

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Magíster en Salud Ambiental

IMPLEMENTACIÓN DE BIOLECHOS COMO SISTEMAS PARA PREVENIR LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR EL USO DE AGROQUÍMICOS EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA SANTAFESINO

María Luciana Manelli

Directora de Tesis: Dra. Cristina Zalazar
Co-Directora de Tesis: Dra. Maia Lescano

Lugar de realización:
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
INTEC
Universidad Nacional del Litoral- CONICET

-2022-

Índice

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	6
Abreviaturas y símbolos.....	7
Agradecimientos.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	13
1. Introducción.....	16
1.1. La actividad hortícola y el uso de plaguicidas en Argentina.....	16
1.2. La contaminación por plaguicidas: las camas biológicas como buenas prácticas agrícolas.....	21
1.3. Determinaciones de actividad enzimática para seguimiento de la actividad de las Camas Biológicas.....	32
1.4. Uso de Bioensayos para monitoreo de Camas Biológicas.....	33
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivo general.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. Materiales y Métodos.....	37
3.1. Caracterización del área y el módulo rural en estudio.....	37
3.2. Construcción de camas biológicas para una producción hortícola del periurbano santafesino.....	48
3.2.1. Materiales empleados.....	48
3.2.1.1. Compost.....	48
3.2.1.2. Residuo Hortícola.....	52
3.2.1.3. Rastrojo.....	53
3.2.1.4. Suelo.....	53
3.2.2. Diseño de camas biológicas.....	56
3.2.3. Plaguicidas.....	61
3.3. Determinaciones fisicoquímicas, biológicas y bioensayos.....	61
Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA).....	62
3.3.1. Recuento Biológico.....	62
3.3.2. Determinación de Actividad Fenoloxidasas (FOX).....	63
3.3.3. Determinación de Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA).....	64
3.3.4. Bioensayos de toxicidad aguda con semillas.....	64
3.3.5. Bioensayo de Huida.....	65
3.3.6. Análisis de plaguicidas.....	66

3.4. Análisis estadístico de los datos	66
4. Resultados y discusión.....	67
4.1. Relevamiento inicial	67
4.2. Difusión de las actividades realizadas en el predio	68
4.2.1. Jornadas Institucionales en el INTA	68
4.2.2. Taller “Lechos Biológicos en tiempos de COVID-19”	70
4.3. Resultados de los ensayos	71
4.3.1. Análisis de plaguicidas	71
4.3.2. Recuento biológico en sustratos	76
4.3.3. Determinación de Actividad Fenoloxidasa	77
4.3.4. Determinación de Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA)	79
4.3.5. Bioensayos de toxicidad aguda con semillas	81
4.3.6. Bioensayo de Huida	84
5. Discusión integradora de los Resultados Obtenidos.....	88
6. Conclusiones.....	90
7. Referencias Bibliográficas.....	92
8. Anexos.....	102
8.1.1. Bioensayo de conducta llamado de huida o evasