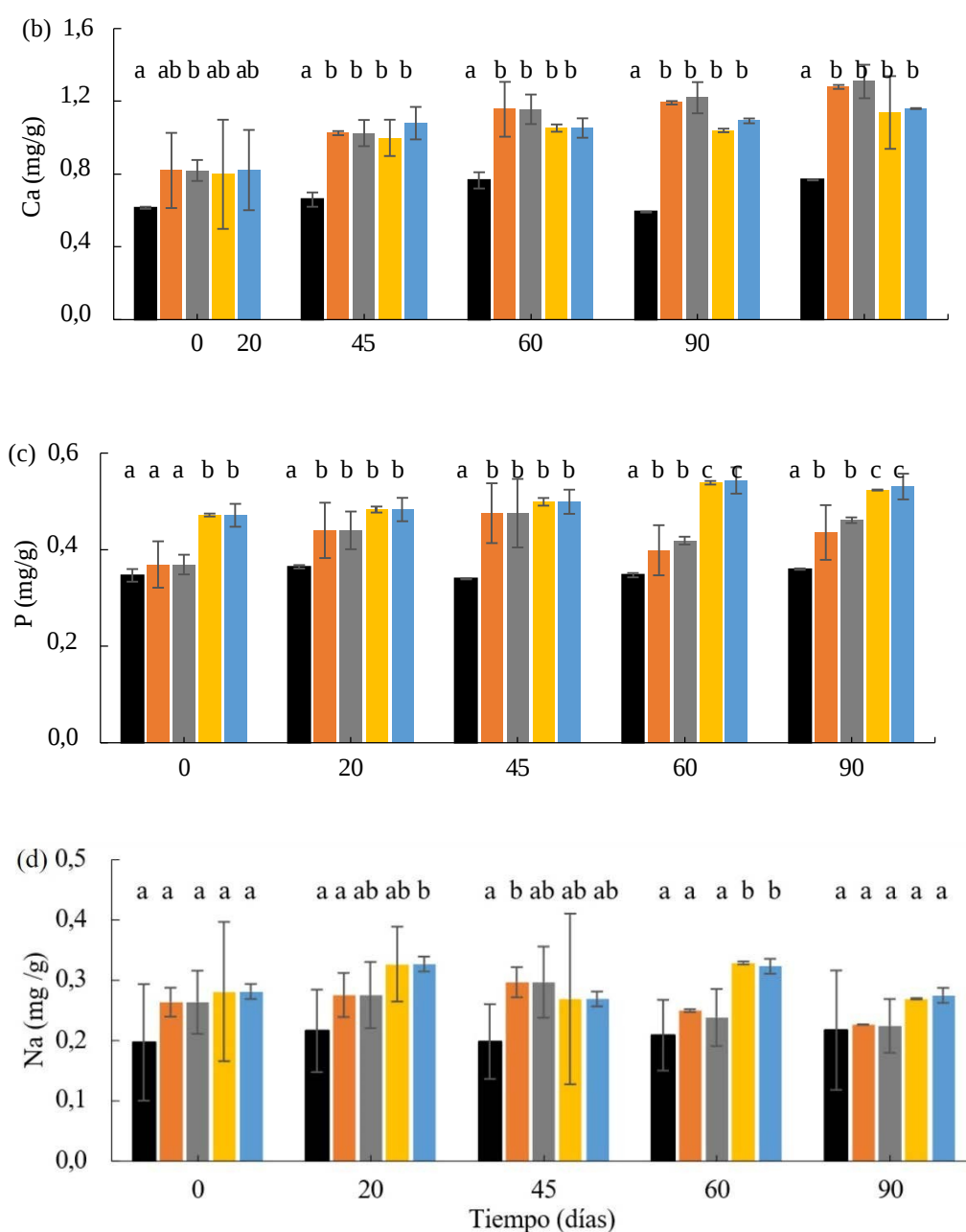


Figura 33. Cambios en los contenidos de (a) K, (b) Mg, (c) Na, (d) Ca y (e) P en los distintos tratamientos (O, OLBE, OLH, OLHE). Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

La composición del alpeorujó puede estar sujeta a diversas influencias, tales como la variabilidad en la cepa de oliva utilizada y los métodos específicos de extracción (Medouni-Haroune et al., 2018). En términos generales, se caracteriza por presentar niveles modestos de nitrógeno orgánico, mientras que exhibe una elevada concentración de potasio. En el transcurso de este estudio, se observaron pequeñas variaciones en el grupo de control con alpeorujó (O), no obstante, los valores promedio para elementos como potasio, magnesio, sodio, calcio y fósforo se mantuvieron en torno a $0,58 \pm 0,19$ mg/g, $0,20 \pm 0,10$ mg/g, $0,21 \pm 0,07$ mg/g, $0,68 \pm 0,08$ mg/g y $0,35 \pm 0,01$ mg/g, respectivamente. La introducción de estiércoles y hojas de olivo al alpeorujó,

ya sea con o sin la presencia de lombrices, generó un aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de potasio en el día 0. Al concluir el experimento, los tratamientos que incorporaron estiércol vacuno exhibieron los resultados más favorables en términos de enriquecimiento nutricional, manifestando incrementos significativos en potasio (Figura 33a), magnesio (Figura 33b), calcio (Figura 33c) y fósforo (Figura 33d), alcanzando valores finales de $0,67 \pm 0,01$ mg/g; $0,27 \pm 0,03$ mg/g; $1,23 \pm 0,03$ mg/g y $0,4 \pm 0,001$ mg/g, respectivamente.

En contraposición, al término del experimento, los tratamientos con estiércol equino, OLB y OLBE no revelaron alteraciones significativas en potasio (aproximadamente $1,04 \pm 0,17$ mg/g) y magnesio (alrededor de $0,35 \pm 0,04$ mg/g) en comparación con el grupo de control con alpeorujo. No obstante, experimentaron un incremento notable ($p < 0,05$) en el contenido de calcio ($1,05 \pm 0,13$ mg/g), siguiendo una pauta similar a la observada por Singh & Kalamdhad (2014). Estos tratamientos también demostraron los valores más elevados de fósforo ($0,47 \pm 0,003$ mg/g). Se postula que el aumento en la concentración de fósforo en los tratamientos con estiércol equino podría vincularse con el contenido inicialmente más alto de fósforo (Tabla 13). Además, se sugiere que la actividad microbiana durante la descomposición del estiércol equino podría haber generado gradualmente formas de fósforo asimilables por las plantas, un fenómeno comúnmente observado en los procesos de descomposición de la materia orgánica. En cuanto al sodio (Figura 33e), se observaron algunas variaciones en todos los tratamientos en los días de muestreo, aunque tanto al inicio como al final, no se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con los niveles del control con alpeorujo (O). Los valores finales obtenidos se alinean con los resultados documentados por Singh & Kalamdhad (2014) durante el compostaje de jacinto de agua con una combinación de estiércol de ganado, aserrín y cal.

5. Cambios en los niveles de amonio y nitratos

Se observó una tendencia general de disminución de los niveles de nitrato (NO_3^-) en todos los tratamientos (Figura 34a). Esta disminución se debió a la tasa de nitrificación del amonio a nitrato y a la mineralización del nitrógeno, detalladas en la Tabla 17. Valores bajos o medios de amonio es beneficioso, ya que altas concentraciones de este nutriente pueden tener efectos fitotóxicos. En cuanto a los niveles de amonio (NH_4^+), se observó una tendencia general de aumento en todos los tratamientos (Figura 34b), probablemente por la transformación de amonio a nitrato durante la nitrificación. Esta tendencia también es positiva, ya que la relación amonio/nitrato se acerca al requisito reglamentario indicado en la normativa para compost (SGAyDS, 2019), que considera una relación amonio/nitrato menor a 0,3 como indicador de la madurez del compost.

En el tratamiento con alpeorujo, estiércol vacuno y hojas de olivo (OLB), se registró un contenido de nitratos iniciales de $172,9 \pm 42,8$ $\mu\text{g N- NO}_3^-/\text{g}$, el cual disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al día 60 ($121,1 \pm 2$ $\mu\text{g N- NO}_3^-/\text{g}$), y al final del experimento aumentó nuevamente a valores similares al inicio del experimento. En el tratamiento con *E. fetida* (OLBE), el contenido de amonio fue menor al finalizar el ensayo ($101,2 \pm 12,6$ $\mu\text{g N- NH}_4^+/\text{g}$). La concentración de amonio

siguió el mismo patrón de disminución significativa ($p < 0,05$) para OLBE a lo largo del tiempo, resultando en una relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ de $0,4 \pm 1$. En los tratamientos OLH y OLHE, el contenido inicial de nitrato fue alrededor de $248,6 \pm 27 \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$, y luego disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al 42% y 49% en los días 60 y 90, respectivamente.

Las concentraciones iniciales de NH_4^+ en OLH y OLHE ($78,4 \pm 65,3 \mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$) aumentaron a lo largo del experimento, alcanzando valores finales de $144,4 \pm 28,4$ y $131,4 \pm 14,8 \mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$, respectivamente, en el día 90. La tendencia encontrada en la dinámica de NH_4^+ fue similar a la encontrada por Chennaou, (2016) al evaluar un sistema de compostaje con residuos sólidos municipales. Esto resultó en relaciones $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ más elevadas, lo que sugiere que los sustratos con estiércol equino podrían requerir más tiempo de biorremediación para alcanzar su madurez. En el grupo de control con alpeorajo (O), los niveles de NH_4^+ y NO_3^- se mantuvieron relativamente estables durante todo el experimento, alrededor de $123,1 \pm 33,6 \mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ y $52,6 \pm 12,6 \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$, respectivamente. Sin embargo, al comparar estos niveles con los de otros tratamientos, se evidencia una diferencia significativa en los niveles de NO_3^- (Figura 34a) al inicio del experimento, pero al final del estudio la diferencia disminuye. En el caso del NH_4^+ (Figura 34b), ocurre lo contrario: la diferencia con respecto a todos los tratamientos es significativamente mayor al final del experimento. Como resultado, se obtuvo una relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ promedio de $2,74 \pm 1,54$.

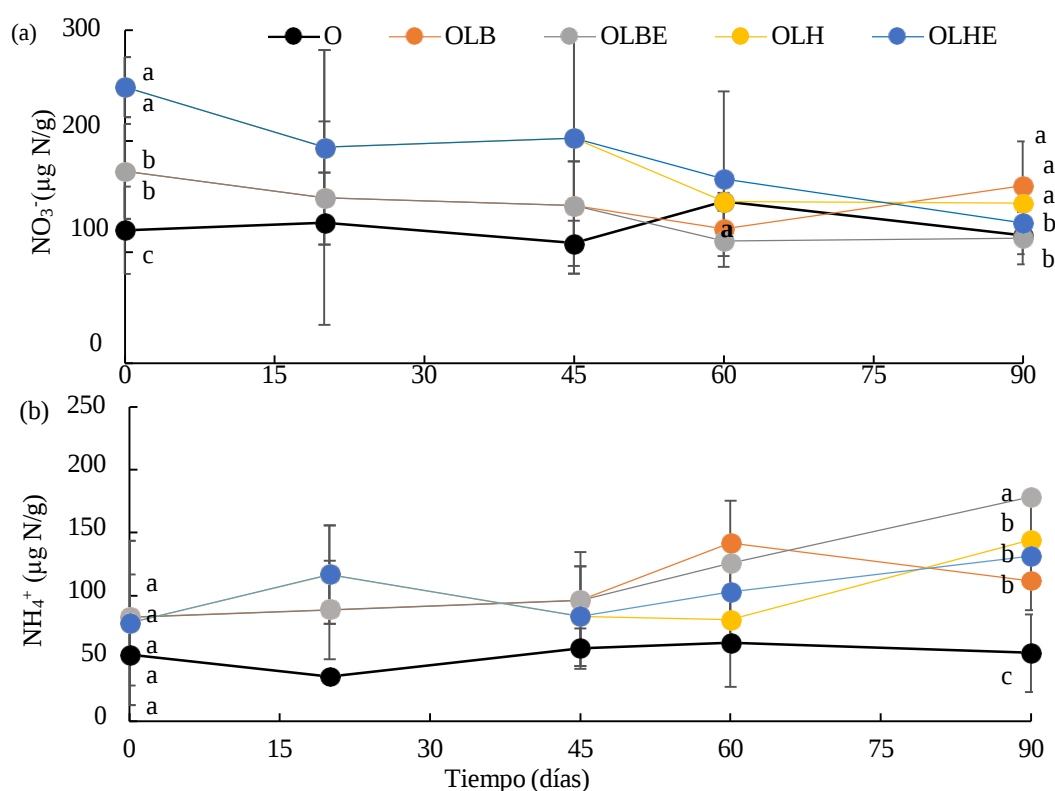


Figura 34. Variación en los contenidos de (a) nitratos (NO_3^-) y (b) amonio (NH_4^+) a lo largo del proceso de biotransformación. Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

5.1. Nitrificación y mineralización del N

La nitrificación es el proceso mediante el cual el amonio se transforma en nitrato. Una tasa de nitrificación elevada podría indicar una mayor disponibilidad de nitratos para las plantas, favoreciendo su crecimiento y desarrollo. En el presente estudio, el tratamiento OLBE exhibió la tasa de nitrificación más elevada ($1.06 \mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ día}^{-1}$), lo que indica que el tratamiento a favorecido la actividad de bacterias nitrificantes. Una tasa de mineralización del N elevada sugiere una liberación de amonio y nitrato a partir del N orgánico y, por lo tanto, mayor disponibilidad para las plantas. No obstante, tasas bajas pueden indicar una disponibilidad limitada de nutrientes, lo que podría requerir la aplicación de fertilizantes. El control con alpeorajo (O) presentó la tasa de mineralización negativa ($-0.04 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y por lo tanto una ligera inmovilización. Es importante mencionar que en los tratamientos OLB y OLBE, conforme a la tasa neta de mineralización, se evidencia que los microorganismos inmovilizaron el nitrógeno, con la eventual posibilidad de su liberación posterior. Sin embargo, hasta ahora, este fenómeno indica que la disponibilidad de nitrógeno para el crecimiento de las plantas podría ser limitada, lo que no es favorable, ya que podría resultar en una disminución en la calidad de las estructuras vegetales.

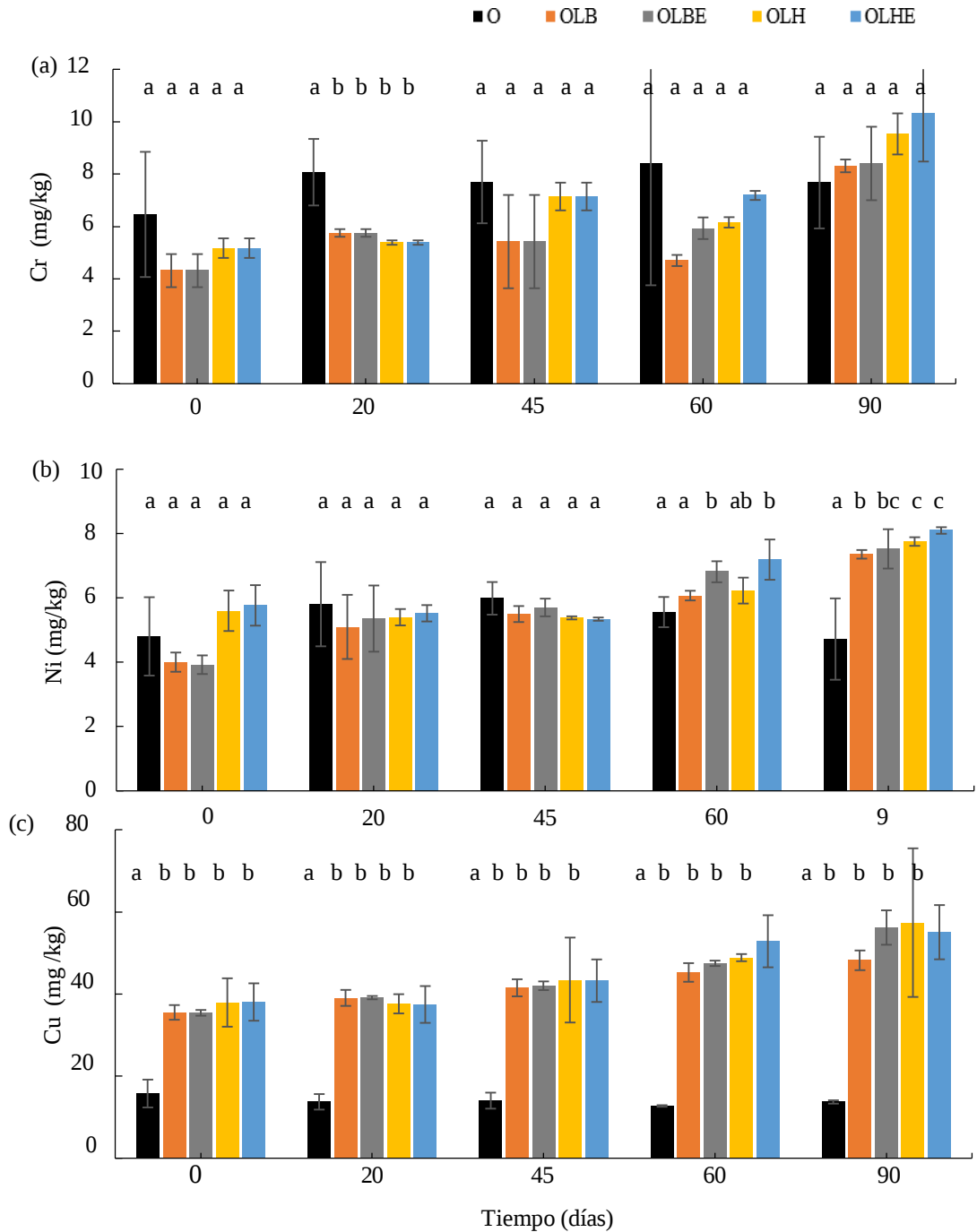
Tabla 17. Promedios de las tasas netas de nitrificación y mineralización para los diferentes tratamientos. Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos.

Tratamientos	Tasas netas de nitrificación ($\mu\text{g N- NO}_3^- \text{ día}^{-1}$)	Tasa netas de mineralización ($\mu\text{g N- NH}_4^+ \text{ día}^{-1}$)
O	$0,02 \pm 0,03^a$	$-0,04 \pm 0,02^b$
OLB	$0,32 \pm 0,02^b$	$0,18 \pm 0,01^a$
OLBE	$1,06 \pm 0,07^c$	$0,40 \pm 0,02^a$
OLH	$0,73 \pm 0,08^d$	$-0,43 \pm 0,04^a$
OLHE	$0,59 \pm 0,30^d$	$-0,77 \pm 0,04^b$

6. Dinámicas de los microelementos

En todos los tratamientos analizados, las concentraciones de zinc, cobre, magnesio, níquel, hierro y cromo se mantuvieron por debajo de los límites máximos permitidos para sustratos de alta calidad destinados a la agricultura, según lo establecido por el SGAyDS en 2019 (Figura 35). A lo largo del experimento, las concentraciones de microelementos en el control con alpeorajo (O) se mantuvieron relativamente estables. Los valores registrados para el grupo de control fueron los siguientes: $24,4 \pm 2,6$ mg de zinc/kg, $14,0 \pm 1,9$ mg de cobre/kg, $15,6 \pm 2,0$ mg de manganeso/kg, $5,4 \pm 1,0$ mg de níquel/kg, $100,5 \pm 15,1$ mg de hierro/kg y $7,7 \pm 2,3$ mg de cromo/kg. No se observaron diferencias sustanciales en los tratamientos en comparación con el control con alpeorajo (O) en lo que respecta a los valores de cromo (Figura 35a). Del mismo modo, durante los primeros 45 días, no se evidenciaron diferencias significativas en las concentraciones de níquel en comparación con el control. No obstante, a los 90 días, los tratamientos exhibieron valores significativamente superiores ($p < 0,05$) de níquel en relación con el control que incorporaba

alpeoruj (Figura 35b). Tanto para los microelementos cobre y manganeso (Figura 35 c y d), se constató un incremento significativo ($p < 0,05$) en los tratamientos en comparación con los controles. La introducción de estiércol generó un aumento conspicuo en los niveles de cobre, manganeso y hierro en contraste con el control con alpeoruj (O). Este fenómeno se atribuye a la presencia de metales pesados en el estiércol, derivados de la alimentación suministrada a los animales en sistemas intensivos, provocando alteraciones en la concentración de los microelementos.



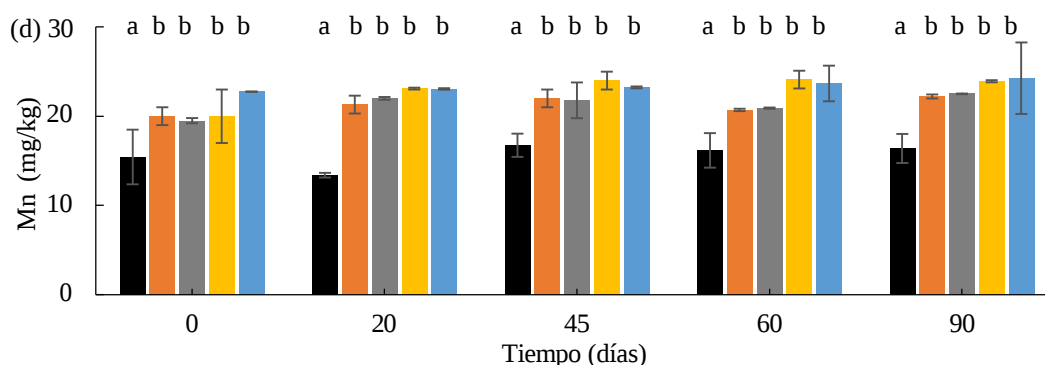


Figura 35. Concentraciones de (a) Cu, (b) Mn, (c) Ni y (d) Cr en los distintos tratamientos (OLB, OLBE, OLH, OLHE) y el control con alpeorajo (O). Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

7. Actividad microbiana: fosfatasa Alcalina (ALP)

En los procesos de biotransformación el estiércol vacuno con la asistencia de lombrices de tierra (OLBE), se destacó un aumento significativo ($p < 0,05$) entre el 24,5 y 40,7% en la actividad de la fosfatasa alcalina al concluir el experimento (Figura 36), comparado con los valores iniciales (entre 122,9 y 136,8 $\mu\text{g p-NP/ g h}$). Este incremento se vinculó estrechamente al proceso de descomposición de la materia orgánica, donde los microorganismos descomponen las capas internas de las partículas del suelo y/o del sustrato ingerido, generando un aumento en la superficie expuesta. Como consecuencia, estas áreas expuestas se vuelven susceptibles al ataque de otras comunidades microbianas presentes en el entorno circundante. Es importante mencionar que cuando se observa un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina, sugiere que el proceso de descomposición biológica de materiales orgánicos está mejorando la disponibilidad de fósforo para las plantas, por lo que es un indicador de un sustrato propicio para el crecimiento de las plantas. (Delgado-Moreno & Peña, 2009)

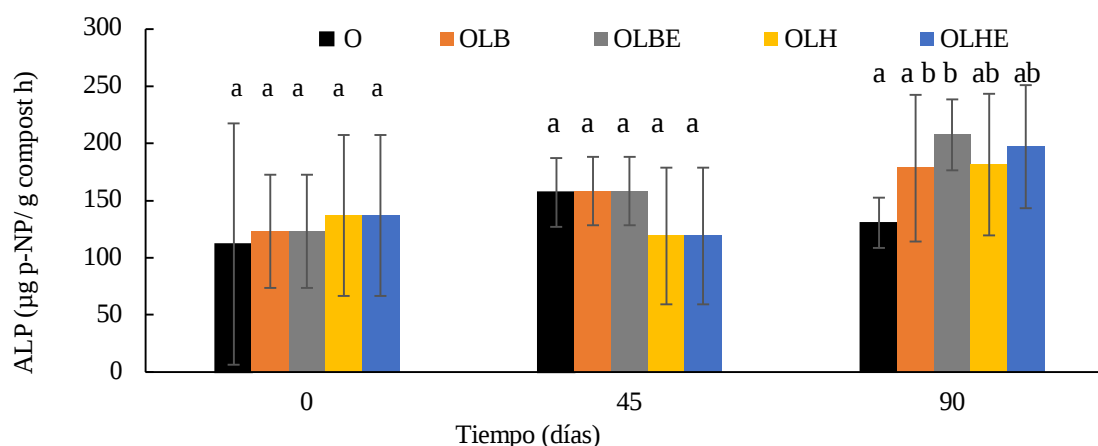


Figura 36. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP) en los tratamientos (OLB, OLBE, OLH, OLHE) y el control con alpeorajo (O). Letras distintas señalan diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) debida a los tratamientos a lo largo del proceso de biotransformación.

8. Perfil de consumo de las fuentes de carbono utilizadas por la comunidad microbiana (Ecoplacas)

Se empleó el índice de Shannon-Weaver (H') para evaluar la diversidad funcional específica de la comunidad microbiana, una herramienta ampliamente utilizada en ecología. Este índice proporcionó una medida cuantitativa de la diversidad. Es relevante señalar que valores por debajo de 2 indican baja diversidad, mientras que valores superiores a 3 indican alta diversidad. En nuestro estudio, todos los valores fueron superiores a 3 (Tabla 18). En líneas generales, los resultados indicaron que, al inicio, OLB y OLH mantuvieron valores similares tanto en H' como en la respuesta metabólica promedio (AMR), así como en la diversidad S (sustratos distintos en los cuales se confirma de manera positiva la presencia de actividad metabólica). Sin embargo, a los 90 días, OLB experimentó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la AMR. En contraste, los demás tratamientos mostraron un buen desempeño con aumentos significativos en los tres índices (H , AMR y S) al finalizar el experimento. Estos resultados sugieren que la promoción de comunidades microbianas diversas y saludables, las cuales pueden contribuir a la mejora de la fertilidad en un sustrato.

Tabla 18. Índices de diversidad catabólica microbiana calculados para los datos obtenidos del EcoPlate™. Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'), índice de riqueza metabólica del sustrato (S); y respuesta metabólica promedio (AMR). Las diferentes letras indican una diferencia significativa ($p < 0,05$; ANOVA de una vía) entre los tiempos de exposición.

	H'	S	AMR
OLB (día 0)	$4,52 \pm 0,02^a$	28 ± 1^a	$2,30 \pm 0,10^a$
OLH (día 0)	$4,67 \pm 0,08^a$	29 ± 1^a	$2,37 \pm 0,09^a$
OLB (día 90)	$4,65 \pm 0,14^a$	26 ± 2^a	$2,68 \pm 0,16^b$
OLBE (día 90)	$4,87 \pm 0,02^c$	31 ± 1^b	$2,06 \pm 0,07^c$
OLH (día 90)	$4,79 \pm 0,04^c$	31 ± 1^b	$2,81 \pm 0,05^b$
OLHE (día 90)	$4,88 \pm 0,11^c$	30 ± 1^b	$2,67 \pm 0,15^b$

9. Estudio del crecimiento y reproducción de las lombrices de tierra de *E. fetida*

En el día 45, se incorporaron lombrices de tierra a los tratamientos biológicos OLBE y OLHE. En el tratamiento OLBE, se observó una biomasa total en las poblaciones de $8,1 \pm 1,5$ g. Esta biomasa aumentó significativamente ($p < 0,05$) al final del ensayo alcanzando los $12,6 \pm 0,5$ g (Figura 37). Durante este período, se registraron 31 ootecas y 34 organismos juveniles. En cambio, el tratamiento OLHE mostró una estabilidad general en la biomasa, con un ligero aumento de 0,7 g, el cual no fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Figura 37). Inicialmente, la biomasa fue de $10,5 \pm 2,4$ g en el día 45, y al final del proceso de biotransformación, se registró un peso de $11,2 \pm 2,2$ g. En este tratamiento se identificaron 40 ootecas y 51 organismos juveniles (Figura 37). Es relevante destacar que las lombrices de tierra no presentaron signos de lesiones aparentes y no se registró mortalidad durante el proceso de biotransformación.

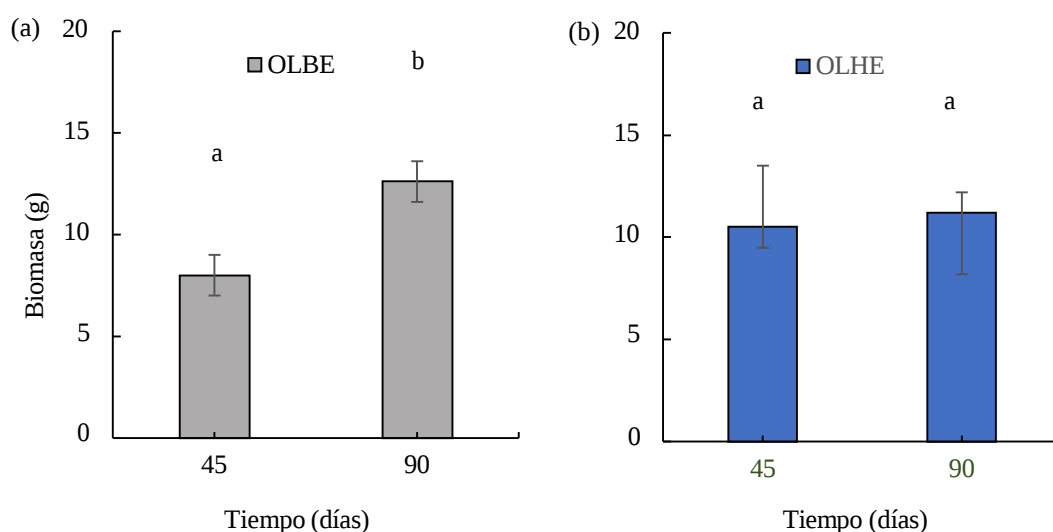


Figura 37. (a) Cambios en la biomasa (peso fresco) de las lombrices de tierra *E. fetida* en los tratamientos OLBE y (b) OLHE, durante 45 días. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tiempos de exposición.

Al concluir las biotransformaciones, se evidencia de manera clara la notable contribución de las lombrices de tierra a la textura final de los sustratos OLHE y OLBE, como se ilustra en la Figura 38. Se destaca especialmente la formación de túneles y la generación simultánea de bioagregados. Es crucial señalar que, en comparación con los tratamientos no afectados por la actividad de las lombrices de tierra (OLH y OLB), se observó una marcada disminución en la presencia de hojas, las cuales experimentaron un proceso de fragmentación. Esta transformación modifica significativamente el sustrato, preparándolo para la influencia subsiguiente de los microorganismos. En el caso de OLH y OLB, queda evidente la necesidad de un tiempo de biotransformación más prolongado para experimentar cambios significativos en el proceso de mejora de los sustratos sin la intervención directa de las lombrices de tierra. A pesar de sus rendimientos, la salud aparente de las lombrices se mantuvo inalterada a lo largo del estudio. Este hallazgo sugiere una notable capacidad de adaptación de las lombrices de tierra a las condiciones del entorno, resaltando su robustez y resistencia ante posibles alteraciones ambientales.

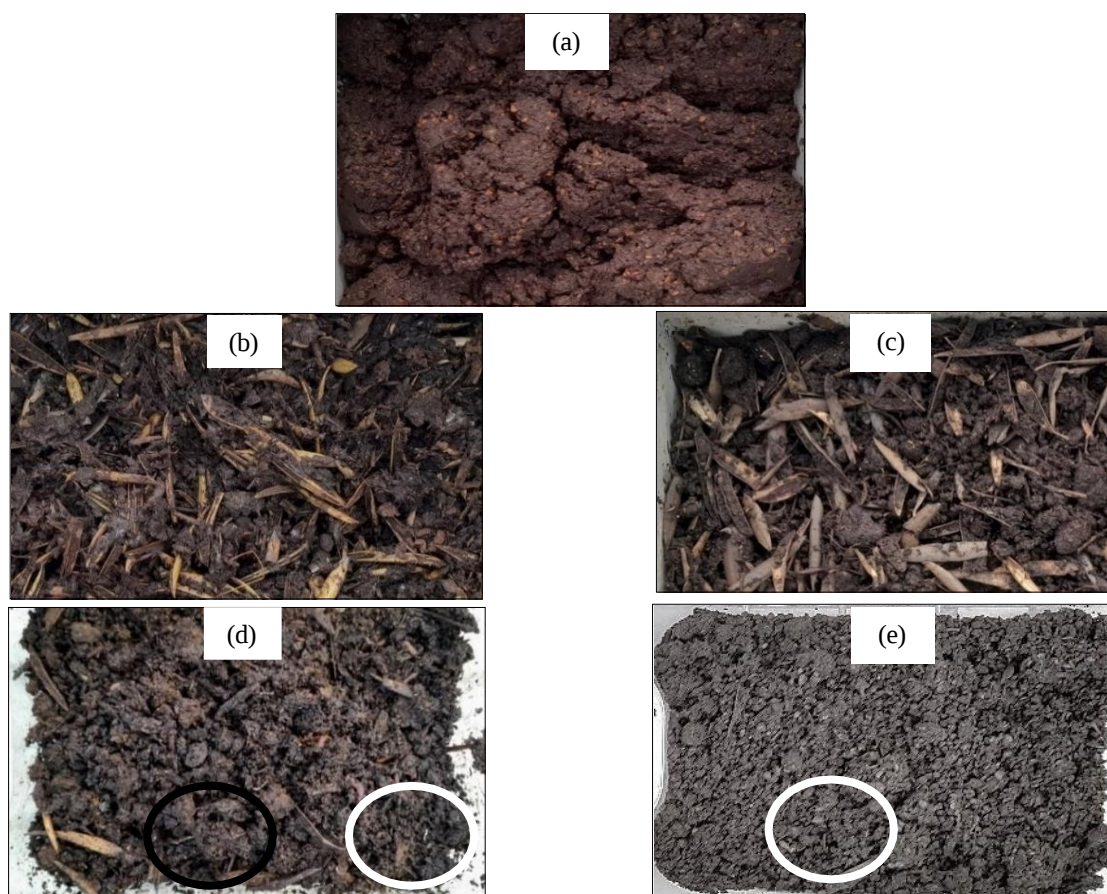


Figura 48. Visual del aspecto de los sustratos finales y del efecto el de las lombrices de tierra en el número de oquedades excavadas (líneas negras) y en actividades de lanzamiento (marcadas con líneas blancas) (a) O; (b) OLB; (c) OLH; (d) OLBE; (e) OLHE.

Conclusión

La descomposición biológica de materiales como las hojas de olivo y los estiércoles, cuando se combinan con el alpeorajo, ha demostrado generar sustratos finales con propiedades excepcionalmente beneficiosas para el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Estas mejoras se evidencian en la modificación de la relación C/N, que disminuye, y en el aumento de los niveles de K, P y N en los sustratos finales. Además de estos beneficios nutricionales, se observan mejoras significativas en la diversidad de comunidades biológicas presentes en los sustratos resultantes. En contraste, la presencia de lombrices de tierra en las condiciones de ensayo no ha tenido un impacto sustancial en la mayoría de las propiedades evaluadas. Los resultados obtenidos no solo consolidan la eficacia de la combinación de hojas de olivo, estiércoles y alpeorajo, sino que también sugieren que la introducción de lombrices de tierra puede no ser determinante en este contexto específico. Estos hallazgos establecen una base sólida para continuar explorando soluciones ecológicas en la gestión de residuos agrícolas. Investigaciones futuras podrían ampliar nuestro entendimiento de las complejas interacciones entre los diversos elementos biológicos involucrados, incluso mediante la exploración de otros tipos de residuos agrícolas. Este enfoque contribuiría de manera significativa al desarrollo de prácticas agrícolas más sostenibles, promoviendo así una gestión más eficiente y respetuosa con el medio ambiente.

Conclusiones generales



El monitoreo integrado de los sistemas de biorremediación con énfasis en una evaluación a través de pruebas biológicas, especialmente con la propuesta del Índice de lesión, basado en el daño visual a *E. fetida*, ofrece una herramienta práctica para facilitar la implementación y control de estos sistemas. El índice propuesto es una prueba sencilla y de bajo costo, con un amplio rango de sensibilidad, que podría ser utilizada por agricultores o usuarios de biolechos para controlar el proceso de desintoxicación *in situ*, sin necesidad de recurrir a laboratorios especializados y/o utilizar instrumental complejo.

Para facilitar la implementación de esta prueba, la clasificación de las lesiones y el cálculo del índice podrían automatizarse mediante el reconocimiento de patrones en una aplicación de telefonía celular.

Otro aspecto esencial para implementar estos sistemas de biorremediación es el reciclado de la biomezcla desgastada o residual, es decir, la biomezcla que debe descartarse porque ha perdido su actividad biológica. En este estudio se logró transformar, bajo la acción de las lombrices de tierra, a un residuo clasificado como peligroso en un sustrato estable y maduro, que reúne las condiciones para ser utilizados como biofertilizante. La especie *E. fetida* mostró un mejor desempeño frente a *A. trapezoides*, lo que la posiciona como la especie ideal para biorremediar y reciclar estos sustratos contaminados. Si bien no es una especie que se encuentre habitualmente en campos agrícolas, al ser de fácil adaptación y rápida reproducción puede garantizarse la población necesaria para su empleo en la vermirremediación de estas biomezclas.

Finalmente, la capacidad biotransformadora de la especie *E. fetida* fue aplicada para reciclar residuos generados durante el proceso de extracción de aceite de oliva. Los sustratos finales obtenidos han presentado mejoras significativas en diversos parámetros como la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y un incremento en la diversidad de diferentes grupos de comunidades biológicas.

Esta investigación ha realizado aportes en la comprensión y aplicación de biolechos para la gestión efectiva de agroquímicos en la agricultura. Los hallazgos presentados destacan la eficacia de la biomezcla, la utilidad de pruebas biológicas para el monitoreo directo y la viabilidad de tratamientos para la reciclabilidad y biorremediación de residuos agrícolas. Este trabajo contribuye significativamente al campo de la agricultura sostenible y abre nuevas perspectivas para investigaciones futuras en el ámbito de la descontaminación y gestión responsable de agroquímicos.

Bibliografía

- Acosta-Sánchez, A., Soto-Garita, C., Masís-Mora, M., Cambronero-Heinrichs, J. C., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2020). Impaired pesticide removal and detoxification by biomixtures during the simulated pesticide application cycle of a tropical agricultural system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195, 110460. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110460>
- Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 943-951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., & Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on Environmental Health*, 18(1), 65–73. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.1.65>
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Agustina Etchegoyen, M., & Marino, D. J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment*, 645, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., & Revel, J. C. (2005). Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. *Chemosphere*, 59(6), 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.016>
- Amorim, M. J. B., Novais, S., Römbke, J., & Soares, A. M. V. M. (2008). *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in a standardized avoidance test? Effects of different chemical substances. *Environment International*, 34(3), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.08.010>
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. In *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123(4), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011>
- Bello-Ramírez, A. M., Carreón-Garabito, B. Y., & Nava-Ocampo, A. A. (2000). A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides. *Toxicology*, 149(2–3), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00222-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00222-5)
- Bermúdez-Couso, A., Arias-Estévez, M., Nóvoa-Muñoz, J. C., López-Periago, E., Soto-González, B., & Simal-Gándara, J. (2007). Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. *Water Research*, 41(19), 4515–4525. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.029>
- Bhadauria, T., & Saxena, K. (2010). Role of earthworms in soil fertility maintenance through the production of biogenic structures. *Appl Environ Soil*. <https://doi.org/10.1155/2010/816073>
- Biyada, S., Merzouki, M., Dëmčenko, T., Vasiliauskiene, D., Ivanec-Goranina, R., Urbonavičius, J., Marčiulaitienė, E., Vasarevičius, S., & Benlemlih, M. (2021). Microbial community dynamics in the mesophilic and thermophilic phases of textile waste composting identified through next-generation sequencing. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03191-1>
- Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J. E., Cluzeau, D., & Brun, J. J. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64(2), 161–182. <https://doi.org/10.1111/ejss.12025>
- Bonanno, A. (1994). *From Columbus to ConAgra: The globalization of agriculture and food*. University Press of Kansas.
- Bowles, T. M., Acosta-Martínez, V., Calderón, F., & Jackson, L. E. (2014). Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.004>
- Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475. <https://doi.org/10.2307/1266454>
- Briceño, G., Tortella, G., Rubilar, O., Palma, G., & Diez, M. C. (2014). Advances in Chile for the treatment of pesticide residues: Biobeds technology. *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*, 53–68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5_4
- Buerge, I. J., Bächli, A., Heller, W. E., Keller, M., & Poiger, T. (2015). Environmental behavior of the chiral herbicide haloxyfop. 2. Unchanged enantiomer composition in blackgrass (*Alopecurus*

- myosuroides) and garden cress (*Lepidium sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2591–2596. <https://doi.org/10.1021/jf505242f>
- Cai, Q. Y., Mo, C. H., Wu, Q. T., Zeng, Q. Y., & Katsoyiannis, A. (2007). Concentration and speciation of heavy metals in six different sewage sludge-composts. *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1063–1072. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.142>
- Campos-Pereira, F. D., Oliveira, C. A., Pigoso, A. A., Silva-Zacarin, E. C. M., Barbieri, R., Spatti, E. F., Marin-Morales, M. A., & Severi-Aguiar, G. D. C. (2012). Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.020>
- Carniel, L. S. C., Niemeyer, J. C., de Oliveira Filho, L. C. I., Alexandre, D., Gebler, L., & Klauberg-Filho, O. (2020). Are there any risks of the disposal of pesticide effluents in soils? Biobed system meets ecotoxicology ensuring safety to soil fauna. *Ecotoxicology*, 29(9), 1409–1421. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02260-x>
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological applications*, 8(3), 559–568. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0559:NPOSWW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2)
- Carter, A. (2000). How pesticides get into water-and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook*, 11(4), 149–156. <https://doi.org/10.1039/B006243J>
- CASAFE (2020). Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. 19° edición, CASAFE (www.casafe.org/publicaciones/guia-de-productos-fitosanitarios).
- CASAFE. (2012). Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios. Recuperado de <https://www.casafe.org/pdf/2015/ESTADISTICAS/Informe-MercadoFitosanitario-2012.pdf> (29/07/23)
- Castillo, M. D. P., Ander, P., Stenström, J., & Torstensson, L. (2000). Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in two solid substrate fermentation systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 289–295. <https://doi.org/10.1023/A:1008936617596>
- Castillo, M. D. P., Torstensson, L., & Stenström, J. (2008). Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6206–6219. <https://doi.org/10.1021/jf800844x>
- Castillo, M. D. P., Von Wirén-Lehr, S., Scheunert, I., & Torstensson, L. (2001). Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biology and Fertility of Soils*, 33(6), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s003740100372>
- Castillo, M. P., Stenström, J., & Andert, P. (1994). Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. *Analytical Biochemistry*, 218, 399–404. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1198>
- Chakra Reddy, N., & Venkateswara Rao, J. (2008). Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 574–582. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.01.003>
- Chang, J., Fang, W., Chen, L., Zhang, P., Zhang, G., Zhang, H., Liang, J., Wang, Q., & Ma, W. (2022). Toxicological effects, environmental behaviors and remediation technologies of herbicide atrazine in soil and sediment: A comprehensive review. *Chemosphere*, 136006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136006>
- Chen, C., Liu, F., Fan, T., Zhou, Q., & Peng, Q. (2017). Solubilization of seven hydrophobic pesticides in quaternary ammonium based eco-friendly ionic liquid aqueous systems. *New Journal of Chemistry*, 41(19), 10598–10606. <https://doi.org/10.1039/C7NJ01445G>
- Chin-Pampillo, J. S., Masís-Mora, M., Ruiz-Hidalgo, K., Carazo-Rojas, E. & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2016). Removal of carbofuran is not affected by co-application of chlorpyrifos in a coconut fiber/compost based biomixture after aging or pre-exposure. *Journal of Environmental Sciences*, 46, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.12.026>
- Cooperband, L. R., & Middleton, J. H. (1996). Changes in chemical, physical and biological properties of passively-aerated cocomposted poultry litter and municipal solid waste compost. *Compost science & utilization*, 4(4), 24–34. <https://doi.org/10.1080/1065657X.1996.10701849>

- Coppola, L., Castillo, M. D. P., Monaci, E. & Vischetti, C. (2007). Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to Southern Europe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 396–401. <https://doi.org/10.1021/jf062744n>
- De Wilde, T., Spanoghe, P., Debaer, C., Ryckeboer, J., Springael, D. & Jaeken, P. (2007). Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the occurrence of point source contamination. *Pest Management Science*, 63(2), 111–128. <https://doi.org/10.1002/ps.1323>
- Delgado-Moreno, L. & Peña, A. (2009). Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 407(5), 1489–1495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.047>
- Delgado-Moreno, L., Nogales, R. & Romero, E. (2020). Vermiremediation of biomixtures from biobed systems contaminated with pesticides. *Applied Sciences*, 10(9), 3173. <https://doi.org/10.3390/app10093173>
- Delgado-Moreno, L., van Dillewijn, P., Nogales, R. & Romero, E. (2021). Straw-based biopurification systems to remove ibuprofen, diclofenac and triclosan from wastewaters: Dominant microbial communities. *Agronomy*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy11081507>
- Demetrio, P. M., Rimoldi, F. & Peluso, M. L. (2022). Impact of Intensive Agricultural Production on the Ecotoxicologic Quality of Associated Medium-Order Streams: Cereal and Oilseed versus Horticultural Production. *Environmental Management*, 69(3), 600–611. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01579-3>
- Dias, L. de A., Gebler, L., Niemeyer, J. C. & Itako, A. T. (2020). Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in Latin America. *Chemosphere*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126038>
- Dias, L. de A., Itako, A. T., Gebler, L., Tolentino Júnior, J. B., Pizzutti, I. R., Fontana, M. E., Janisch, B. D. & Niemeyer, J. C. (2021). Pine Litter and Vermicompost as Alternative Substrates for Biobeds: Efficiency in Pesticide Degradation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 232(7). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05231-y>
- Diaz-Ravina, M., Acea, M. J. & Carballas, T. (1993). Microbial biomass and its contribution to nutrient concentrations in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 25–311. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90237-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90237-6)
- Diez Jerez, M., Palma Cifuentes, G., Altamirano Quijada, C., Briceño Muñoz, G., Calderón Ramírez, C., Díaz Sánchez, J. & Tortella Fuentes, G. (2013). Manual de construcción y operación de lechos biológicos. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.
- Domínguez, J. & Gómez-Brandón, M. (2012). Vermicomposting: composting with earthworms to recycle organic wastes. *Management of Organic Waste*, 29–48. <https://doi.org/10.5772/33874>
- Ecology, 79, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.010>
- Edwards, A. C. & Withers, P. J. A. (2008). Transport and delivery of suspended solids, nitrogen and phosphorus from various sources to freshwaters in the UK. *Journal of Hydrology*, 350(3–4), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.10.053>
- Edwards, C. A. & Bohlen, P. J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Springer Science & Business Media, 3. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3382-1>
- Edwards, C. A., & Neuhauser, E. F. (1988). Earthworms in waste and environmental management. Balogh Scientific Books.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Espigares, M., Coca, C., Fernández-Crehuet, M., Moreno, O., Bueno, A. & Galvez, R. (1997). Pesticide concentrations in the waters from a section of the Guadalquivir River Basin, Spain. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 12(3), 249–256. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:3<249::AID-TOX8>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:3<249::AID-TOX8>3.0.CO;2-8)
- European Union. (2004). Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council on Persistent Organic Pollutants and Amending Directive 79/117.
- Fait, G., Nicelli, M., Fragoulis, G., Trevisan, M. & Capri, E. (2007). Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm. *Environmental Science and Technology*, 41(9), 3302–3308. <https://doi.org/10.1021/es062706k>
- Fernandez, M. E., Morel, M. del R., Clebot, A. C., Zalazar, C. S. & Ballari, M. de los M. (2022).

- Effectiveness of a simple biomixture for the adsorption and elimination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide and its metabolite, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), for a biobed system. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106877>
- Fernandez-Bayo, J. D., Nogales, R. & Romero, E. (2015). Winery vermicomposts to control the leaching of diuron, imidacloprid and their metabolites: Role of dissolved organic carbon content. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(3), 190–200. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.982423>
- Fogg, P., Boxall, A. B. A. & Walker, A. (2003). Degradation of pesticides in biobeds: The effect of concentration and pesticide mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5344–5349. <https://doi.org/10.1021/jf030060z>
- Fogg, P., Boxall, A. B. A., Walker, A. & Jukes, A. (2004). Effect of different soil textures on leaching potential and degradation of pesticides in biobeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5643–5652. <https://doi.org/10.1021/jf040023n>
- Gałązka, A., Gawryjolek, K., Grządziel, J., Frąc, M. & Księżak, J. (2017). Microbial community diversity and the interaction of soil under maize growth in different cultivation techniques. *Plant, Soil and Environment*, 63(6), 264–270. <https://doi.org/10.17221/171/2017-PSE>
- Gao, W., Liang, J., Pizzul, L., Feng, X. M., Zhang, K. & Castillo, M. del P. (2015). Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.008>
- Gao, Y., Fang, J., Li, W., Wang, X., Li, F., Du, M., Fang, J., Lin, F., Jiang, W. & Jiang, Z. (2019). Effects of atrazine on the physiology, sexual reproduction, and metabolism of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Aquatic Botany*, 153, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.10.002>
- García, M. C., Lutri, V. F., Blarasin, M. T., Matteoda, E. M. & Bettera, S. G. (2019). Monitoring of atrazine in surface waters of an agroecosystem in the province of Córdoba (Argentina) using an immunoassay technique. *International Journal for Research in Agricultural and Food Science*, 5(4), 45–58. <http://hdl.handle.net/11336/131851>
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Viñegla, B., Hinojosa, M. B., Peña-Santiago, R., Liébanas, G., Linares, J. C. & Carreira, J. A. (2009). Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive oil farming: Influence of seasonality and site features. *Applied Soil Ecology*, 41(3), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.12.004>
- Garland, J. L. & Mills, A. (1991). Classification and characterization of heterotrophic Microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2351–2359. <https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2351-2359.1991>
- Góngora-Echeverría, V. R., Quintal-Franco, C., Arena-Ortiz, M. L., Giacomán-Vallejos, G. & Ponce-Caballero, C. (2018). Identification of microbial species present in a pesticide dissipation process in biobed systems using typical substrates from southeastern Mexico as a biomixture at a laboratory scale. *Science of the Total Environment*, 628–629, 528–538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.082>
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T. & Wu, L. (2011). Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency, 1–41.
- Grządziel, J., Furtak, K. & Gałązka, A. (2019). Community-level physiological profiles of microorganisms from different types of soil that are characteristic to Poland—a long-term microplot experiment. *Sustainability*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/su11010056>
- Gupte, S., Keharia, H. & Gupte, A. (2013). Toxicity analysis of azo Red BS and Methyl Red dye solutions on earthworm (*Pheretima phosthuma*), micro-organisms, and plants. *Desalination and Water Treatment*, 51, 22–24. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.748637>
- Hansen, S. P., Messer, T. L. & Mittelstet, A. R. (2019). Mitigating the risk of atrazine exposure: Identifying hot spots and hot times in surface waters across Nebraska, USA. *Journal of Environmental Management*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109424>
- Harrison, P. (2002). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. FAO.
- Haug, R. T. (1993). The practical handbook of composting engineering. Lewis Publishers, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780203736234>
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Parka, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E.,

- Buchholz, D., Stueve, T. & Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4612–4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>
- Hedo, E. B. (2013). Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes (BOE núm. 164, de 10 de julio de 2013. *Actualidad Jurídica Ambiental*, 27, 55–56.
- Henriksen, V. V., Helweg, A., Spliid, N. H., Felding, G. & Stenvang, L. (2003). Capacity of model biobeds to retain and degrade mecoprop and isoproturon. *Pest Management Science*, 59(10), 1076–1082. <https://doi.org/10.1002/ps.731>
- Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R. & Barceló, D. (2008). Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research*, 42(13), 3315–3326. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.009>
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A. & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00449-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00449-X)
- Hirai, H., Nakanishi, S. & Nishida, T. (2004). Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, 55(4), 641–645. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.035>
- Homa, J., Stürzenbaum, S. R. & Kolaczowska, E. (2016). Metallothionein 2 and heat shock protein 72 protect *Allolobophora chlorotica* from cadmium but not nickel or copper exposure: body malformation and coelomocyte functioning. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 267–277. <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0276-6>
- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123753>
- Hu, C. Y., Zhang, J. C., Lin, Y. L., Ren, S. C., Zhu, Y. Y., Xiong, C. & Wang, Q. B. (2021). Degradation kinetics of prometryn and formation of disinfection by-products during chlorination. *Chemosphere*, 276. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130089>
- Hund-Rinke, K. & Wiechering, H. (2001). Earthworm Avoidance Test for Soil Assessments An Alternative for Acute and Reproduction Tests. <https://doi.org/10.1007/BF02986464>
- Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM). 2020. Esquema A. Norma 29.561/2020 - Calidad ambiental. Guía para la construcción y el manejo de Camas Biológicas. Buenos Aires, Argentina.
- Isermeyer, H. (1952). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 56(1-3), 26-38. <https://doi.org/10.1002/jpln.19520560107>
- Ismail, S. M. M., Ahmed, Y. M., Mosleh, Y. Y. I. & Ahmed, M. T. (1997). The activities of some proteins and protein related enzymes of earthworms as biomarkers for atrazine exposure. *Toxicol. Environ. Chem*, 63(1–4), 141–148. <https://doi.org/10.1080/02772249709358524>
- ISO 17512-1. (2008). Soil quality-Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour-Part 1: Test with earthworms (*E. fetida* and *Eisenia andrei*).
- Jałowiecki, Ł., Chojniak, J. M., Dorgeloh, E., Hegedusova, B., Ejhed, H., Magnér, J. & Plaza, G. A. (2016). Microbial community profiles in wastewaters from onsite wastewater treatment systems technology. *PloS One*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147725>
- Jiang, T., Schuchardt, F., Li, G., Guo, R. & Zhao, Y. (2011). Effect of C/N ratio, aeration rate and moisture content on ammonia and greenhouse gas emission during the composting. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1754–1760. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60591-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60591-8)
- Jordão, C. P., Pereira, W. L., Carari, D. M., Fernandes, R. B. A., De Almeida, R. M. & Fontes, M. P. F. (2011). Adsorption from Brazilian soils of Cu (II) and Cd (II) using cattle manure vermicompost. *International Journal of Environmental Studies*, 68(5), 719–736. <https://doi.org/10.1080/00207233.2011.587953>
- Joshi, S. C. & Sharma, P. (2011). Male reproductive toxicity of organophosphorous compounds: a review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(7), 1486–1507. <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.581874>
- Julka, J. M. (2008). Know your Earthworm. Shoolini Institute of Life Sciences and Business Management, Solon, 47.
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., Karpouzas, D. G. & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010). Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in

- biobed systems. Chemosphere, 80(8), 914–921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.003>
- Karas, P., Metsoviti, A., Zisis, V., Ehaliotis, C., Omirou, M., Papadopoulou, E. S., Menkissoglou-Spirodi, U., Manta, S., Komiotis, D. & Karpouzas, D. G. (2015). Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. Science of the Total Environment, 530–531, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.086>
- Karmoker, J. R., Hasan, I., Ahmed, N., Mohammad, S. & Reza, S. (2019). Development and Optimization of Acyclovir Loaded Mucoadhesive Microspheres by Box-Behnken Design. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.3329/dujps.v18i1.41421>
- Katagi, T. (2006). Behavior of pesticides in water—sediment systems. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews, 133–251. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1280-5_4
- Khalid, S., Shahid, M., Murtaza, B., Bibi, I., Naeem, M. A. & Niazi, N. K. (2020). A critical review of different factors governing the fate of pesticides in soil under biochar application. Science of the Total Environment, 711(134645). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134645>
- Kirk, T. K. & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Annual Reviews in Microbiology, 41(1), 465–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002341>
- Kotterman, M. J., Rietberg, H. J., Hage, A. & Field, J. A. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus Bjerkandera sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. Biotechnology and Bioengineering, 57(2), 220–227. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<220::AID-BIT11>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<220::AID-BIT11>3.0.CO;2-K)
- Lammertyn, S., Masín, C. E., Zalazar, C. S. & Fernandez, M. E. (2021). Biomarkers response and population biological parameters in the earthworm *E. fetida* after short term exposure to atrazine herbicide. Ecological Indicators, 121, 107173. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107173>
- Laos, F., Mazzarino, M. J., Walter, I., Roselli, L., Satti, P., & Moyano, S. (2002). Composting of fish offal and biosolids in northwestern Patagonia. Bioresource technology, 81(3), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00150-X)
- Lescano, M. R., Pizzul, L., Castillo, M. D. P. & Zalazar, C. S. (2018). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid degradation in biomixtures based on alfalfa straw, wheat stubble, and river waste. Journal of Environmental Management, 228, 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.009>
- Lescano, M., Fussoni, N., Vidal, E. & Zalazar, C. (2022). Biodegradation of pesticide-contaminated wastewaters from a formulation plant employing a pilot scale biobed. Science of the Total Environment, 807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150758>
- Li, X., Wang, M., Chen, W. & Jiang, R. (2019). Evaluation of combined toxicity of Siduron and cadmium on earthworm (*E. fetida*) using biomarker response index. Science of the Total Environment. Total Environ, 646, 893–901. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.380>
- Lin, D., Zhou, Q., Xu, Y., Chen, C. & Li, Y. (2012). Physiological and molecular responses of the earthworm (*E. fetida*) to soil chlortetracycline contamination. Environmental Pollution, 171, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.020>
- Lin, Z., Zhen, Z., Liang, Y., Li, J., Yang, J., Zhong, L., Zhao, L., Li, Y., Luo, C., Ren, L., & Zhang, D. (2019). Changes in atrazine speciation and the degradation pathway in red soil during the vermiremediation process. Journal of Hazardous Materials, 364, 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.037>
- Liu, J., Pan, D., Wu, X., Chen, H., Cao, H., Li, Q. X. & Hua, R. (2018). Enhanced degradation of prometryn and other s-triazine herbicides in pure cultures and wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate immobilized Leucobacter sp. JW-1. Science of the Total Environment, 615, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.208>
- Liu, X., Chen, K., Chuang, S., Xu, X. & Jiang, J. (2019). Shift in bacterial community structure drives different atrazine-degrading efficiencies. Frontiers in Microbiology, 10(01). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00088>
- Liu, Y., Guo, J., Liu, W., Yang, F., Deng, Y., Meng, Y., Cheng, B., Fu, J., Zhang, J., Liao, X., Wei, L. & Lu, H. (2023). Effects of haloxyfop-p-methyl on the developmental toxicity, neurotoxicity,

- and immunotoxicity in zebrafish. *Fish and Shellfish Immunology*, 132, 108466. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108466>
- López-Puertollano, D., Agulló, C., Mercader, J. V., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. (2022). Design of a novel hapten and development of a sensitive monoclonal immunoassay for dicamba analysis in environmental water samples. *Science of the Total Environment*, 848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157770>
- Losa, S. M. (2020). Encuesta de superficies y rendimientos de cultivos de España (ESyRCE). *Revista de Estadística y Sociedad*, 77, 16–19.
- Luo, Y., Liang, J., Zeng, G., Chen, M., Mo, D., Li, G. & Zhang, D. (2018). Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, 71, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.023>
- Lyu, J., Park, J., Kumar Pandey, L., Choi, S., Lee, H., De Saeger, J., Depuydt, S. & Han, T. (2018). Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *L. sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.006>
- M. Chennaoui, Y. S. (2016). Evolution bacterial & fungal flora during in vessel composting of organic household waste. *Journal of Material and Environmental Science*, 9(i), 680–688. <https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.2.75>
- Manoli, K., Morrison, L. M., Sumarah, M. W., Nakhla, G., Ray, A. K. & Sharma, V. K. (2019). Pharmaceuticals and pesticides in secondary effluent wastewater: Identification and enhanced removal by acid-activated ferrate(VI). *Water Research*, 148, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.056>
- Mariani, M. L., Romero, R. L. & Zalazar, C. S. (2015). Modeling of degradation kinetic and toxicity evaluation of herbicides mixtures in water using the UV/H₂O₂ process. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14, 608–617. <https://doi.org/10.1039/c4pp00269e>
- Martin G. Rodriguez, B. H. R. J. V.-J. and M. H. M.-O. (2013). Cadmium toxicity evaluation in the earthworm *Eisenia foetida*: behavior and histopathological effects. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology*, 81–92. Recuperado de http://www.academia.edu/download/36700957/CBP2013_galeras.pdf
- Martin, T., Creed, J. & Brockhoff, C. (1994). EPA method 200.2 sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements. *Environmental Monitoring Systems Laboratory*. Recuperado de <http://www.envexp.com/download/techsupport/methods/200-2.pdf>
- Masin, C. E. & Rodríguez, A. R. (2012). Evaluación preliminar de dos tipos de dieta en la especie endógena *A. trapezoides* (Dugés, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Megadrilogica*, 15(10). <http://hdl.handle.net/11336/10901>
- Masin, C. E., Lescano, M. R., Rodríguez, A. R., Godoy, J. L. & Zalazar, C. S. (2018). Earthworms to assess the innocuousness of spent biomixtures employed for glyphosate degradation. *Journal of Environmental Science and Health*, 519–525. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1462922>
- Masís-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Tortella, G., Beita-Sandí, W., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2019). Removal of triazines, triazoles, and organophosphates in biomixtures and application of a biopurification system for the treatment of laboratory wastewaters. *Chemosphere*, 233, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.001>
- Massoud, M. A., El-Fadel, M., Scrimshaw, M. D. & Lester, J. N. (2006). Factors influencing development of management strategies for the Abou Ali River in Lebanon II: Seasonal and annual variation. *Science of the Total Environment*, 362(1–3), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.056>
- Medouni-Haroune, L., Zaidi, F., Medouni-Adrar, S., & Kecha, M. (2018). Olive pomace: from an olive mill waste to a resource, an overview of the new treatments. *J. Crit. Rev*, 5(6), 1-6. <http://dx.doi.org/10.22159/jcr.2018v5i5.28840>
- Mondal, A., Goswami, L., Hussain, N., Barman, S., Kalita, E., Bhattacharyya, P. & Bhattacharya, S. S. (2020). Detoxification and eco-friendly recycling of brick kiln coal ash using *E. fetida*: A clean approach through vermitechnology *Chemosphere*, 244, 125470. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125470>
- Mosiichuk, N. M., Maksymiv, I. V., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B. & Lushchak, V. I. (2018). Effect of prometryn-containing herbicide gesagard on hematological profiles and

- biochemical parameters in goldfish liver and plasma. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(10), 1177–1185. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_10_04.
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nelson, D. A. & Sommers, L. (1983). Total carbon, organic carbon, and organic matter. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 539–579. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c29>
- Nunes, M. E. T., Daam, M. A. & Espíndola, E. L. G. (2016). Survival, morphology and reproduction of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) as affected by Vertimec® 18 EC (a.i. abamectin) in tests performed under tropical conditions. *Applied Soil Ecology*, 100, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.023>
- OECD. (1984). 207: Earthworm, acute toxicity tests. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section, 2.
- Oliveira, G. A. R. de, Leme, D. M., de Lapuente, J., Brito, L. B., Porredón, C., Rodrigues, L. de B., Brull, N., Serret, J. T., Borràs, M., Disner, G. R., Cestari, M. M. & Oliveira, D. P. de. (2018). A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.026>
- Omirou, M., Dalias, P., Costa, C., Papastefanou, C., Dados, A., Ehaliotis, C. & Karpouzas, D. G. (2012). Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution*, 166, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.001>
- Papazlatani, C. V., Karas, P. A., Tucut, G., & Karpouzas, D. G. (2019). Expanding the use of biobeds: Degradation and adsorption of pesticides contained in effluents from seed-coating, bulb disinfection, and fruit-packaging activities. *Journal of Environmental Management*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.122>
- Paszczynski, A. & Crawford, R. L. (1995). Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress*, 11(4), 368–379. <https://doi.org/10.1021/bp00034a002>
- Paul, S., Goswami, L., Pegu, R. & Sundar Bhattacharya, S. (2020). Vermiremediation of cotton textile sludge by *Eudrilus eugeniae*: Insight into metal budgeting, chromium speciation, and humic substance interactions. *Bioresource Technology*, 314(May), 123753.
- Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M. & Vandenbulcke, F. (2014). Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 199–228. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>
- Pietrantoni, B. (2004). Promoting development of biobeds/Phytobacs by Bayer CropScience in France. In *European Biobed Workshop*. Malmö, Sweden. Recuperado de <http://www.cleanregion.dk/13%20Pietrantoni.pdf>
- Pimentel, D. (1996). Green revolution agriculture and chemical hazards. *The Science of the Total Environment* 188, S86–S98. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05280-1](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05280-1)
- Pizzul, L., Castillo, M. del P. & Stenström, J. (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*, 20(6), 751–759. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9263-1>
- Qiao, L. & Ho, G. (1997). The effects of clay amendment and composting on metal speciation in digested sludge. *Water Research*, 31(5), 951–964. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00290-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00290-4)
- Qu, M., Li, H., Li, N., Liu, G., Zhao, J., Hua, Y. & Zhu, D. (2017). Distribution of atrazine and its phytoremediation by submerged macrophytes in lake sediments. *Chemosphere*, 168, 1515–1522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.164>
- Rico, A., Sabater, C. & Castillo, M. Á. (2016). Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *E. fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.004>
- Rivero, A., Gérez, N., Jesús, F., Niell, S., Pia Cerdeiras, M., Heinzen, H. & Cesio, M. V. (2022). Unambiguous evaluation of chlorpyrifos and TCP bioremediation in laboratory and field experiments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102(18), 6845–6857. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1817429>

- Rodríguez-Campos, J., Dendooven, L., Alvarez-Bernal, D. & Contreras-Ramos, S. M. (2014). Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: A review. *Applied Soil*
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Castro-Gutiérrez, V. & Lizano-Fallas, V. (2018). Alternative approaches to determine the efficiency of biomixtures used for pesticide degradation in biopurification systems. *Toxicity and Biodegradation Testing*, 57-73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7425-2_3
- Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste management*, 26(9), 960-969. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.07.024>
- Rorat, A., Wloka, D., Grobelak, A., Grosser, A., Sosnecka, A., Milczarek, M., Jelonek, P., Vandenbulcke, F. & Kacprzak, M. (2017). Vermiremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in sewage sludge composting process. *Journal of Environmental Management*, 187, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.10.062>
- Ruiz-Hidalgo, K., Chin-Pampillo, J. S., Masís-Mora, M., Carazo R., E. & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2015). Degradation of carbofuran by *Trametes versicolor* in rice husk as a potential lignocellulosic substrate for biomixtures: From mineralization to toxicity reduction. *Process Biochemistry*, 49(12), 2266–2271. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.006>
- Saez, J. M., Bigliardo, A. L., Raimondo, E. E., Briceño, G. E., Polti, M. A. & Benimeli, C. S. (2018). Lindane dissipation in a biomixture: Effect of soil properties and bioaugmentation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.011>
- Sánchez, V., López-Bellido, F. J., Cañizares, P. & Rodríguez, L. (2017). Assessing the phytoremediation potential of crop and grass plants for atrazine-spiked soils. *Chemosphere*, 185, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.013>
- Sánchez-Camazano, M., Lorenzo, L. F. & Sánchez-Martín, M. J. (2005). Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon Region, Spain. *Environmental Monitoring and Assessment*, 105(1–3), 11–24. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-2814-y>
- Schnurer, J. & Rosswall, T. (1982). Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6). <https://doi.org/10.1128/aem.43.6.1256-1261.1982>
- SGAyDS (Secretaría de Gobierno de Ambiente y Desarrollo Sustentable). (2019). Marco normativo para la producción, registro y aplicación de compost. Resolución Conjunta 1 / 2019. Buenos Aires, Argentina: SGAYDS.
- Sharma, K. & Garg, V. K. (2018). Comparative analysis of vermicompost quality produced from rice straw and paper waste employing earthworm *E. fetida* (Sav.). *Bioresource Technology*, 250(December), 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.101>
- Shi, Y., Shi, Y. & Zheng, L. (2020). Individual and cellular responses of earthworms (*E. fetida*) to endosulfan at environmentally related concentrations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103299. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103299>
- Shinn, M. B. (1941). Colorimetric Method for Determination of Nitrite. *Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition*, 13(1), 33–35. <https://doi.org/10.1021/i560089a010>
- Singh, J. & Kalamdhad, A. S. (2013). Bioavailability and leachability of heavy metals during water hyacinth composting. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 25(1), 1–14. <https://doi.org/10.3184/095422913X13584520294651>
- Singh, J. & Kalamdhad, A. S. (2014). Effect of carbide sludge (lime) on bioavailability and leachability of heavy metals during rotary drum composting of water hyacinth. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 26(2), 76–84. <https://doi.org/10.3184/095422914X13952534949370>
- Singh, S., Kumar, V., Chauhan, A., Datta, S., Wani, A. B., Singh, N. & Singh, J. (2018). Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 211–237. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0665-8>
- Spliid, N. H., Helweg, A. & Heinrichson, K. (2006). Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed. *Chemosphere*, 65(11), 2223–2232. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.049>

- Stepić, S., Hackenberger, B. K., Velki, M., Lončarić, Ž. & Hackenberger, D. K. (2013). Effects of individual and binary-combined commercial insecticides endosulfan, temephos, malathion and pirimiphos-methyl on biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.011>
- Subbiahanadar Chelladurai, K., Selvan Christyraj, J. D., Azhagesan, A., Paulraj, V. D., Jothimani, M., Yesudhasan, B. V. & Selvan Christyraj, J. R. S. (2020). Exploring the effect of UV-C radiation on earthworm and understanding its genomic integrity in the context of H2AX expression. *Scientific Reports*, 10(1), 21005. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77719-2>
- Suthar, S., Sajwan, P. & Kumar, K. (2014). Vermiremediation of heavy metals in wastewater sludge from paper and pulp industry using earthworm *E. fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.030>
- Tabatabai, M. A. & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Ten, M. C., Elgueta, S., Santos, C. & Lima, N. (2016). Atrazine dissipation in a biobed system inoculated with immobilized white-rot fungi. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(10), 1451–1461. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1155699>
- Torstensson, L. & Castillo, M. (1997). Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pesticide Outlook* (United Kingdom).
- Torstensson, L. (2000). Experiences of biobeds in practical use in Sweden. *Pesticide Outlook*, 11(5), 206–211. <https://doi.org/10.1039/B008025J>
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Castillo, M. D. P., Cea, M., Mella-Herrera, R. & Diez, M. C. (2012). Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages. *Chemosphere*, 88(2), 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.072>
- Tripathi, G. & Bhardwaj, P. (2004). Comparative studies on biomass production, life cycles and composting efficiency of *E. fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology*, 92(3), 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.005>
- Tripathi, G., Kachhwaha, N. & Dabi, I. (2009). Impact of phorate on malate dehydrogenases, lactate dehydrogenase and proteins of epigeic, anecic and endogeic earthworms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.07.004>
- Tripathi, G., Kachhwaha, N., Dabi, I. & Bandooni, N. (2011). Temperature-dependent alterations in metabolic enzymes and proteins of three ecophysiologically different species of earthworms. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 769–776. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132011000400017>
- US Environmental Protection Agency. (1996). New pesticide fact sheet.
- Usmani, Z., Kumar, V. & Mritunjay, S. K. (2017). Vermicomposting of coal fly ash using epigeic and epi-endogeic earthworm species: Nutrient dynamics and metal remediation. *RSC Advances*, 7(9), 4876–4890. <https://doi.org/10.1039/c6ra27329g>
- Vaughan, D., Cheshire, M. V. & Ord, B. G. (1994). Exudation of peroxidase from roots of *Festuca rubra* and its effects on exuded phenolic acids. *Plant Soil*, 160, 153–155. <https://doi.org/10.1007/BF00150357>
- Vega, A. B., Frenich, A. G. & Vidal, J. M. (2005). Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 538(1–2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.003>
- Velisek, J., Stara, A., Koutnik, D. & Machova, J. (2015). Effects of prometryne on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.011>
- Velki, M. & Hackenberger, B. K. (2013). Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere*, 90(3), 1216–1226. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.051>
- Venkateswara Rao, J., Surya Pavan, Y. & Madhavendra, S. S. (2003). Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 296–301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00013-1)
- Vischetti, C., Capri, E., Trevisan, M., Casucci, C. & Perucci, P. (2004). Biomassbed: A biological system to reduce pesticide point contamination at farm level. *Chemosphere*, 55(6), 823–828.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.042>
- Vischetti, C., Coppola, L., Monaci, E., Cardinali, A. & Castillo, M. D. P. (2007). Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(3), 267–272. <https://doi.org/10.1051/agro:2007020>
- Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Pütz, T., Herbst, M. & Vereecken, H. (2014). 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Research*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.032>
- Waite, D. T., Bailey, P., Sproull, J. F., Quiring, D. V., Chau, D. F., Bailey, J. & Cessna, A. J. (2005). Atmospheric concentrations and dry and wet deposits of some herbicides currently used on the Canadian Prairies. *Chemosphere*, 58(6), 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.105>
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 161–187. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011>
- Yang, G., Chen, C., Wang, Y., Peng, Q., Zhao, H., Guo, D., Wang, Q. & Qian, Y. (2017). Mixture toxicity of four commonly used pesticides at different effect levels to the epigeic earthworm, *E. fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.037>
- Yardley, R. B., Lazorchak, J. M. & Gast, L. C. (1996). The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(9), 1532–1537. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150915>
- Yue, L., Ge, C. J., Feng, D., Yu, H., Deng, H. & Fu, B. (2017). Adsorption–desorption behavior of atrazine on agricultural soils in China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 57, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.11.002>
- Zenteno-Rojas, A., Martinez-Romero, E., Rincón-Molina, C. I., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Meza-Gordillo, R., Villalobos-Maldonado, J. J. & Rincón-Rosales, R. (2019). Removal of High Concentrations Decachlorobiphenyl of Earthworm *E. fetida* and its Symbiotic Bacteria in a Vermicomposting System. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4170-5>
- Zhou, J., Hu, F., Jiao, J., Liu, M. & Li, H. (2012). Effects of bacterial-feeding nematodes and prometryne-degrading bacteria on the dissipation of prometryne in contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 12(4), 576–585. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0473-5>
- Zucconi, F. (1985). Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *Composting of Agricultural and Other Wastes*, 73–85.

M. Material complementario

M.1. Procedimiento para la cuantificación de herbicidas

Productos químicos Los estándares analíticos de herbicidas se adquirieron principalmente de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburgo; Alemania), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; EE. UU.) y ChemService (West Chester, PA; EE. UU.).

Para los estudios de validación, se prepararon soluciones estándar de trabajo a una concentración de 1000 mg/L, se almacenaron a -20°C en viales ámbar y se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Para la preparación de la fase móvil, se obtuvieron formiato de amonio (FNH₄), acetato de amonio (AcNH₄) y ácido fórmico (98%) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; EE. UU.), Metanol (MeOH) y acetonitrilo (MeCN) se compraron a Fisher Chemical (Geel, Bélgica) y eran de grado Optima®, y el agua desionizada se produjo con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.). Para la preparación de la muestra, se obtuvieron sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄), cloruro de sodio (NaCl) y acetonitrilo de grado HPLC (MeCN) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; EE. UU.). Todos los demás suministros utilizados eran de la mejor calidad analítica disponible comercialmente. La determinación de los herbicidas LC-target se realizó con un sistema Acquity UPLC® (Waters, Milford, MA, EE. UU.) equipado con una columna Acquity UPLC®BEH C18 Shield (100 × 2,1 mm × 1,7 µm) y acoplado a un analizador de masas de triple cuadrupolo TQD (Waters, Milford, MA, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Los parámetros y condiciones instrumentales específicos empleados en cada una de las diferentes determinaciones se presentan en las Tablas M1-M2.

Tabla M1. Condiciones de UHPLC-MS/MS para la determinación de herbicidas.

HPLC	Waters Acquity UPLC® system
MS	Waters TQD
Tipo de Columna	Acquity UPLC®BEH C18 Shield (100 × 2,1 mm × 1,7 µm)
Temperatura de la Columna	40°C
Fase Móvil A (agua)	5mM formiato de amonio con 0,1% ácido fórmico
Fase Móvil B (metanol)	5mM formiato de amonio con 0,1% ácido fórmico
Gradiente de Fase Móvil	0 min – 0,4mL/min – 10% B 1 min – 0,35mL/min – 50% B 11 min – 0,45mL/min – 95% B 12 min – 0,7mL/min – 95% B 14 min – 0,7mL/min – 95% B 16 min – 0,3mL/min – 10% B
Volumen de Inyección	5 µL
Temperatura del muestreador automático	5 °C
Modo de Ionización	ESI + / ESI -
Voltaje de Capilar	1 kV
Temperatura de la Fuente	120 °C
Temperatura de Desolvatación	350 °C
Flujo de Gas de Desolvatación (N ₂)	800 L/h
Flujo de Gas Cónico (N ₂)	150 L/h
Flujo de Gas de Colisión (Ar)	0,14 mL/min

Tabla M2. Condiciones UHPLC-ESI-MS/MS: ion precursor y ion producto de la transición cuantificadora y cualificadora, así como su respectiva energía de colisión (CE). Voltaje de cono (CV) y modo de electrospray de ionización (ESI) positivo (+) o negativo (-).

Herbicidas	Transición del cuantificador	CE (V)	Transición de clasificación	CE (V)	CV (V)	ESI
Atrazina	216,1 > 96,01	23	216,1 > 174,1	18	33	+
Cletodin	359,9 > 164	20	359,9 > 268	12	27	+
Dicamba	219 > 175	5	221 > 177	5	10	-
Haloxifop-P-metilo	362 > 91	30	362 > 316	18	30	+
Prometrina	242 > 158	25	242 > 200,1	17	20	+

La extracción de herbicidas del suelo y la biomezcla se realizó de la siguiente manera (ver Tabla M3).

Tabla M3. Pasos detallados de los procedimientos analíticos para la determinación de herbicidas.

Extracción con solvente en dos pasos	
Primer paso	
Cantidad de muestra (g)	1
Solvente extractante (mL)	Metanol (5)
Extracción	2 h con agitador orbital
Centrifugación	5 min at 2500 rpm
Segundo paso	
Solvente de remojo (mL)	Agua (3)
Mezclar	20 s con vortex Acetonitrilo (1% de ácido acético) (10)
Solvente extractante (mL)	20 s con vortex
Mezclar	MgSO ₄ anhidro (3)
Sal de partición líquido-líquido (g)	3 minutos
Agitación vigorosa a mano	5 minutos a 2500 rpm
Centrifugación	Combina los 20 mL de sobrenadantes. Pasa 1 mL del extracto a través de un filtro de PTFE de 0.22 µm para el análisis por UPLC-MS/MS.
Extracto final	Agua (3)

El proceso de validación abarcó una evaluación exhaustiva de la recuperación, selectividad, límites de cuantificación, linealidad, precisión y exactitud. La recuperación de cada herbicida se determinó mediante tres replicados en tres niveles de concentración. Esto implicó comparar las áreas de pico de los herbicidas en muestras estándar con las de (1) muestras en blanco extraídas, enriquecidas con cantidades idénticas de compuesto y tratadas en consecuencia (ensayo de recuperación), y (2) estándares emparejados con la matriz, donde las muestras en blanco extraídas se enriquecieron con cantidades correspondientes de herbicidas para evaluar posibles efectos de matriz en la ionización ESI (LC-MS/MS). Los porcentajes promedio de recuperación se encontraron dentro del rango del 70 al 120%, con una desviación estándar relativa (RSD) por debajo del 20% en la mayoría de los casos. Para evaluar la selectividad del método, se analizaron extractos de muestras tanto en blanco como enriquecidas. La determinación del límite de cuantificación (LOQ) implicó inyectar múltiples extractos de muestras en blanco (n = 6) y establecer el LOQ como diez veces la magnitud de la relación señal-ruido (S/N) de la respuesta

de fondo. En última instancia, el LOQ se definió como la concentración más baja medible con una precisión intraensayo (% CV) y sesgo relativo ambos por debajo del 20%. La precisión se cuantificó como % RSD, y la exactitud se calculó en función del error relativo (% RE), consulte la Tabla M4.

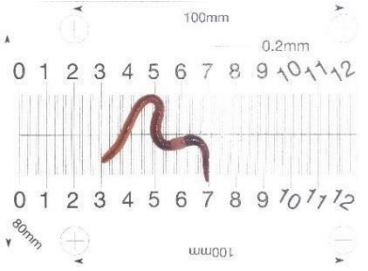
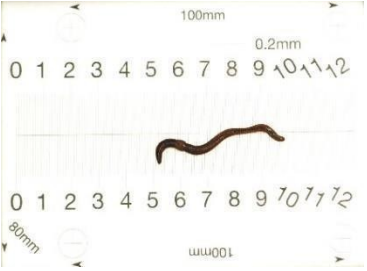
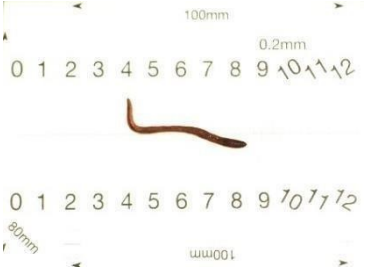
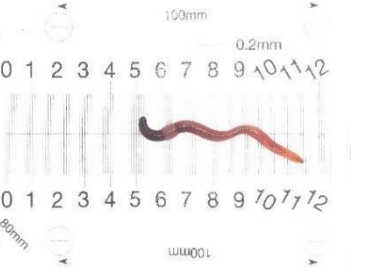
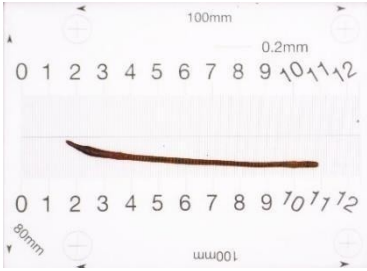
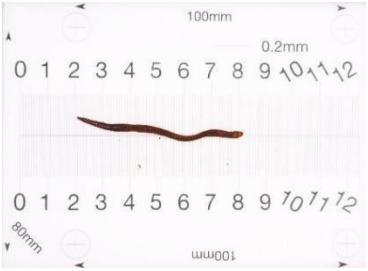
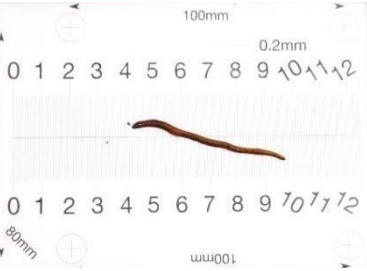
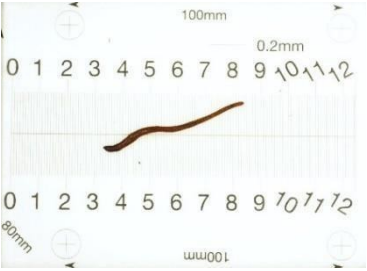
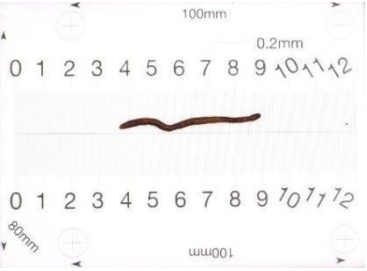
Tabla M4. Resultados de validación analítica. Porcentajes de recuperación obtenidos para los herbicidas determinados en tres niveles de concentración y en el LOQ.

Herbicidas	Suelo				Biomezcla			
	Nivel de concentración (mg/kg)				Nivel de concentración (mg/kg)			
	0.01 (LOQ)	1	50	250	0.01 (LOQ)	1	50	250
	%Rec	%Rec	%Rec	%Rec	%Rec	%Rec	%Rec	%Rec
	(RSD)	(RSD)	(RSD)	(RSD)	(RSD)	(RSD)	(RSD)	(RSD)
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
Atrazina	75 (15)	94 (19)	96 (19)	113 (23)	79 (16)	106 (21)	87 (17)	112 (22)
Cletodin	96 (17)	83 (17)	108 (22)	117 (22)	109 (22)	112 (22)	106 (21)	100 (29)
Dicamba	76 (15)	99 (20)	77 (15)	86 (17)	82 (16)	109 (22)	87 (17)	106 (21)
Haloxifop-P-metilo	89 (18)	111 (22)	104 (21)	112 (22)	95 (19)	76 (15)	89 (18)	85 (17)
Prometrina	76 (15)	99 (20)	77 (15)	86 (17)	82 (16)	109 (22)	87 (17)	106 (21)

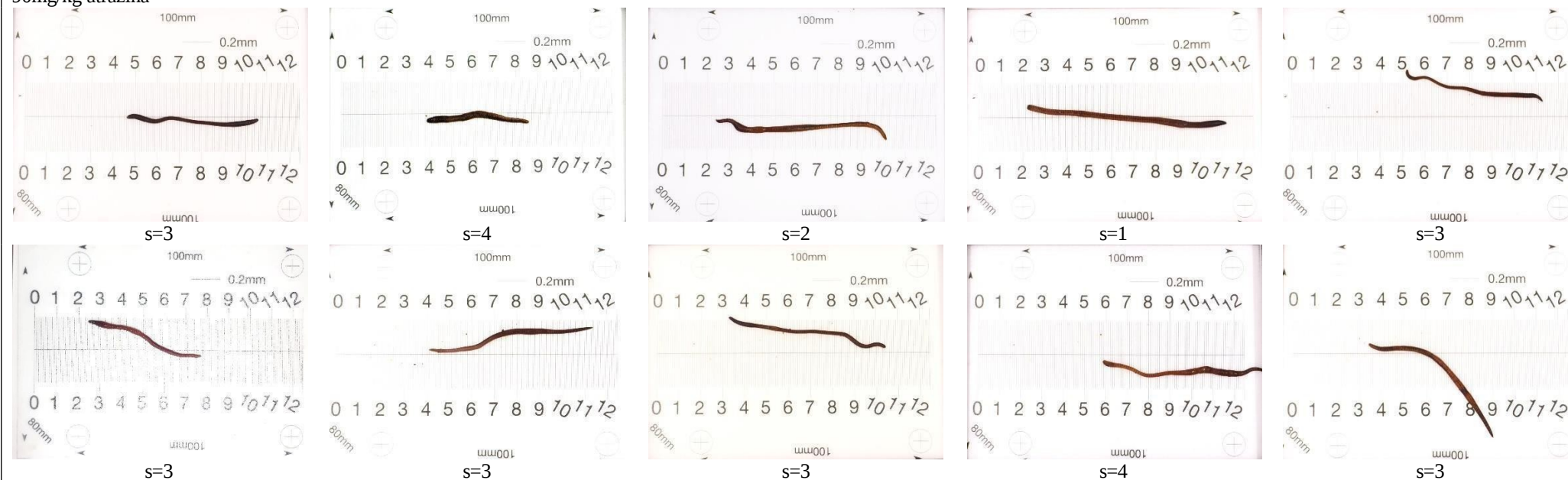
(1) Nivel de concentración: 100 mg/kg

M.2. Experimentos de CE50

Se realizaron tres mediciones del índice de lesiones, y cada medición involucró 10 fotografías. Sin embargo, esta sección muestra las 10 fotos correspondientes a la primera medición.

50 mg/kg atrazina					I_I
 s=0	 s=0	 s=0	 s=1	 s=0	
 s=3	 s=3	 s=3	 s=3	 s=3	26, 7%

90mg/kg atrazina



I_I

50, 0%

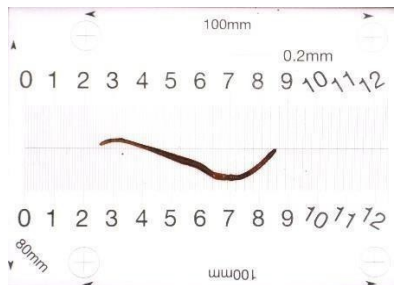
100mg/kg atrazina



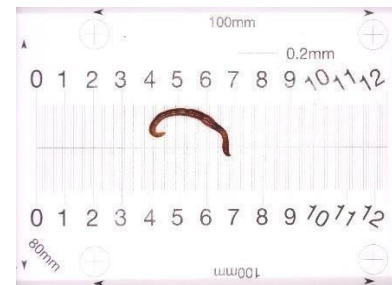
s=5



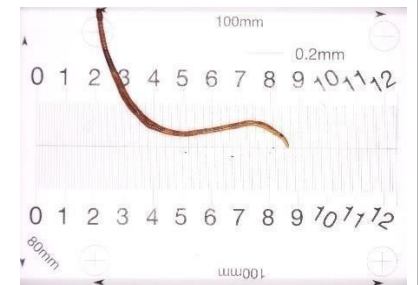
s=5



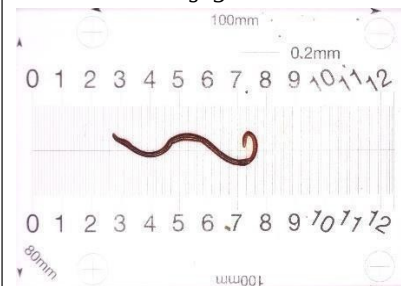
s=3



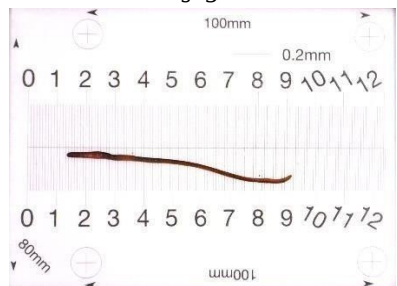
s=4



s=3



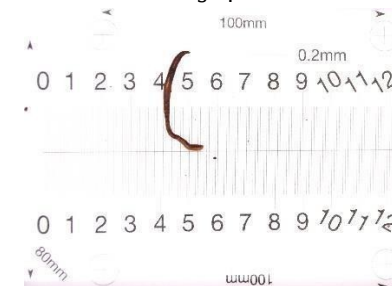
s=3



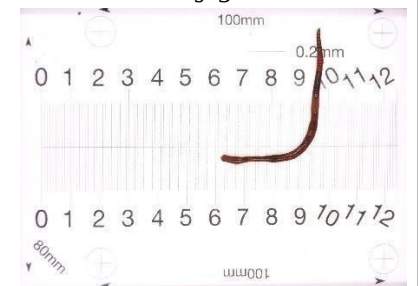
s=3



s=4



s=3

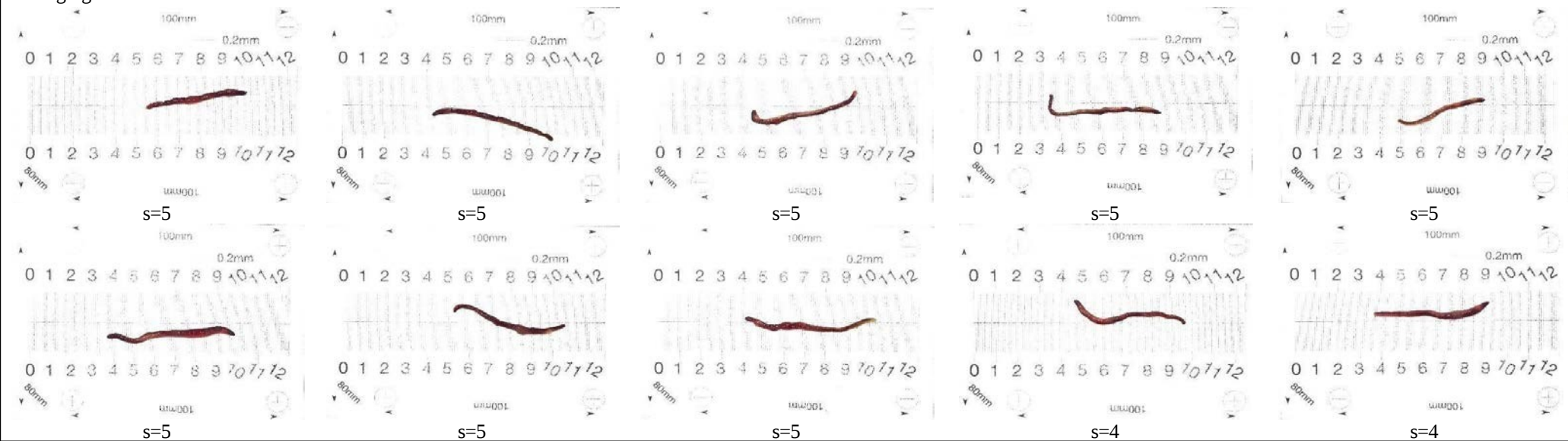


s=2

I_I

54, 2%

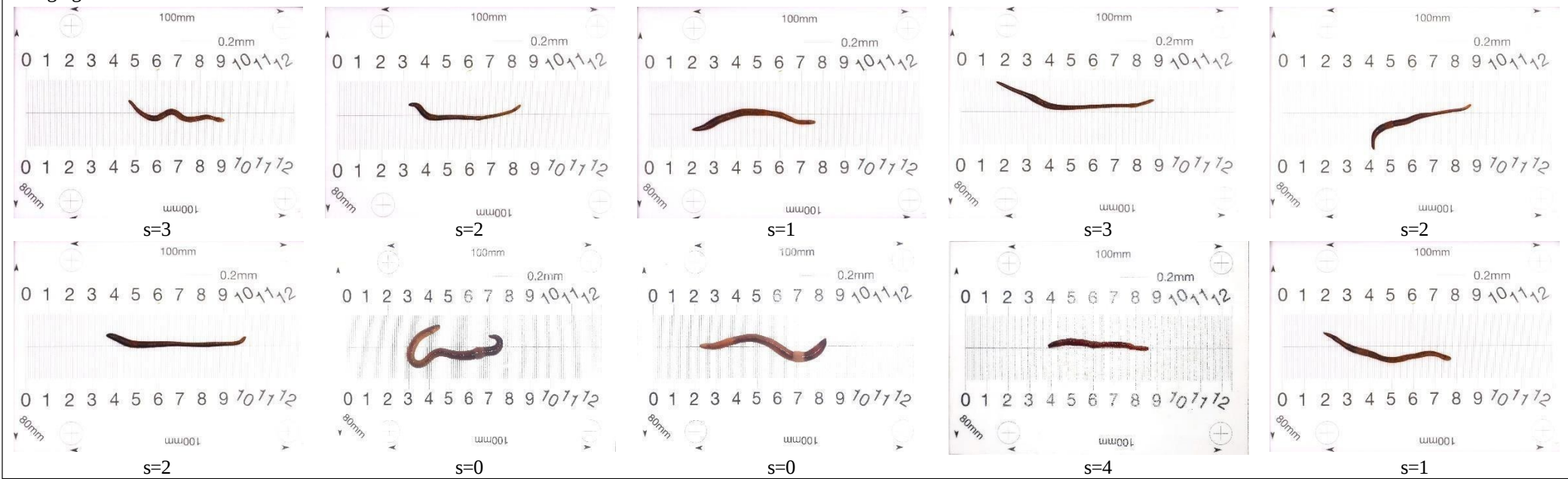
135mg/kg atrazina



I_T

80,0%

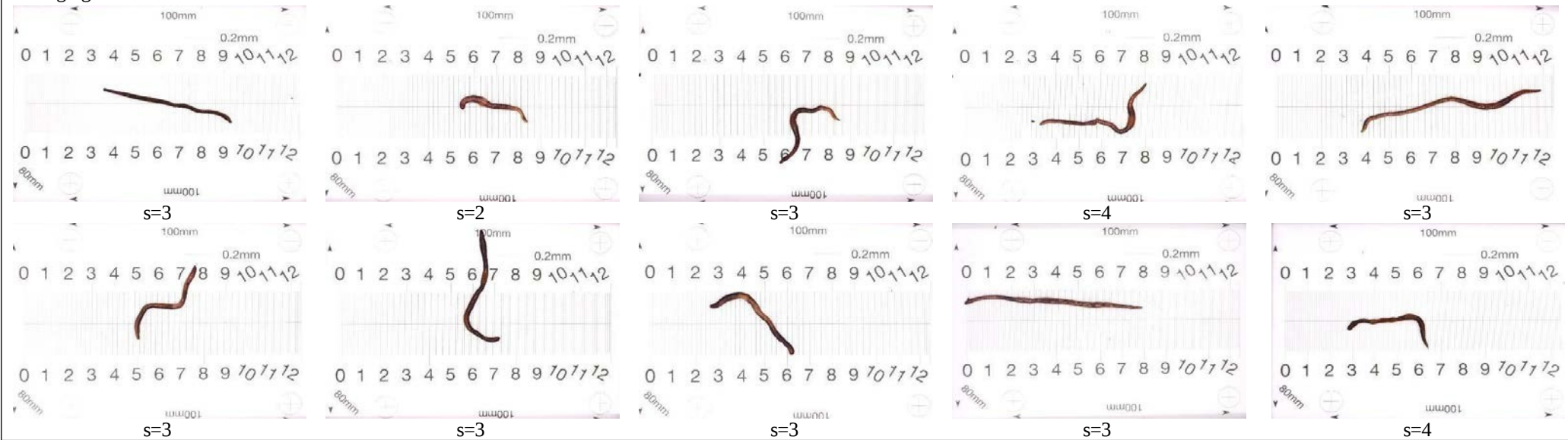
50mg/kg cletodim



I_I

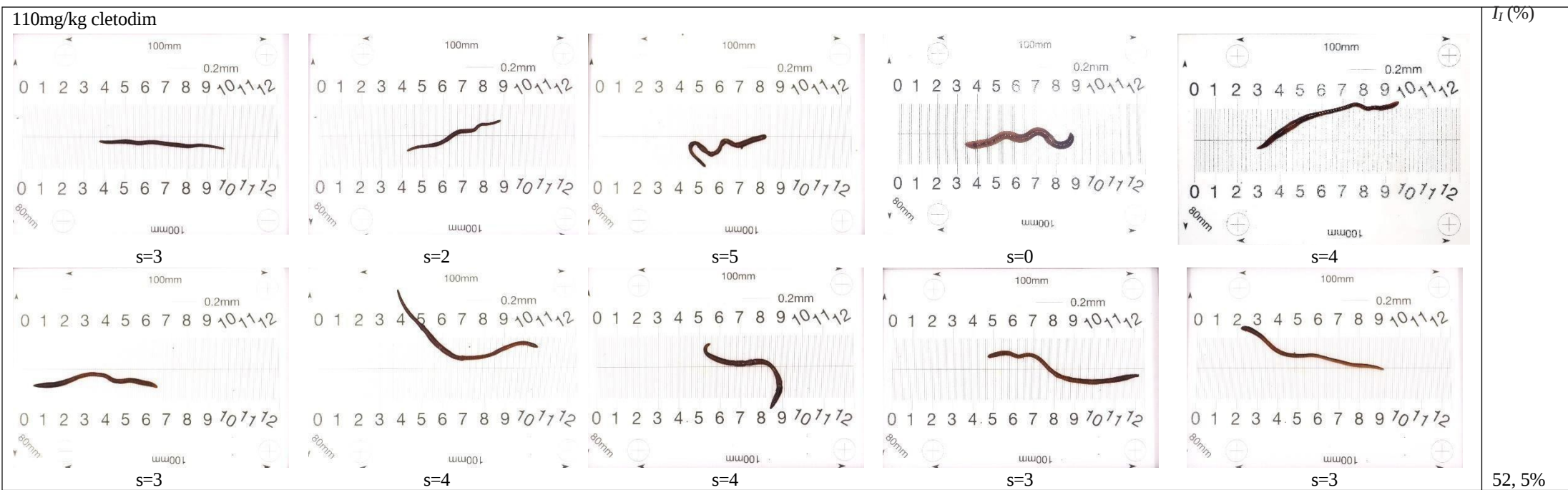
24, 2%

100mg/kg cletodim

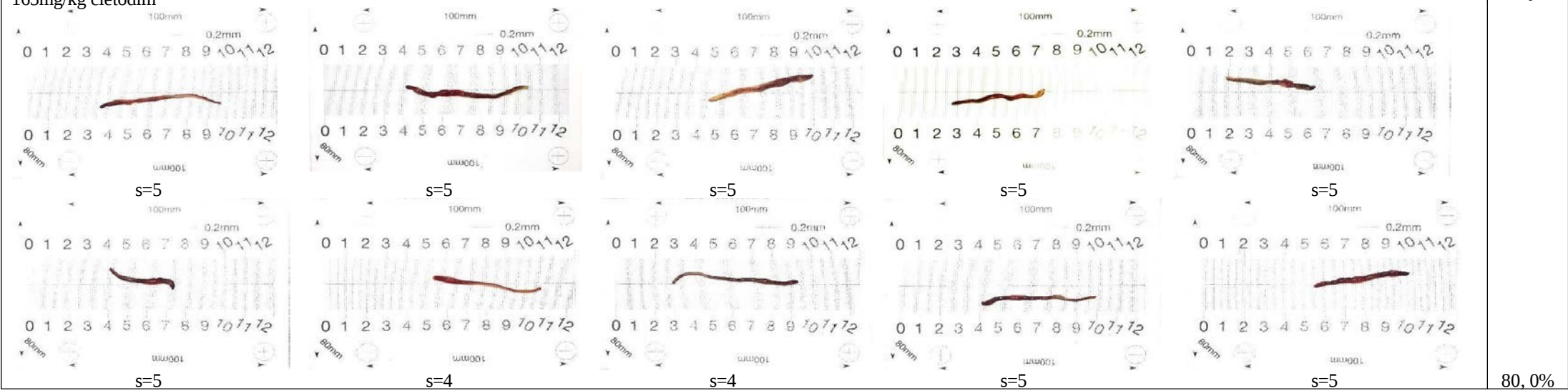


I_I

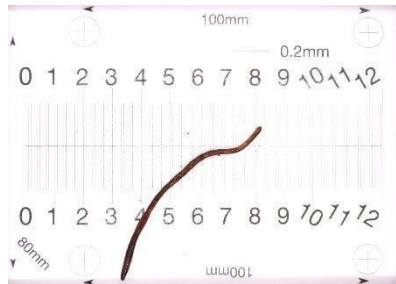
49, 2%



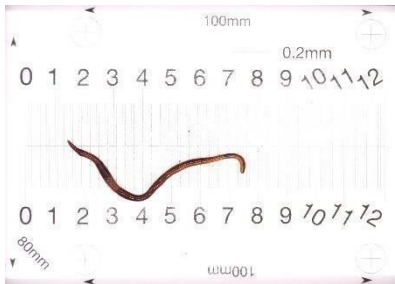
165mg/kg cletodim



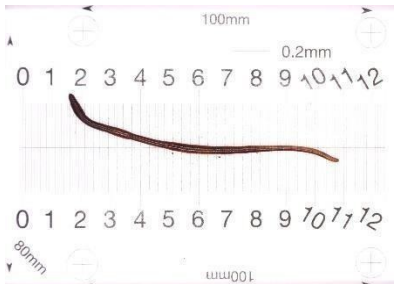
50mg/kg prometrin



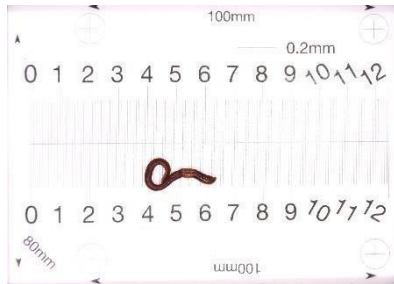
s=3



s=3



s=3



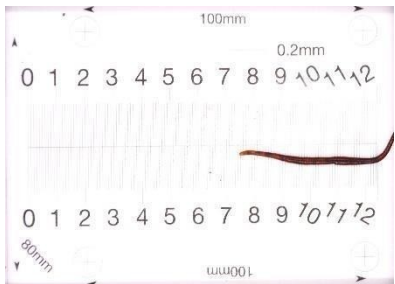
s=0



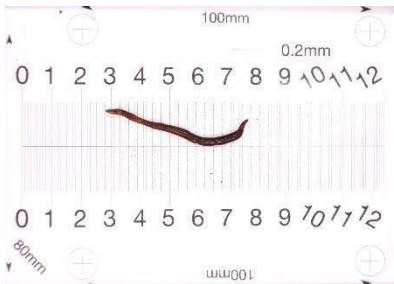
s=1



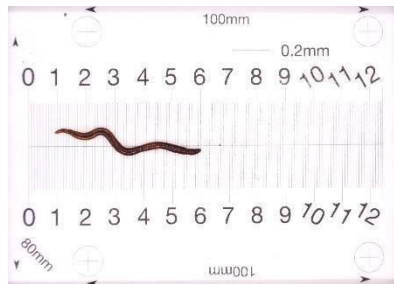
s=3



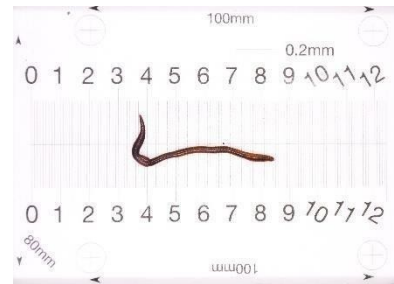
s=2



s=1



s=1

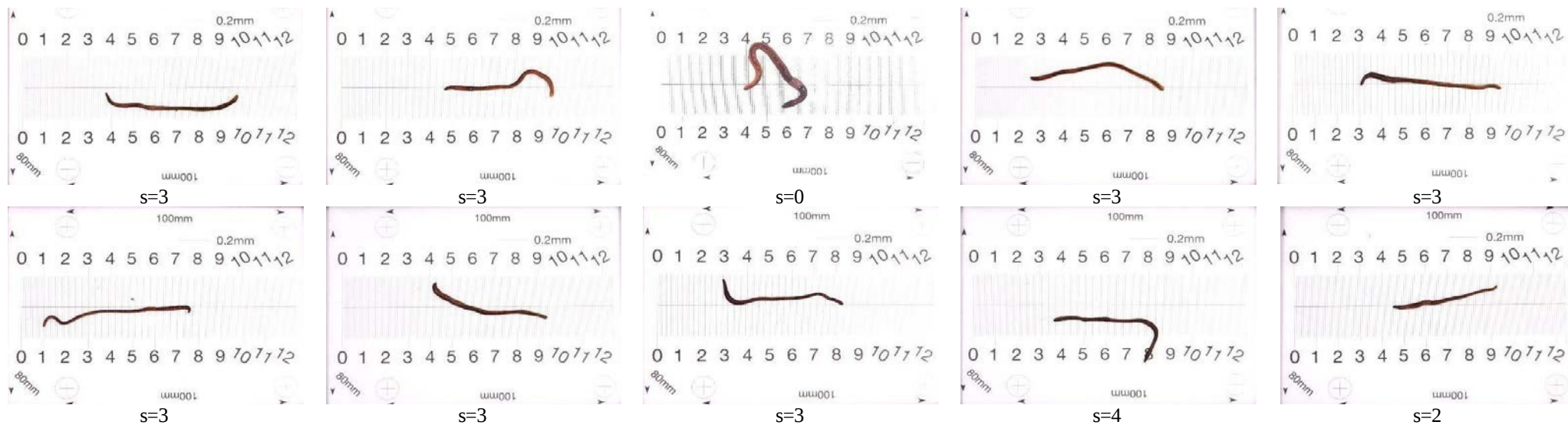


s=2

I_I

24, 2%

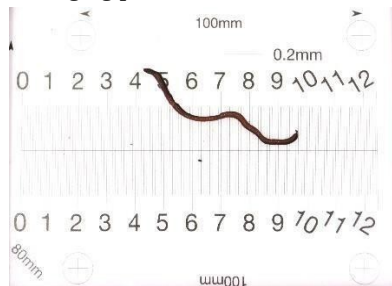
100mg/kg prometrina



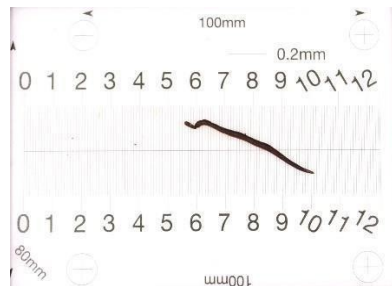
I_I

44, 2%

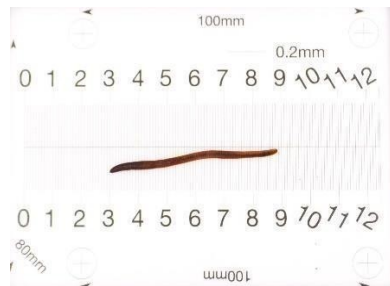
150mg/kg prometrina



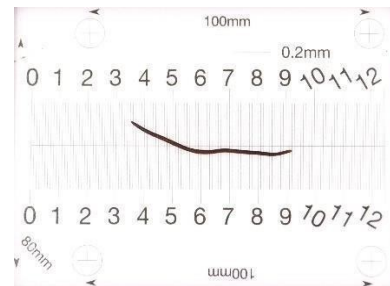
s=5



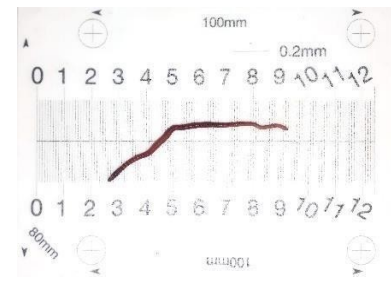
s=5



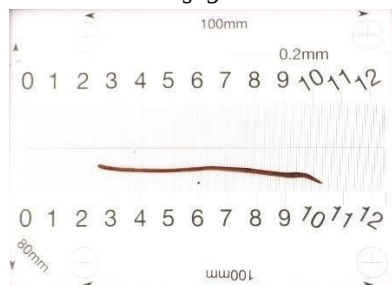
s=1



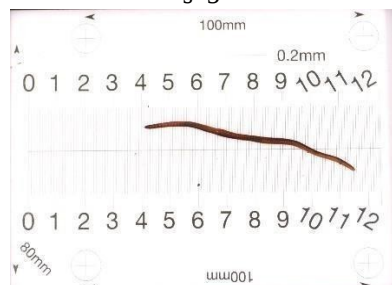
s=3



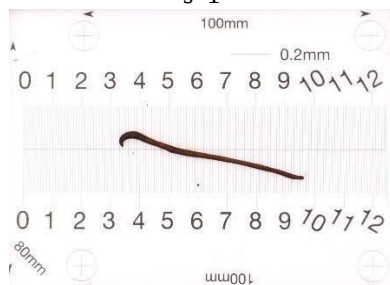
s=3



s=3



s=3



s=3



s=4

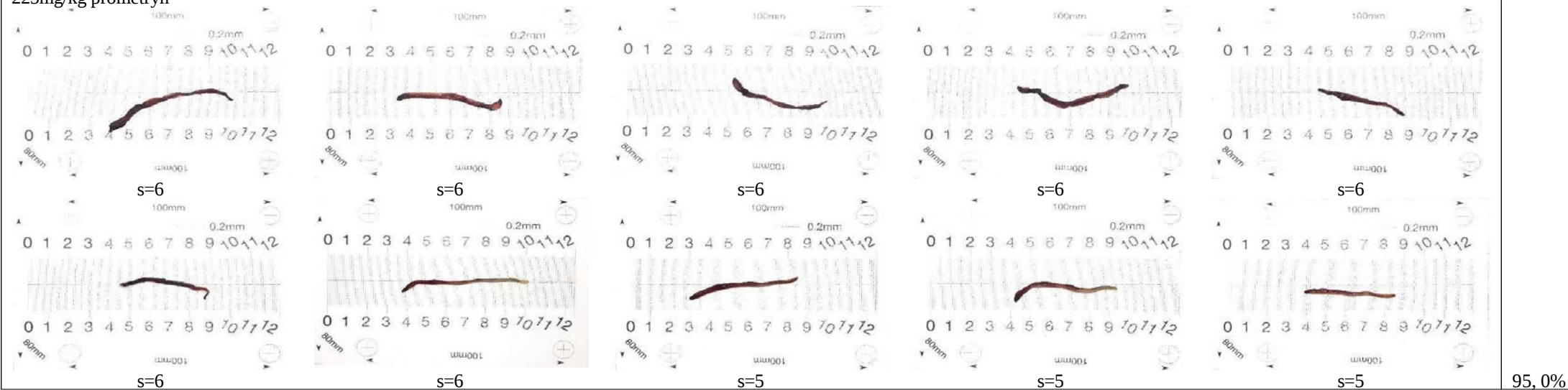


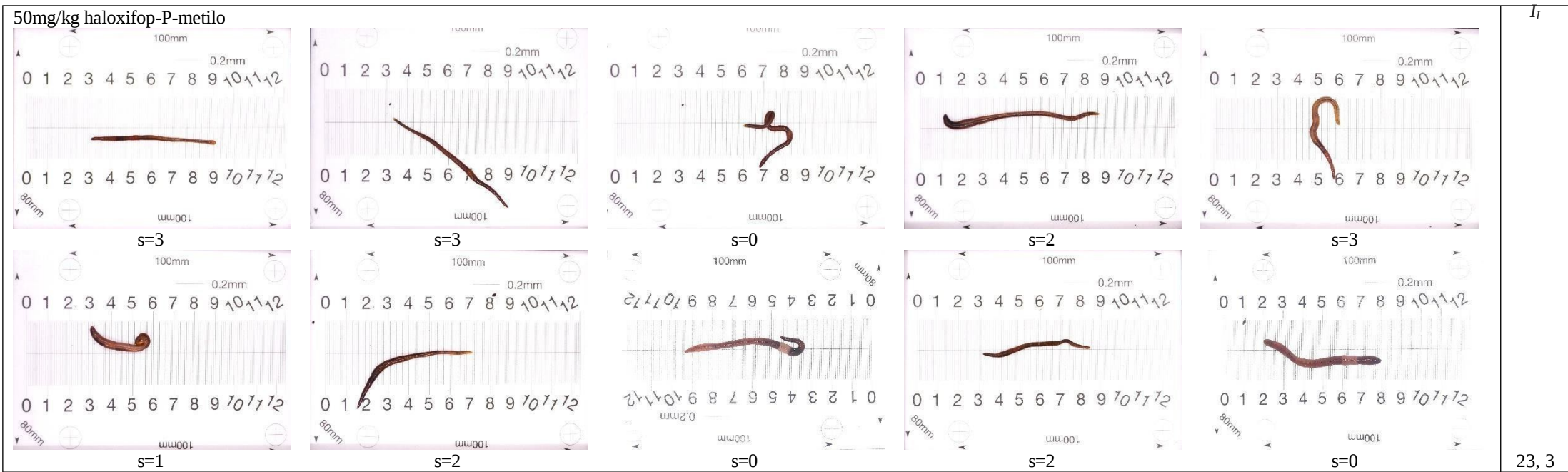
s=3

I_I

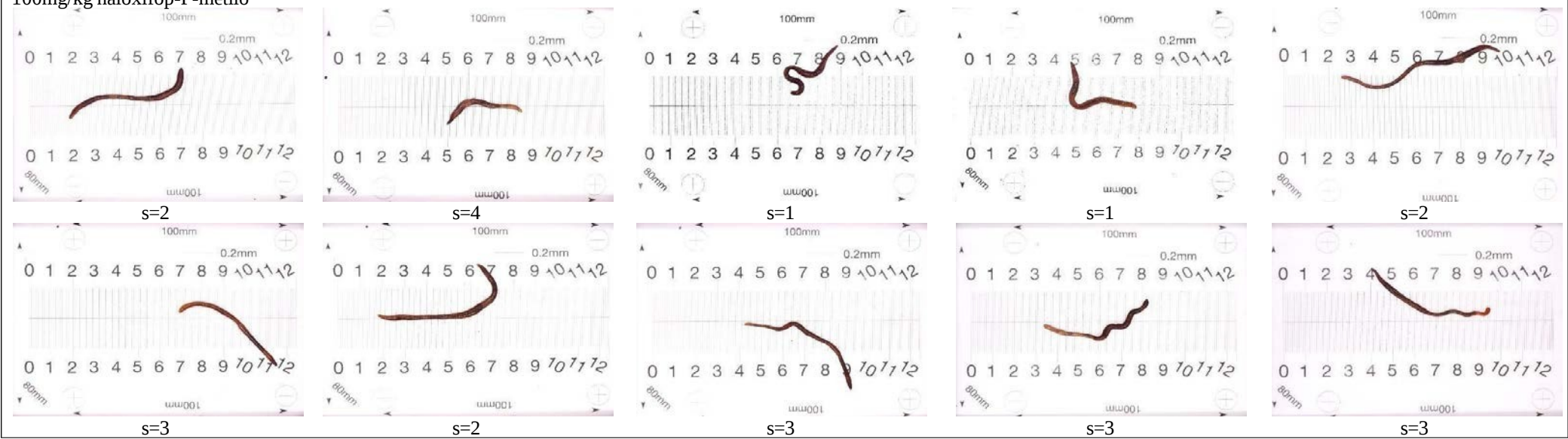
50, 8%

225mg/kg prometryn



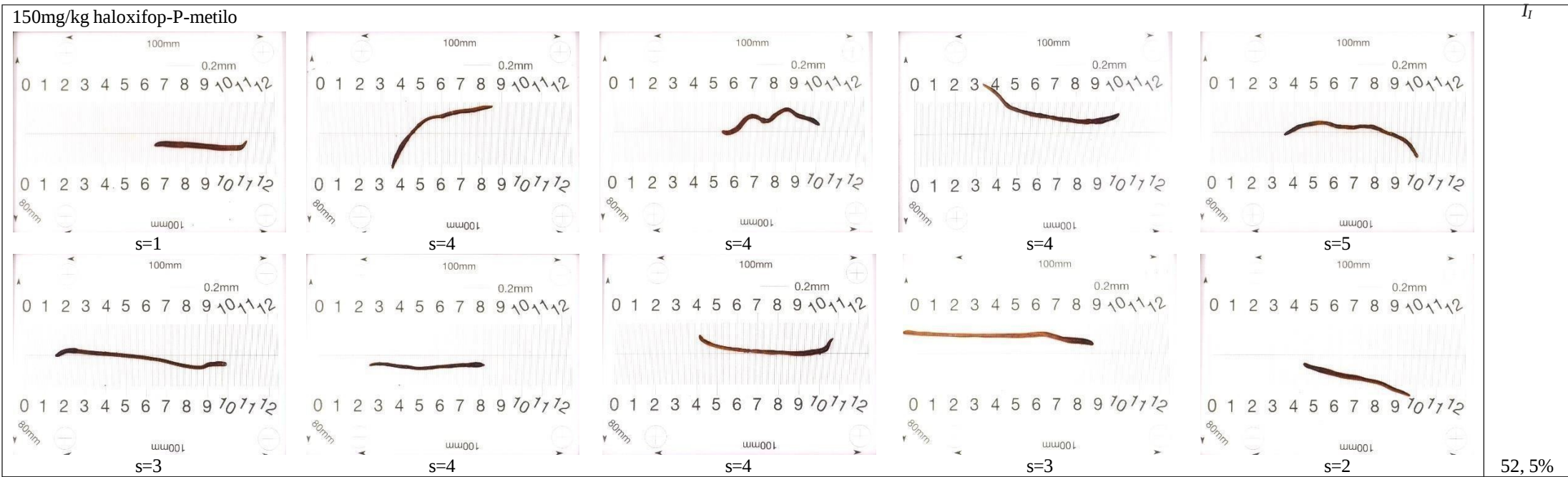


100mg/kg haloxifop-P-metilo

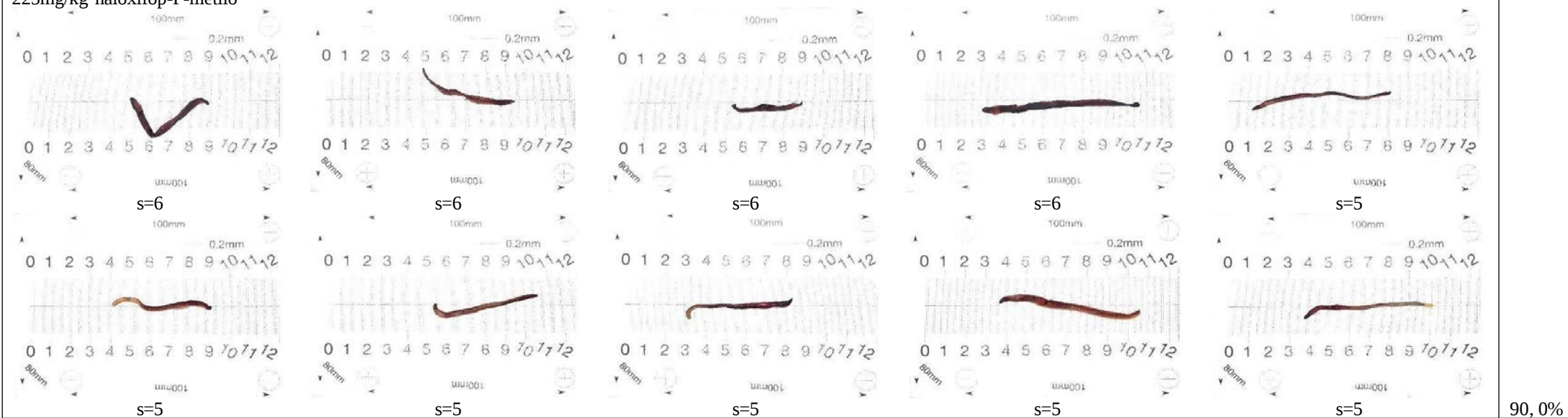


I_I

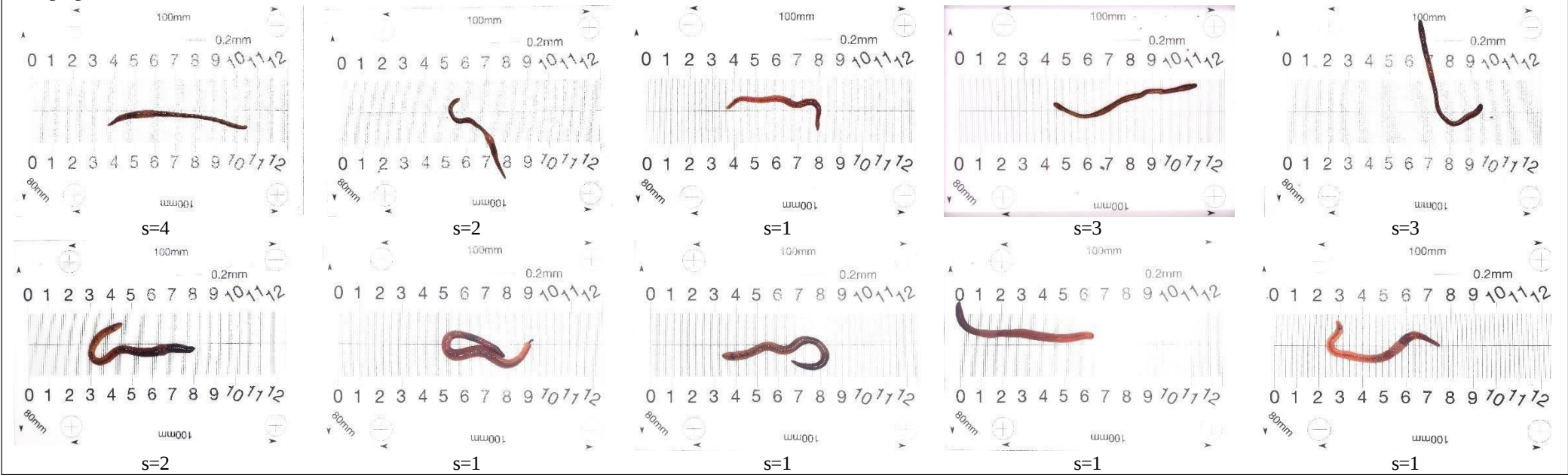
43, 3%



225mg/kg haloxifop-P-metilo



35mg/kg dicamba

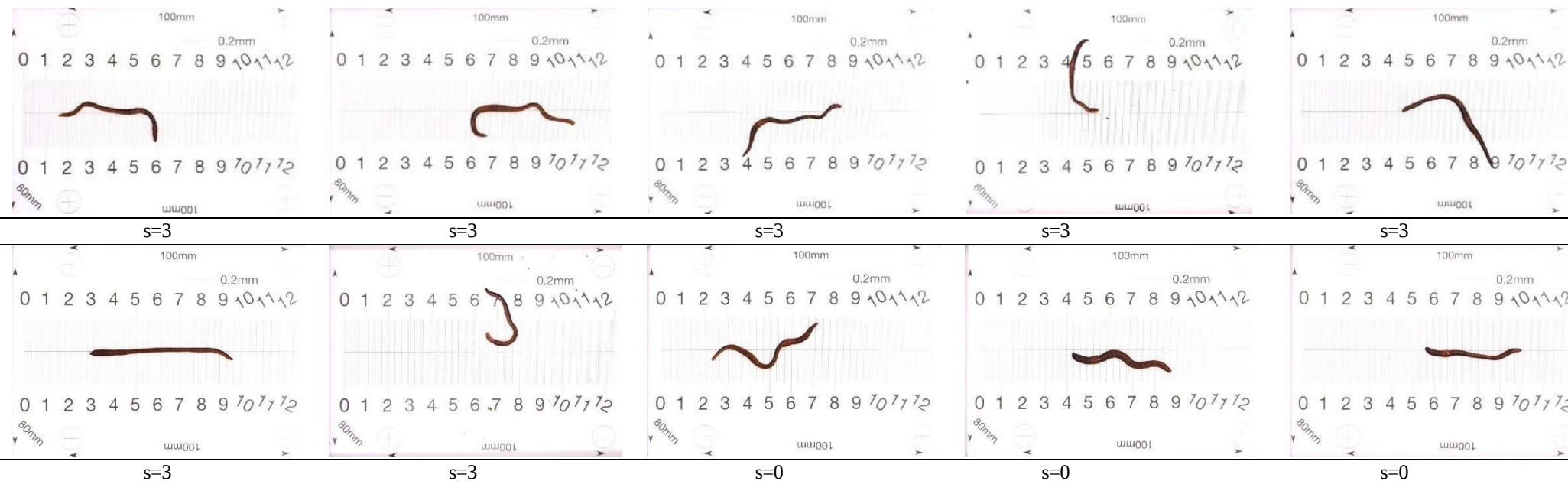


I_I

31, 7%

50mg/kg dicamba

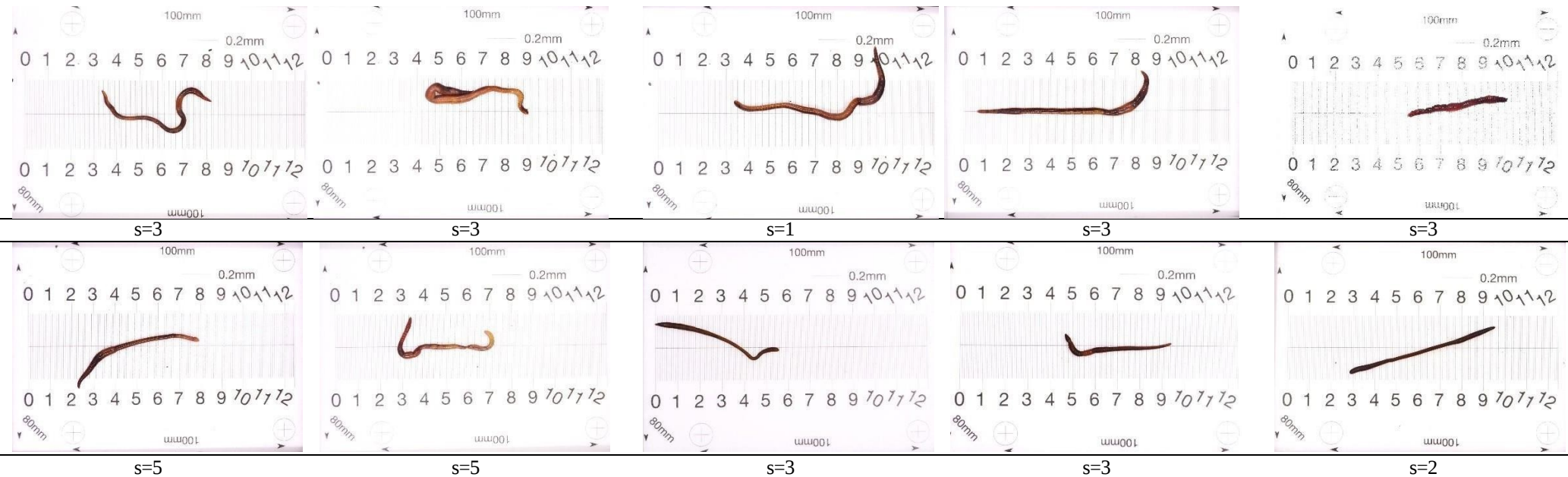
II



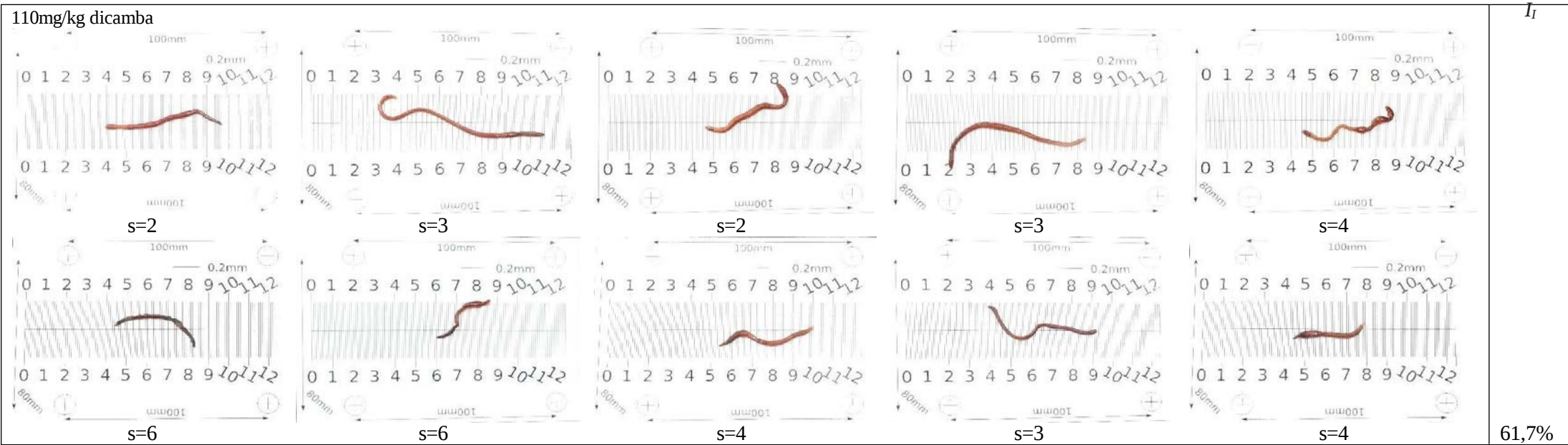
35, 0%

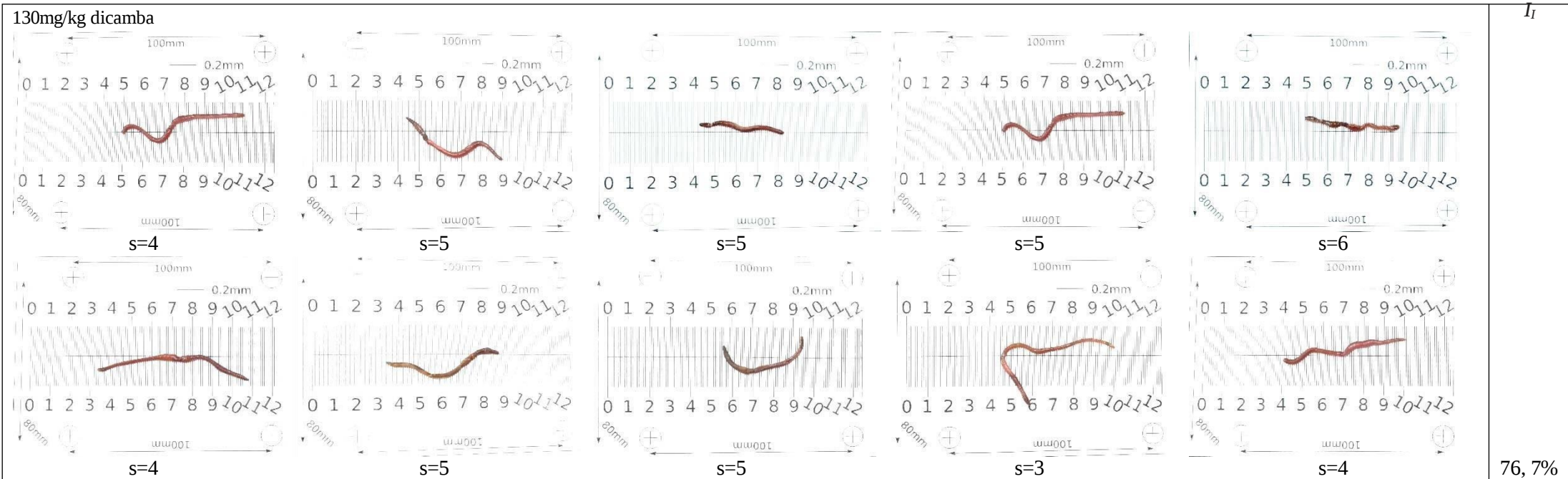
100mg/kg dicamba

II



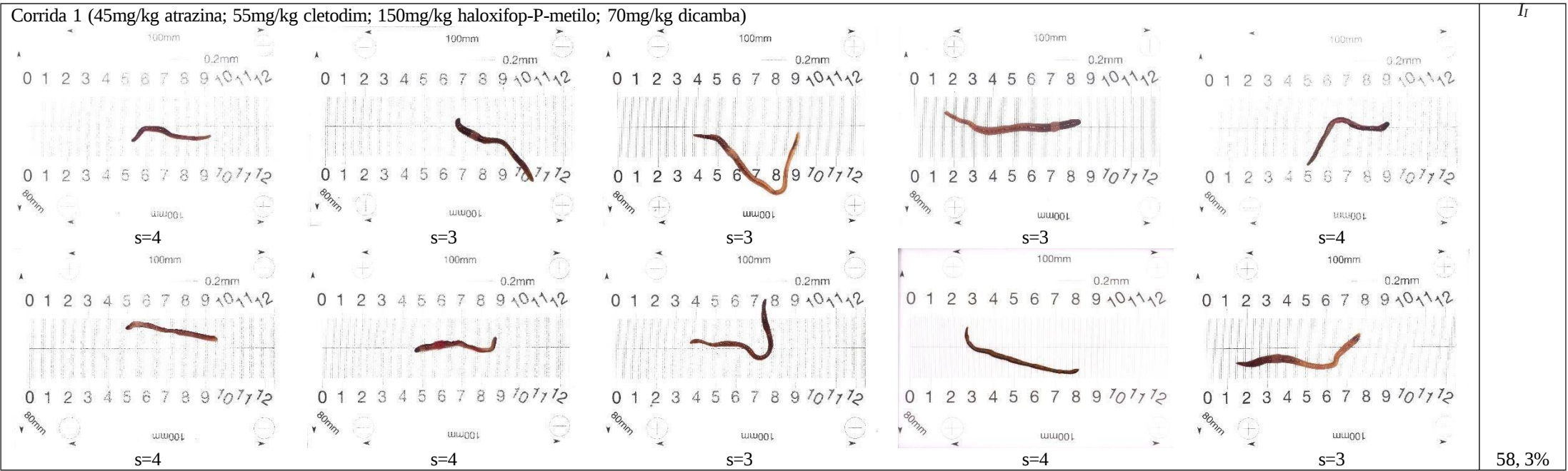
54,2%





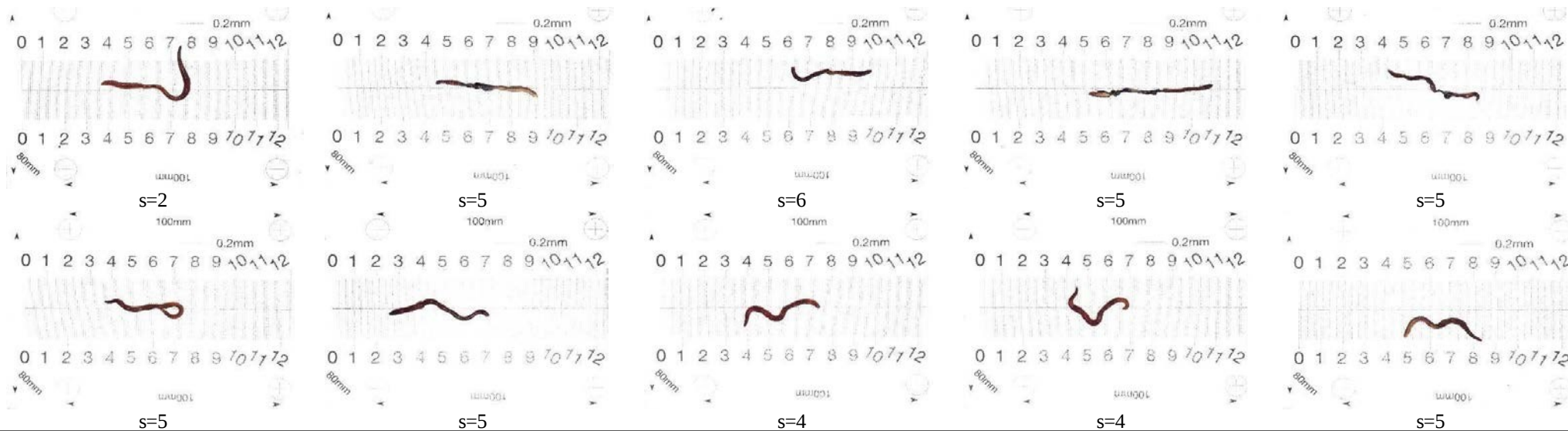
M.3. Experimentos de Superficie de Respuesta

M.3.1. Experimentos con mezclas de herbicidas: Atrazina, Clethodim, Haloxifop-P-metilo y Dicamba



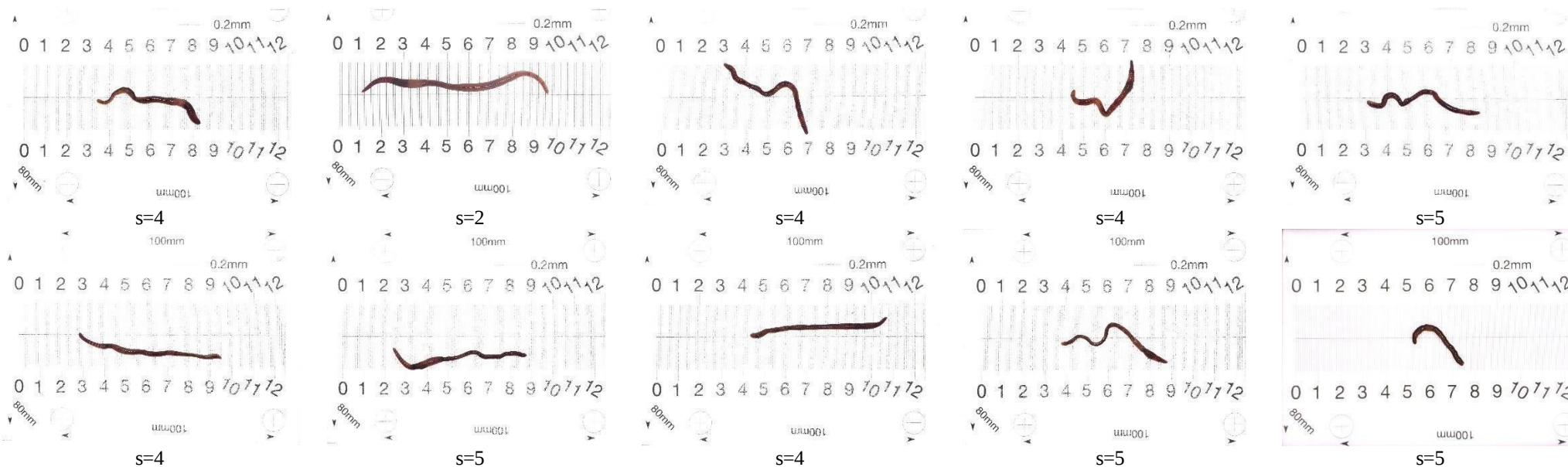
Corrida 2 (45mg/kg atrazina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

I_I



76,7%

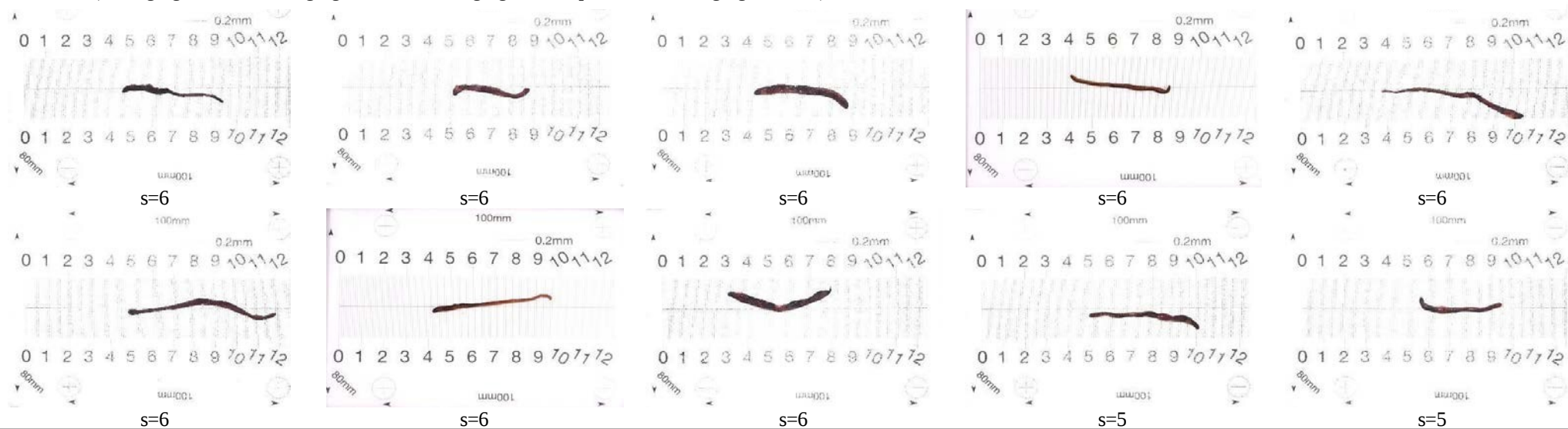
Corrida 3 (135mg/kg atrazina; 55mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)



I_I

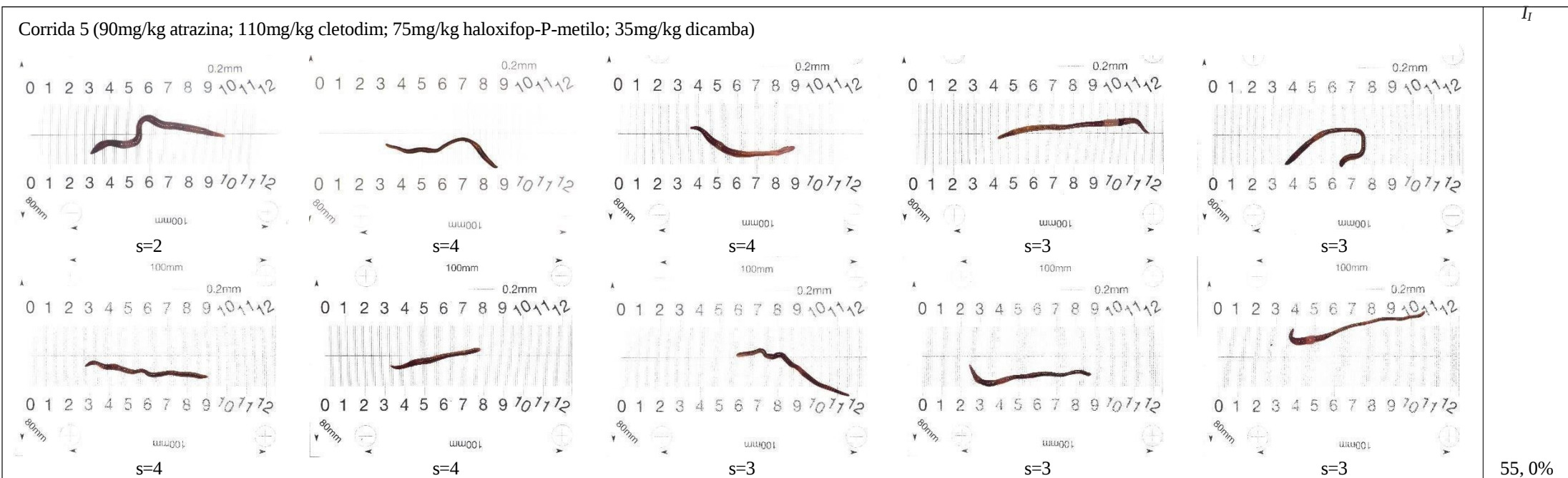
70, 0%

Corrida 4 (135mg/kg atrazina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

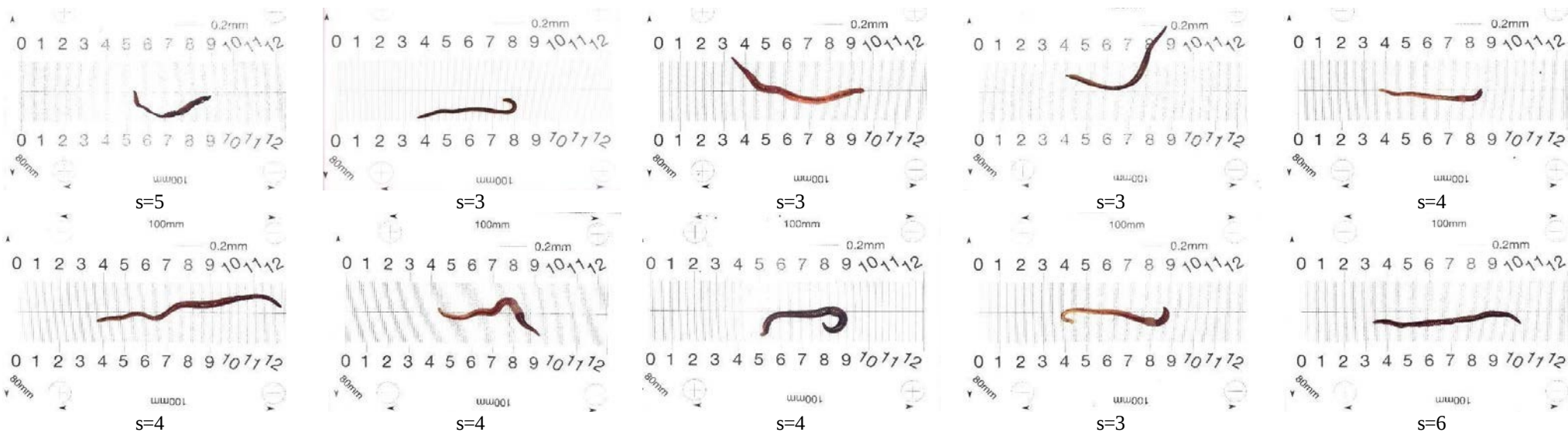


I_I

96,7%

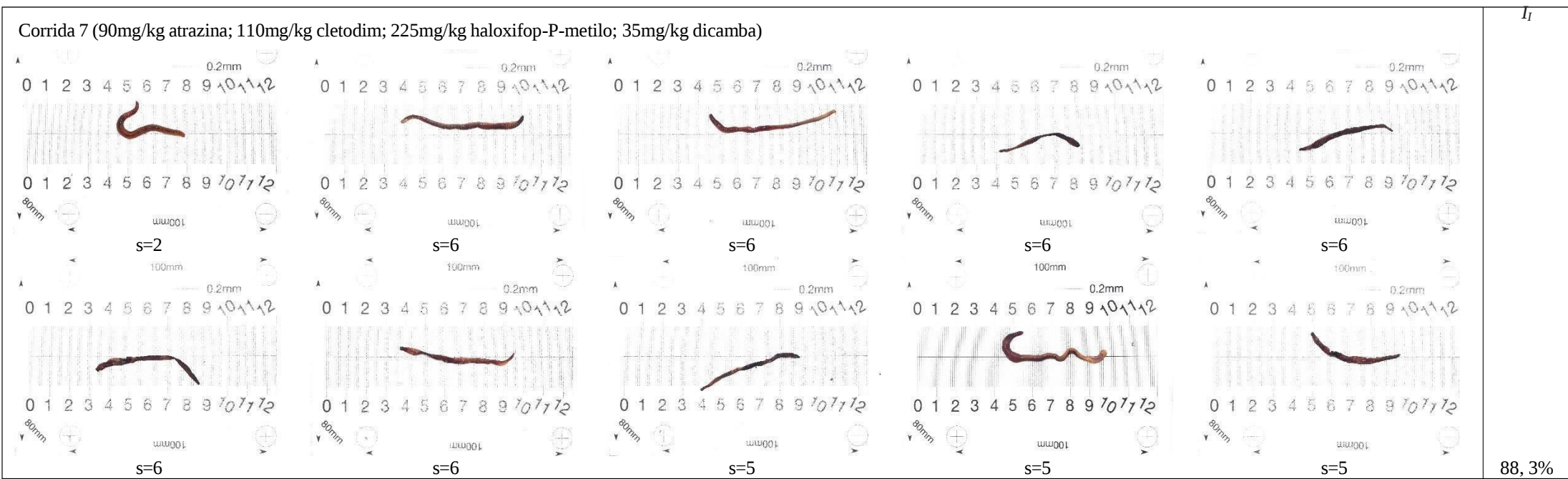


Corrida 6 (90mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 75mg/kg haloxifop-P-metilo; 105mg/kg dicamba)

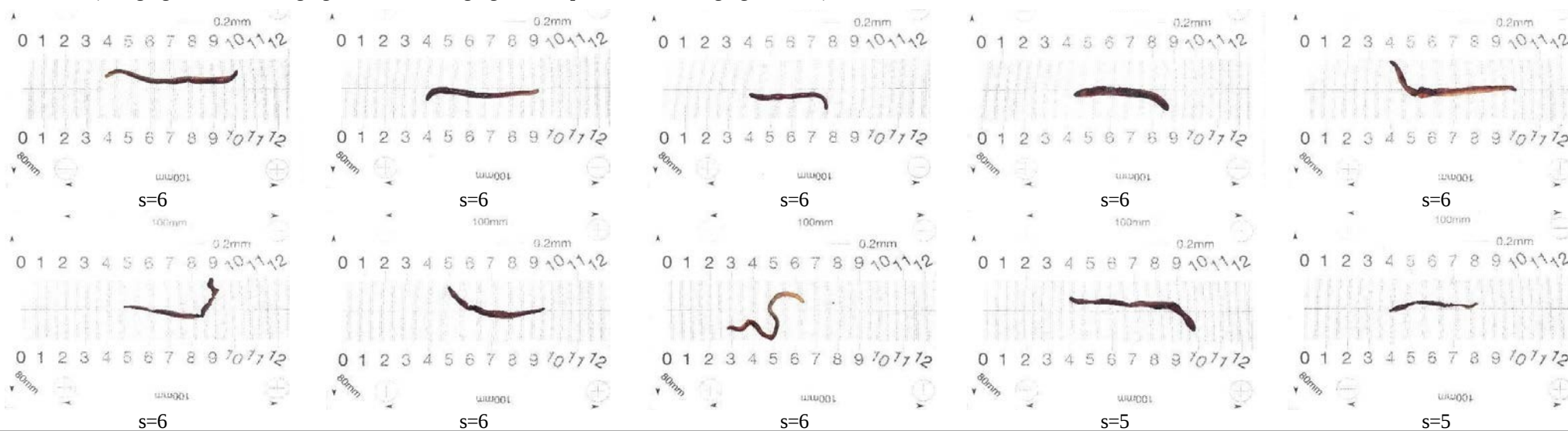


I_I

65,0%

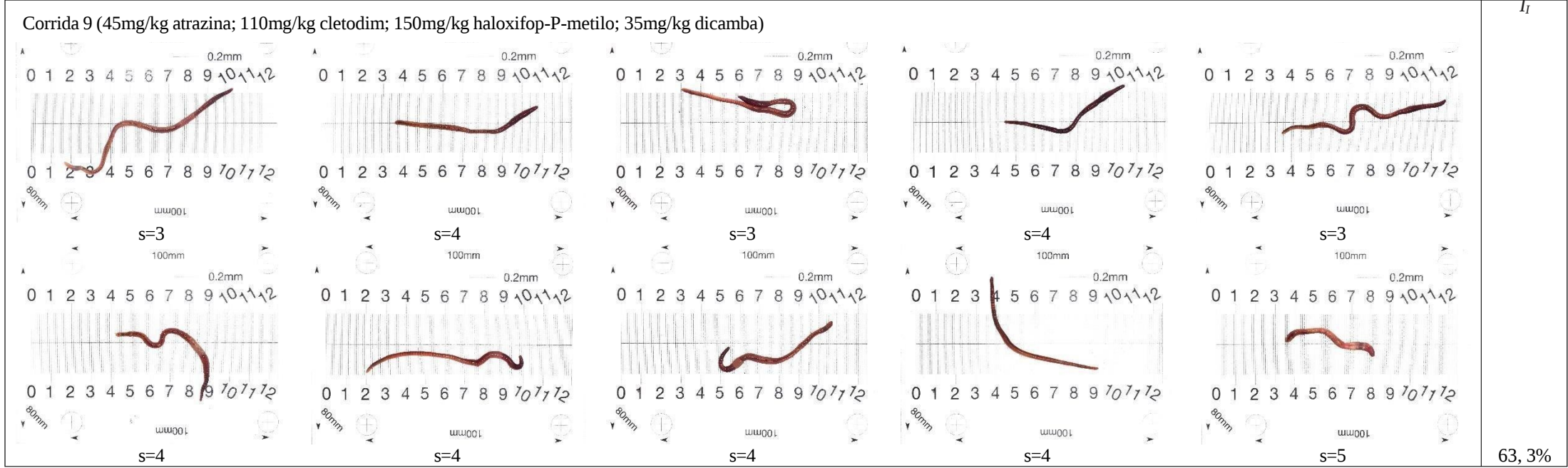


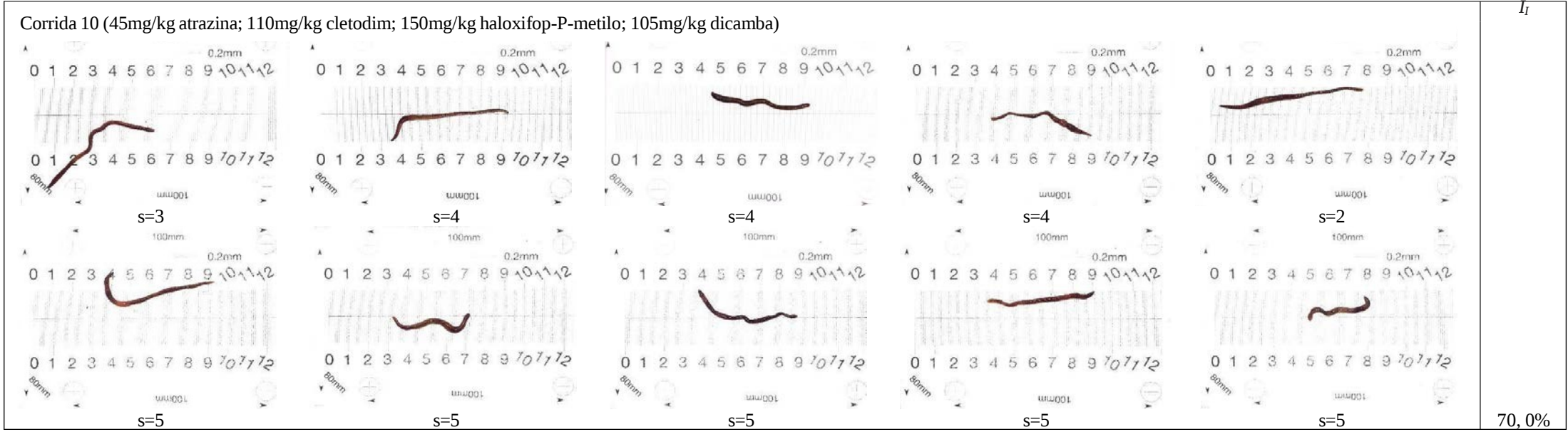
Corrida 8 (90mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 225mg/kg haloxifop-P-metilo; 105mg/kg dicamba)



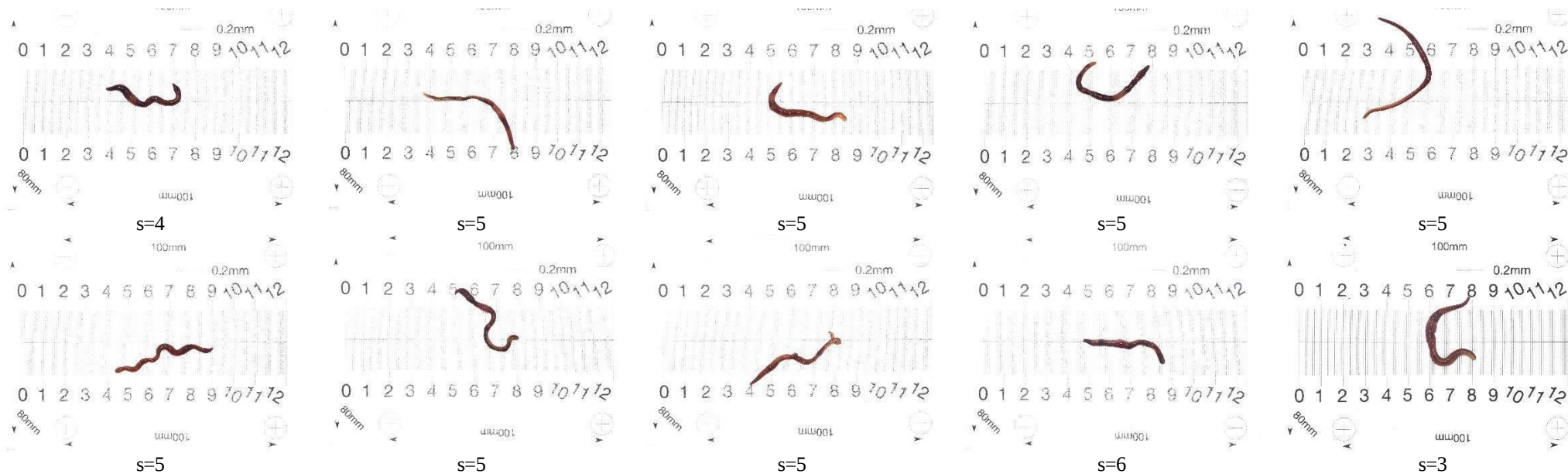
I_I

96, 7%





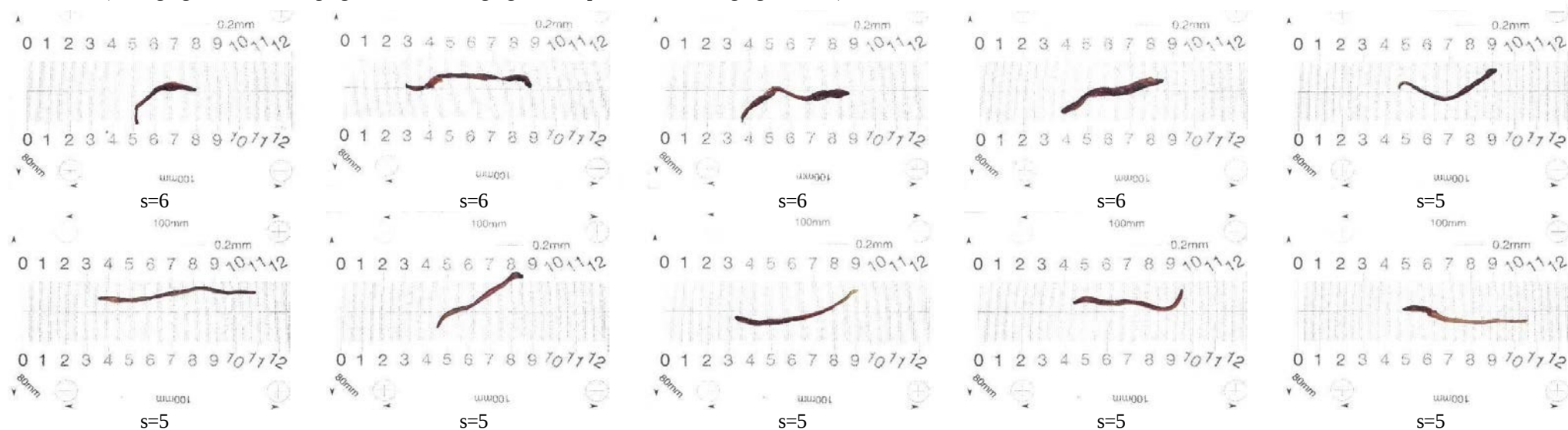
Corrida 11 (135mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 35mg/kg dicamba)



I_1

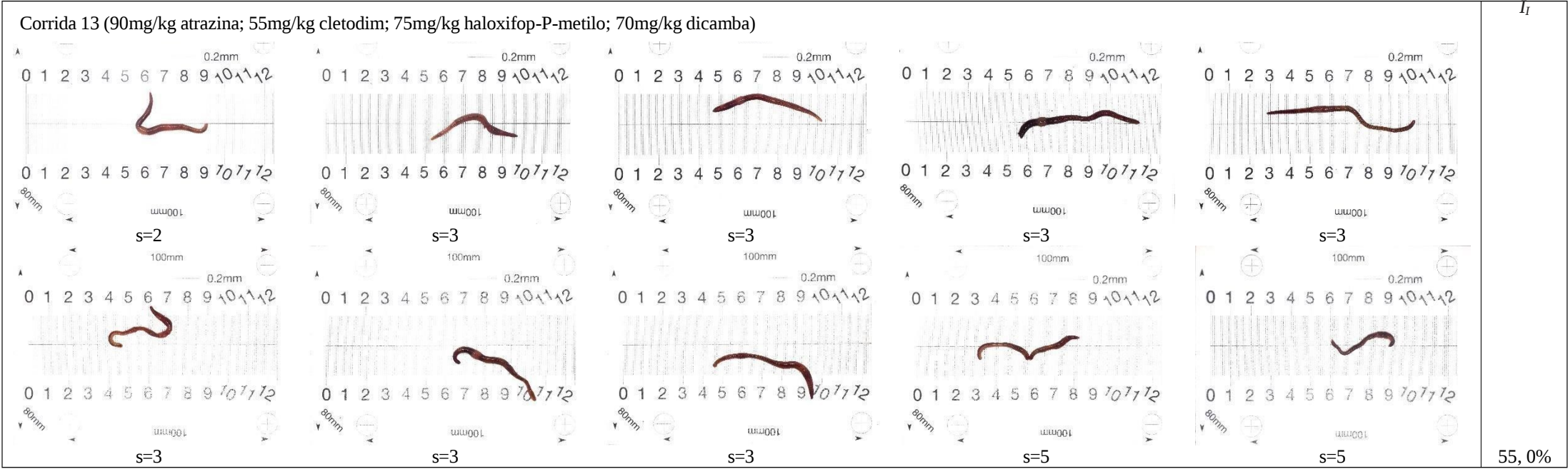
80,0%

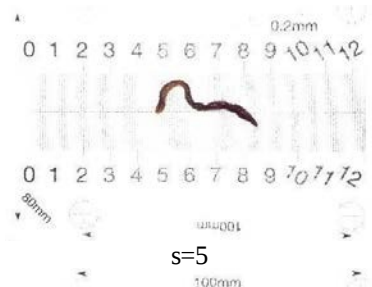
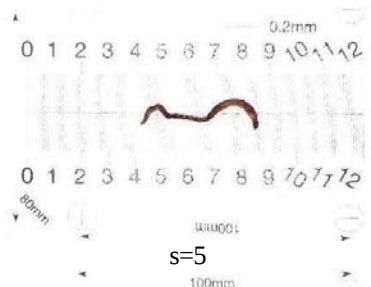
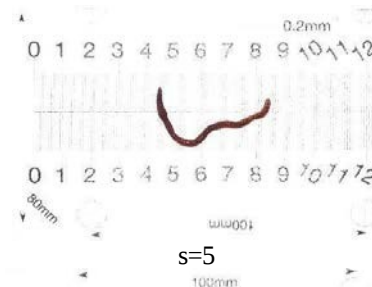
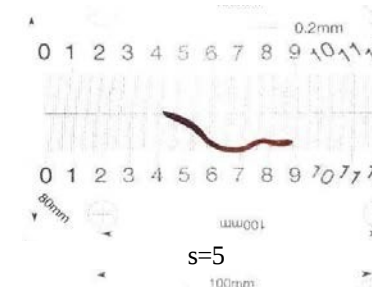
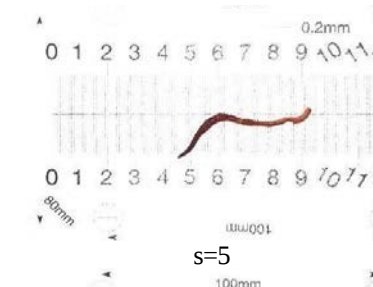
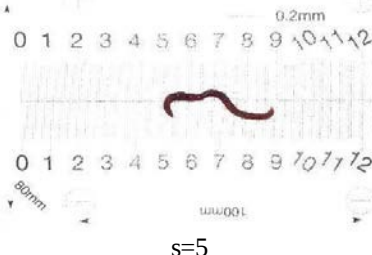
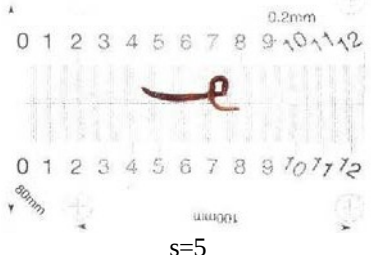
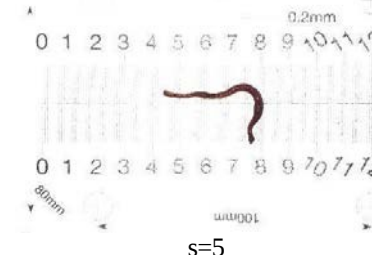
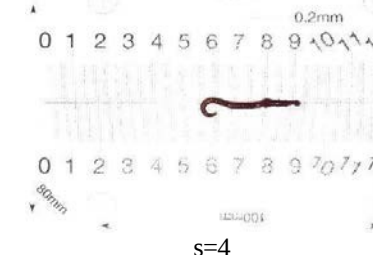
Corrida 12 (135mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 105mg/kg dicamba)

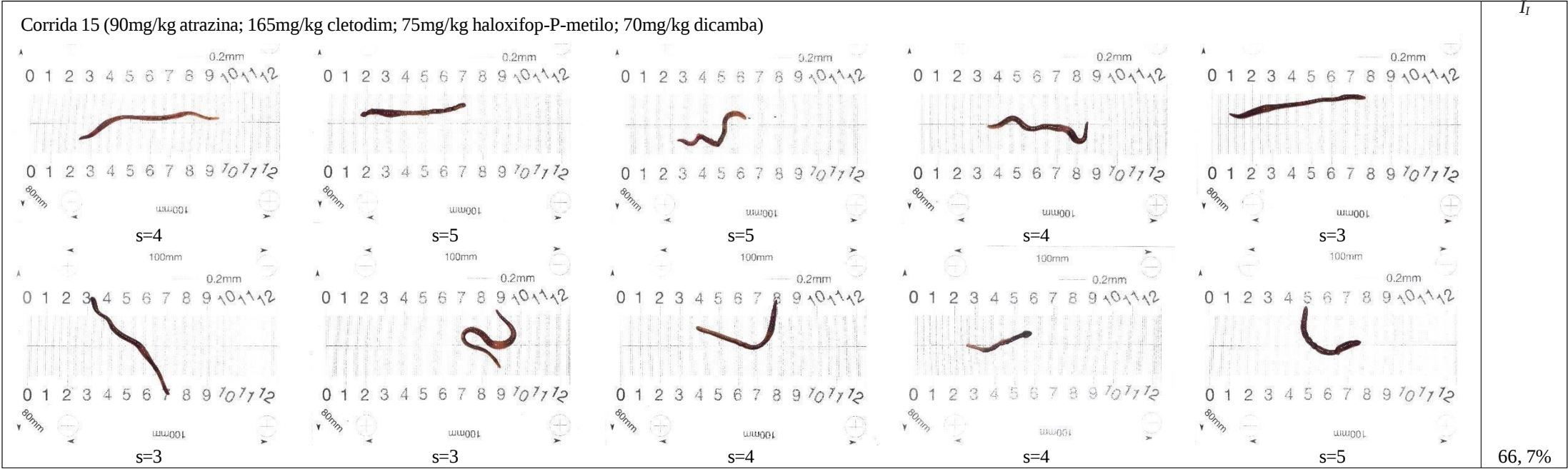


I_I

90,0%

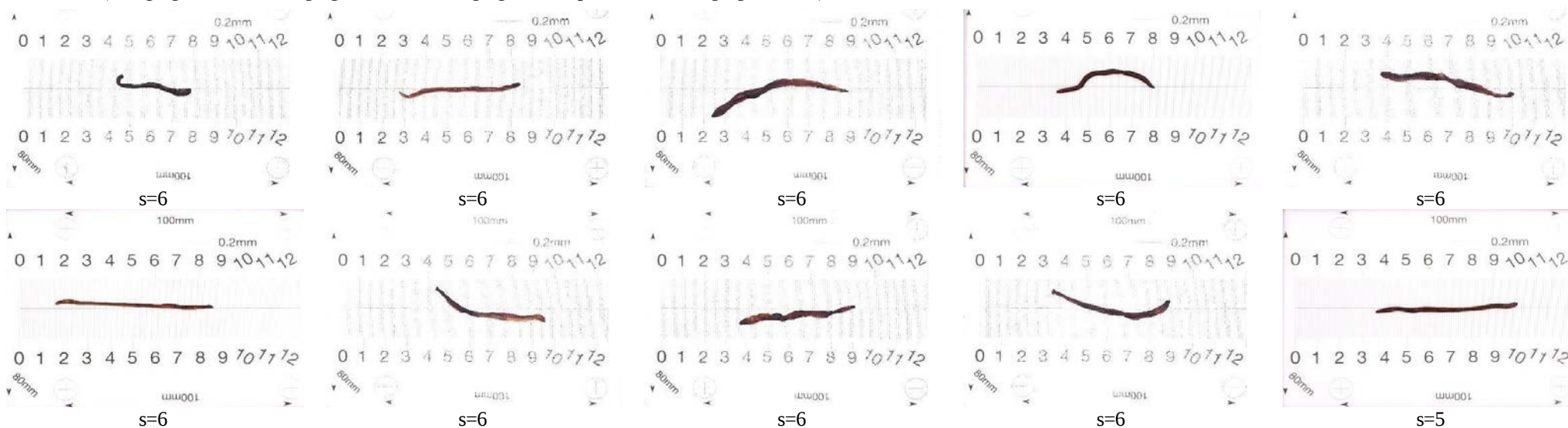


Corrida 14 (90mg/kg atrazina; 55mg/kg cletodim; 225mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)					I_I
 s=5	 s=5	 s=5	 s=5	 s=5	
 s=5	 s=5	 s=5	 s=5	 s=4	81,7%

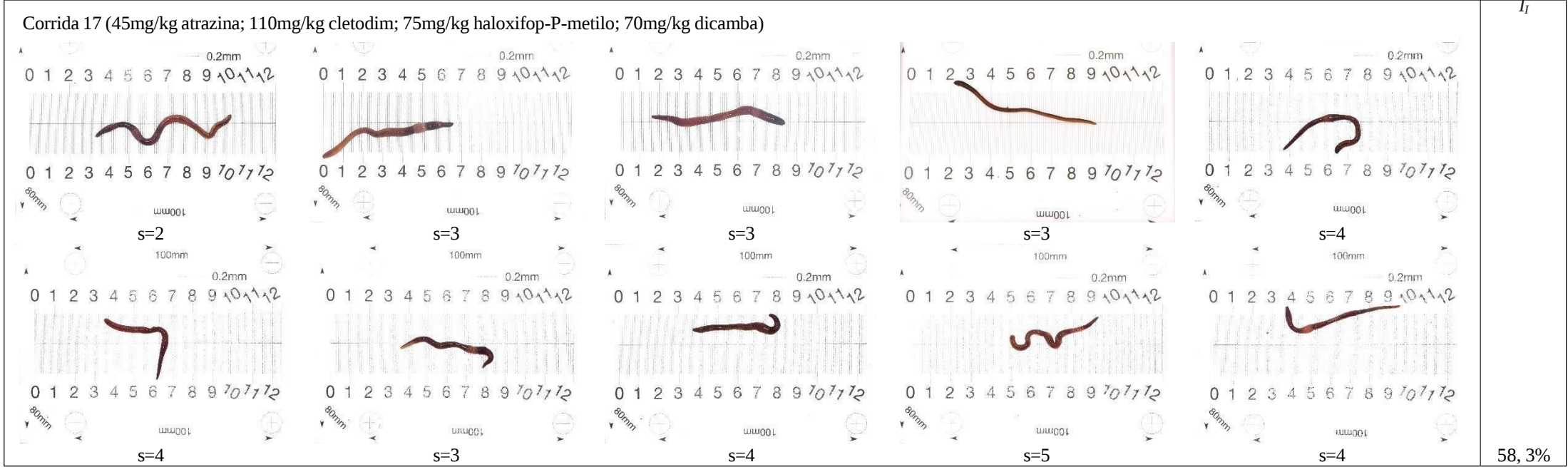


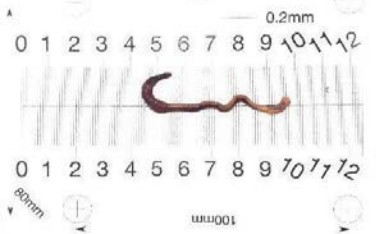
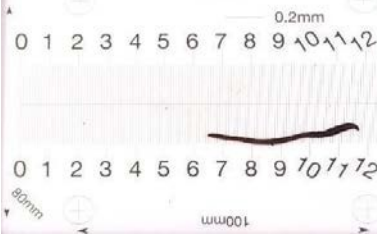
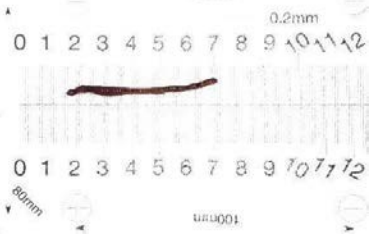
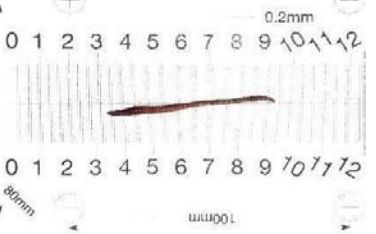
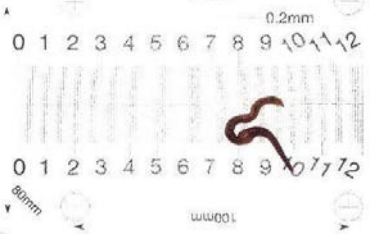
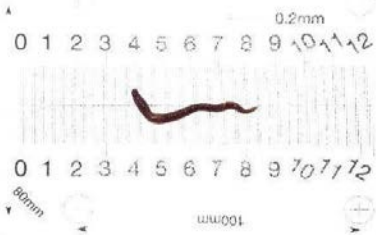
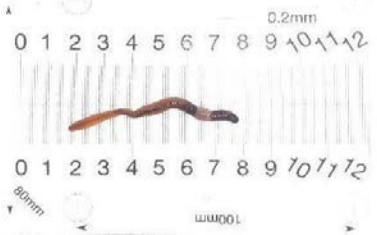
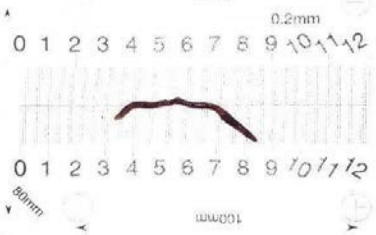
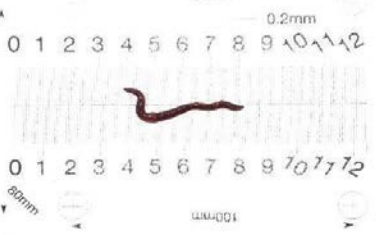
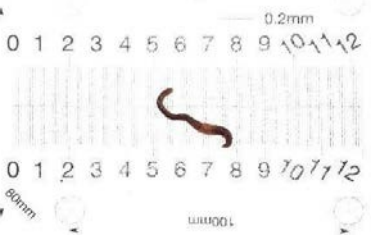
Corrida 16 (90mg/kg atrazina; 165mg/kg cletodim; 225mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

I_I

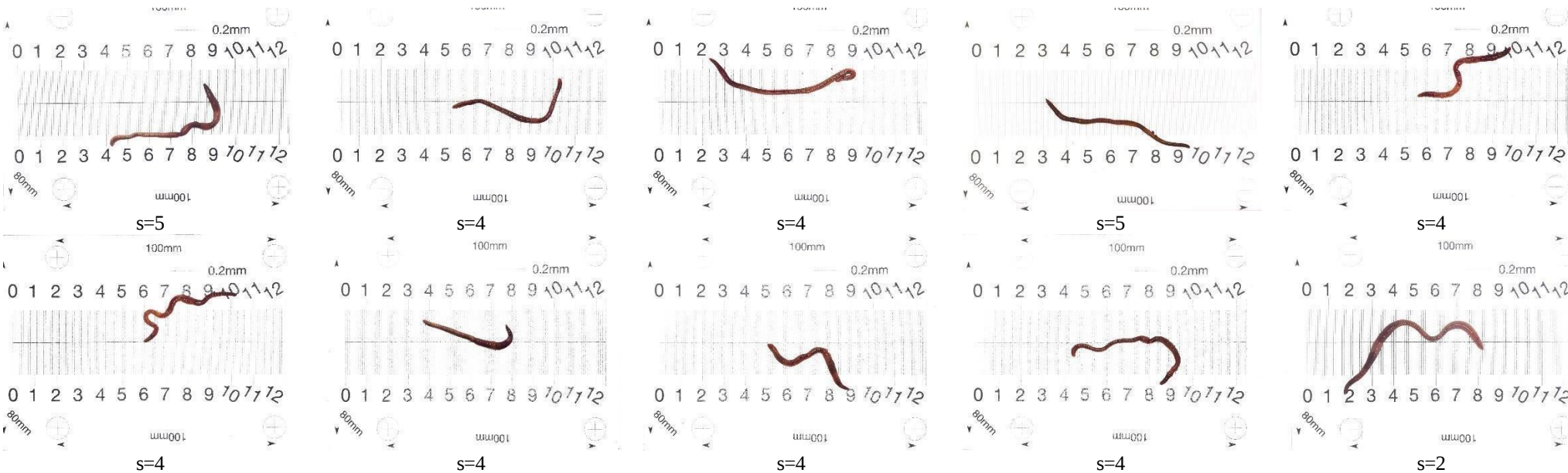


98,3%



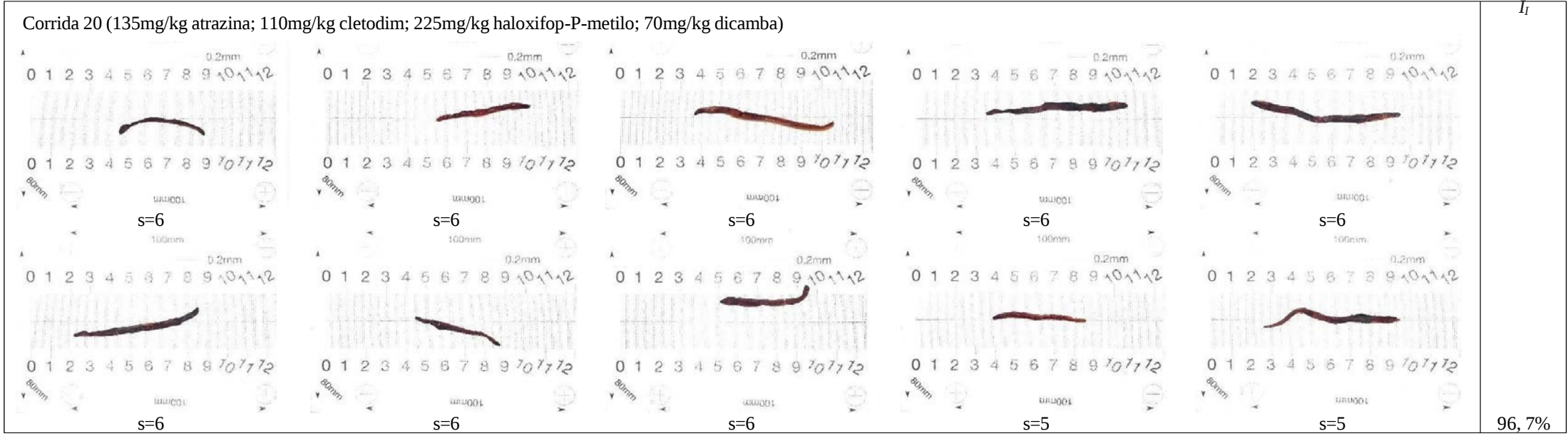
Corrida 18 (45mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 225mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)					I_I
 s=6	 s=5	 s=6	 s=5	 s=5	86, 7%
 s=5	 s=5	 s=5	 s=5	 s=5	

Corrida 19 (135mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 75mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

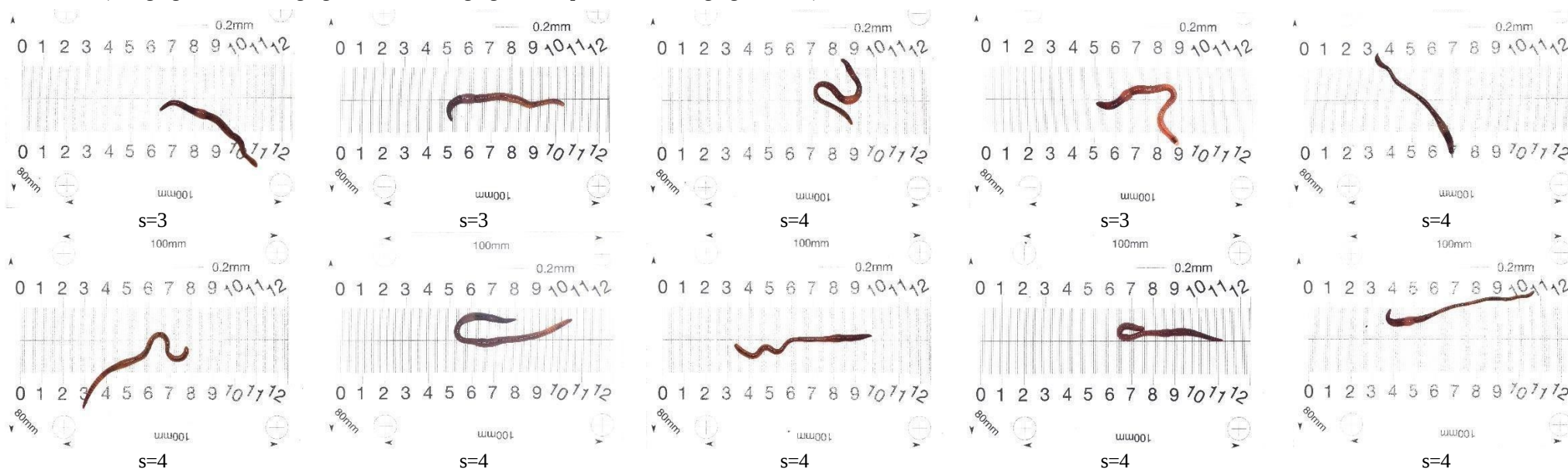


I_I

66, 7%



Corrida 21 (90mg/kg atrazina; 55mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 35mg/kg dicamba)

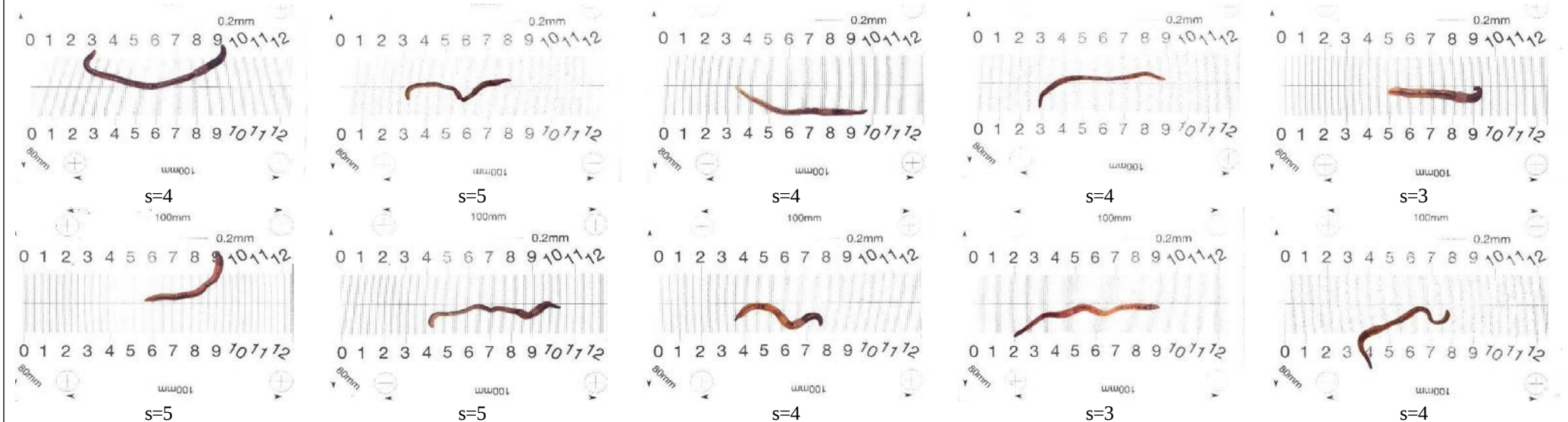


II

61, 7%

Corrida 22 (90mg/kg atrazina; 55mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 105mg/kg dicamba)

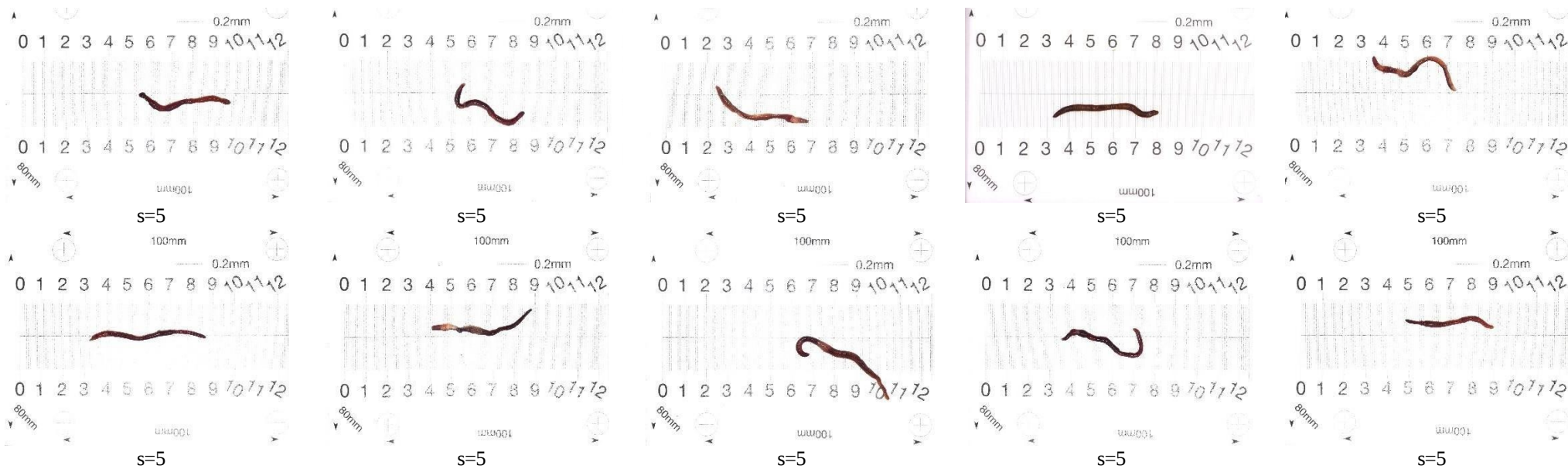
II



68, 3%

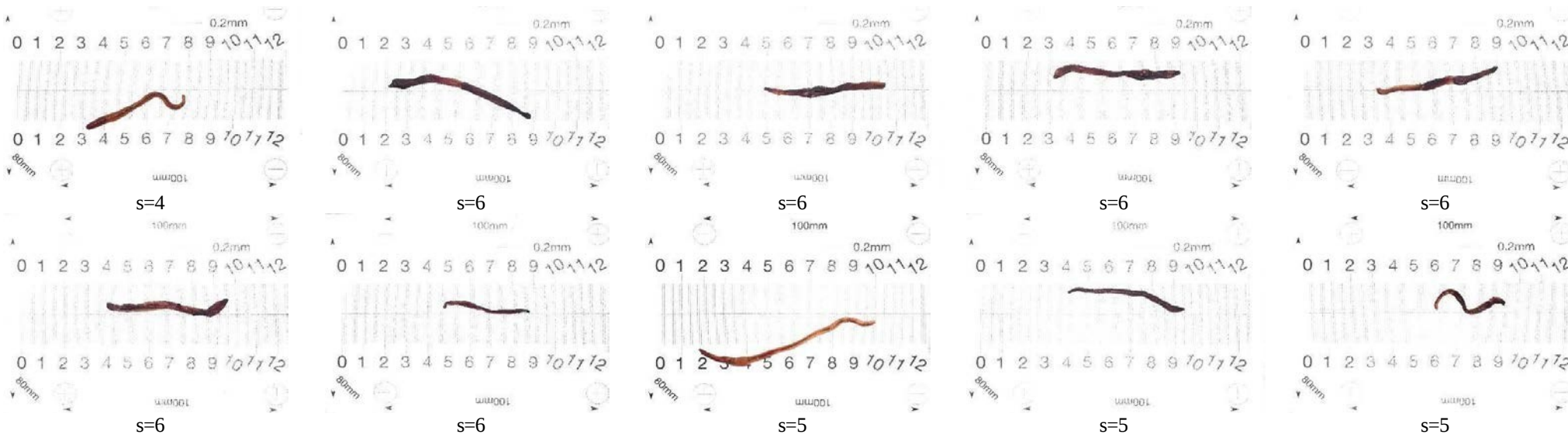
Corrida 23 (90mg/kg atrazina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 35mg/kg dicamba)

II



83, 3%

Corrida 24 (90mg/kg atrazina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 105mg/kg dicamba)

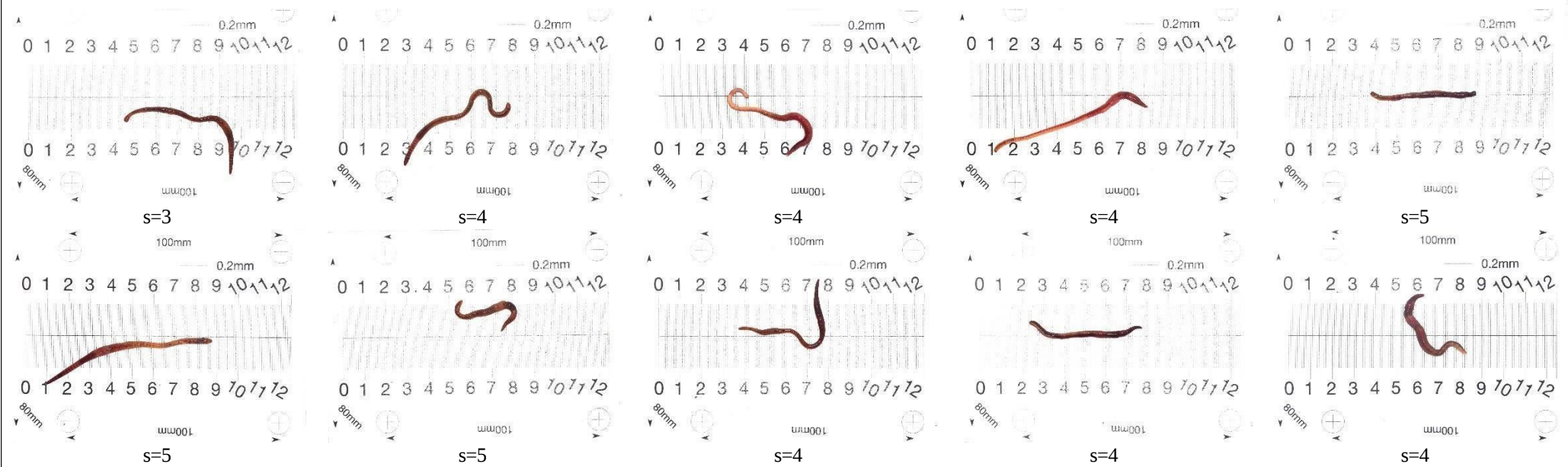


II

91,7%

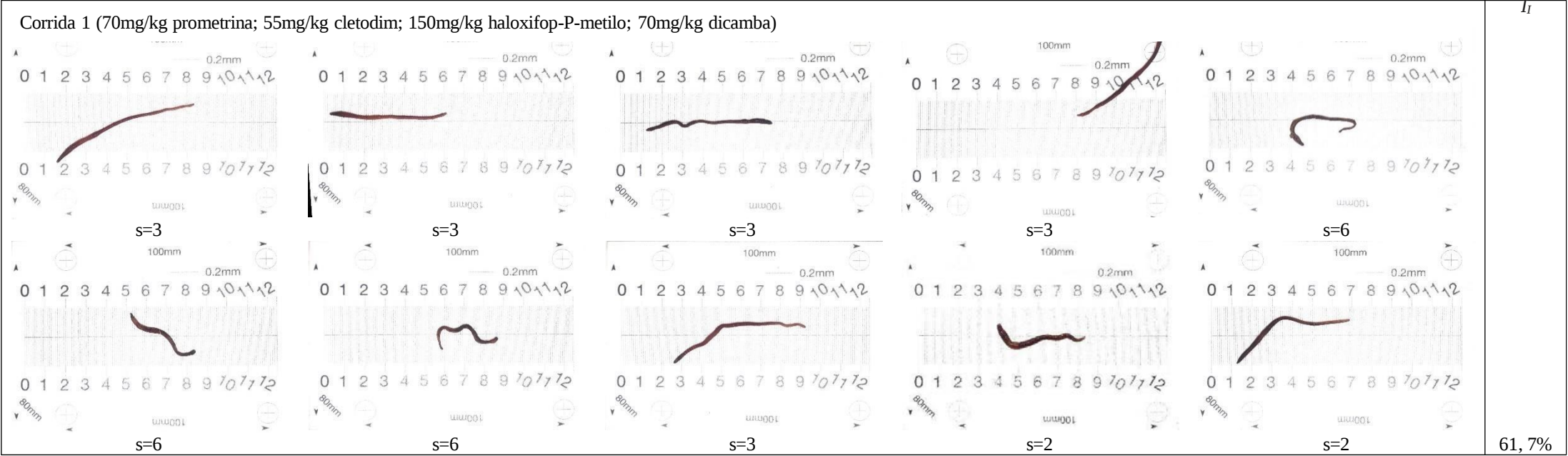
Corrida 25 (90mg/kg atrazina; 110mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

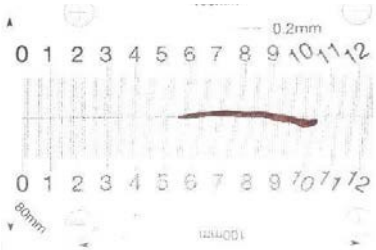
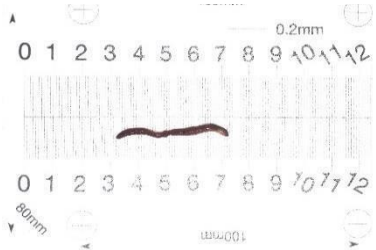
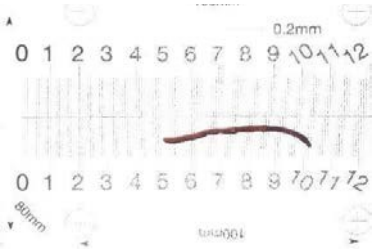
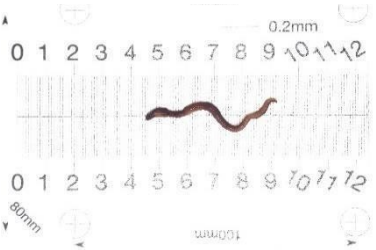
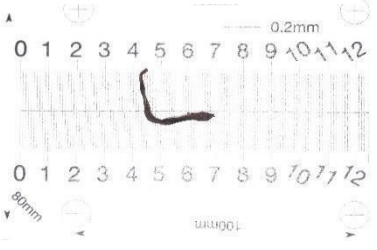
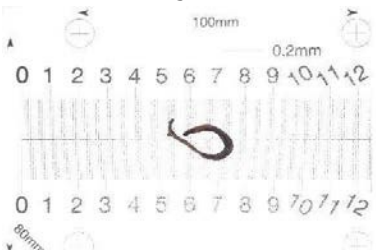
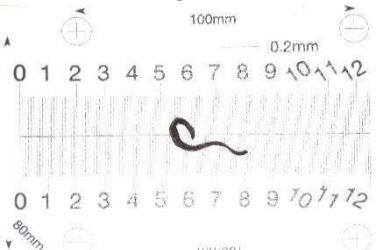
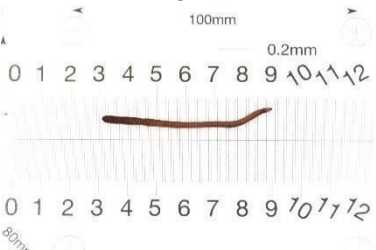
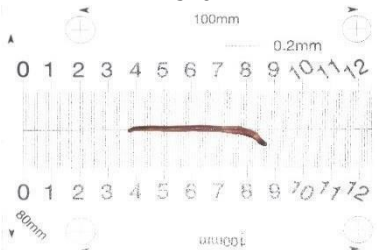
II



70,0%

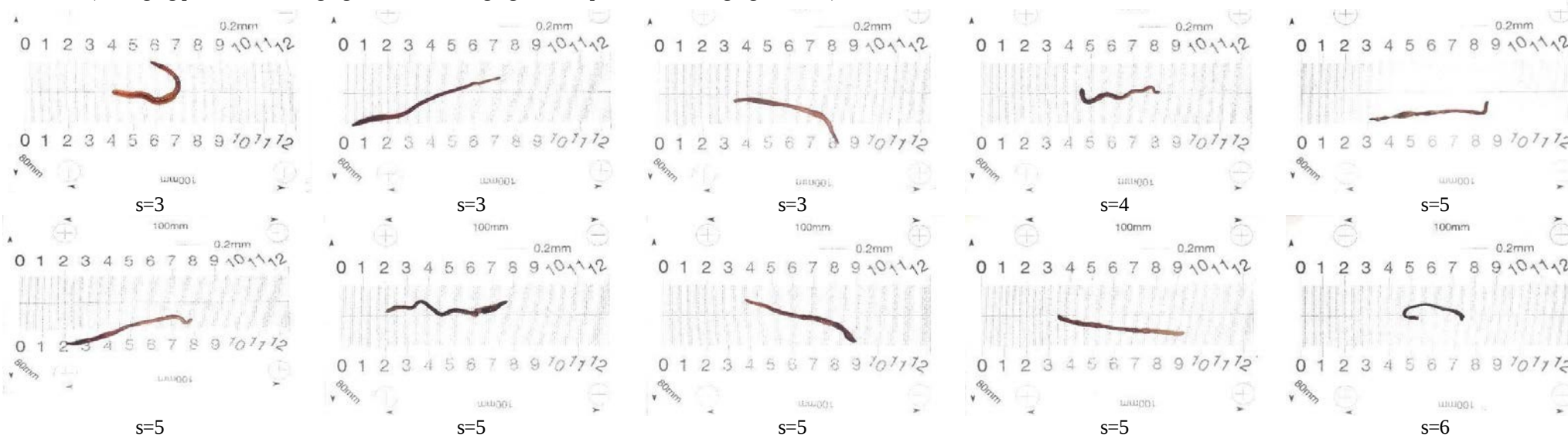
M.3.2 Validación experimental de la prueba mediante la sustitución de atrazina por prometrina



Corrida 2 (70mg/kg prometrina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)										I_I
 s=3	 s=4	 s=4	 s=4	 s=6						
 s=6	 s=6	 s=6	 s=6	 s=3						80,0%

Corrida 3 (225mg/kg prometrina; 55mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

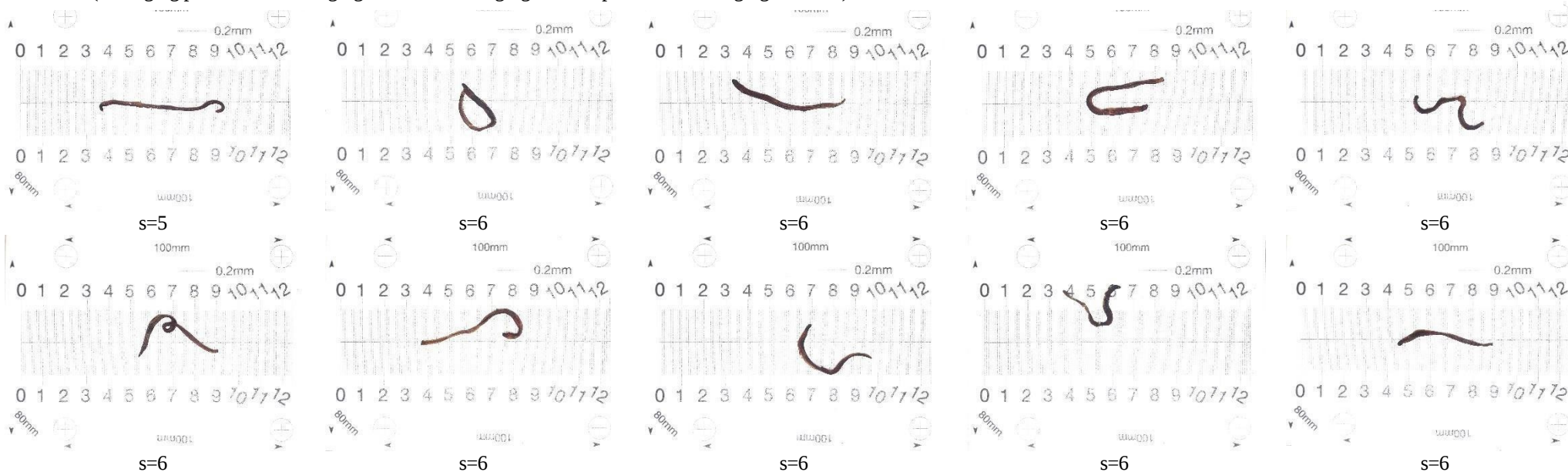
I_I



73,3%

Corrida 4 (225mg/kg prometrina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

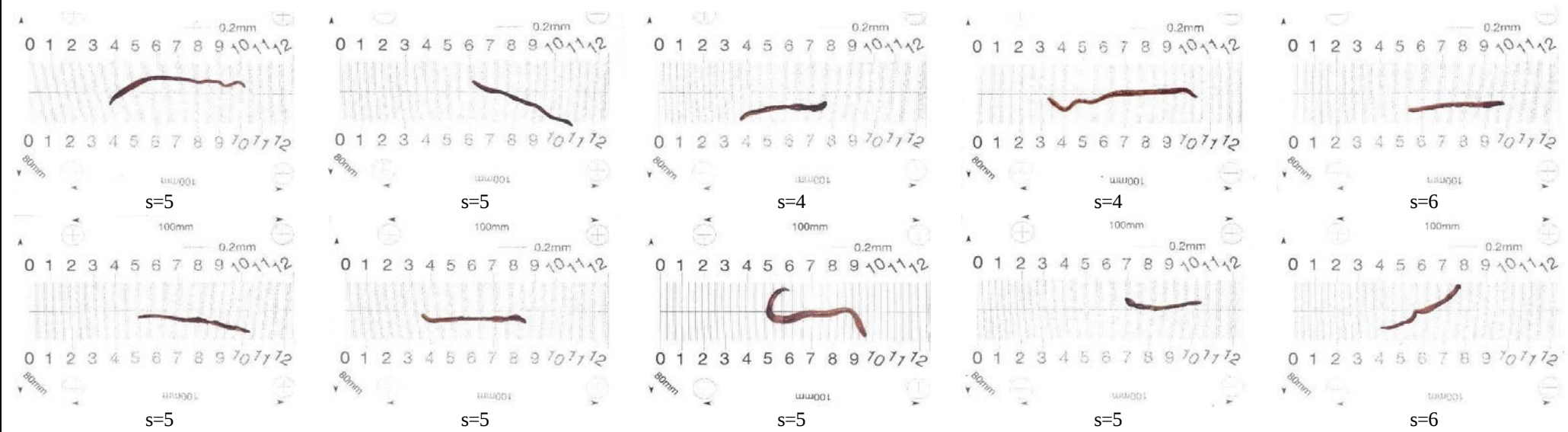
I_I



98,3%

Corrida 5 (150mg/kg prometrina; 165mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 105mg/kg dicamba)

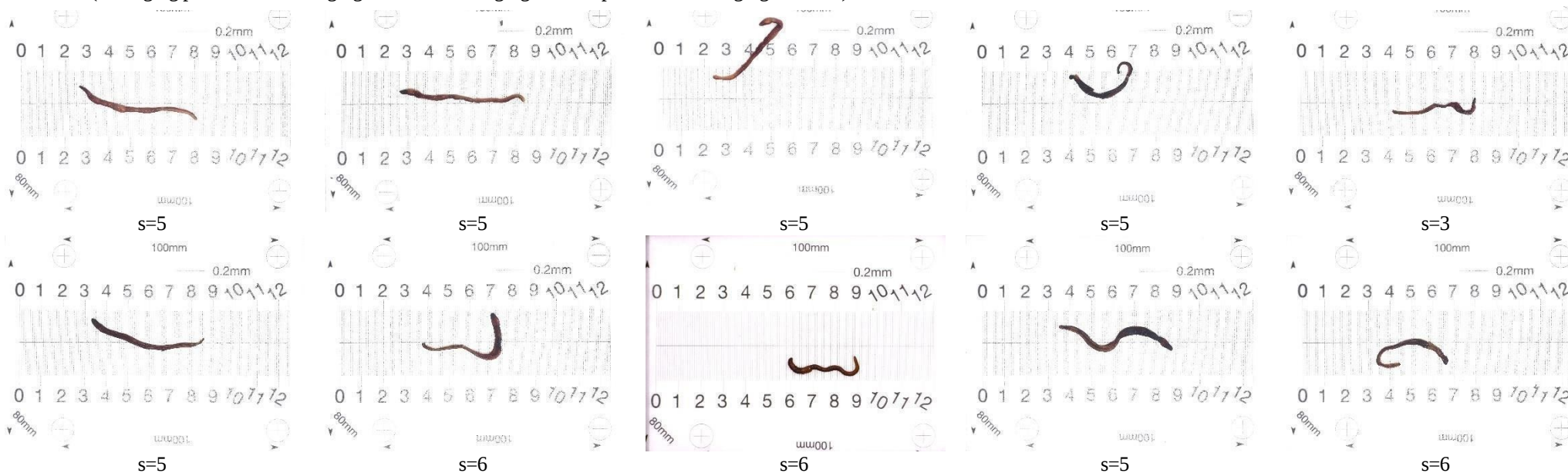
I_I



83, 3%

Corrida 6 (150mg/kg prometrina; 110mg/kg cletodim; 150mg/kg haloxifop-P-metilo; 70mg/kg dicamba)

I_I



85, 0%

M.4. Monitoreo de la degradación de herbicidas en el biolecho.

Día 0										I_I
										
s=5	s=5	s=5	s=5	s=5						
										
s=6	s=6	s=5	s=5	s=6						80,0%

Día 30	I_t
 s=3  s=4  s=3  s=2  s=4  s=2  s=3  s=3  s=4  s=2	56,6%

Día 60

I_I



s=2



s=2



s=3



s=1



s=2



s=3



s=2



s=2



s=3



s=3

41,6%

Día 90					I_t
					
s=1	s=0	s=0	s=2	s=1	
					
s=2	s=3	s=2	s=2	s=2	26,6%

Día 120

I_I



s=0



s=1



s=1



s=1



s=0



s=3



s=3



s=0



s=3



s=2

20%

Día 150

I_I



s=0



s=0



s=0



s=0



s=0



s=0



s=1



s=1



s=0



s=0

11,6%

Día 210					I_t
					6,6%
s=0	s=0	s=0	s=0	s=1	
					
s=0	s=0	s=0	s=0	s=0	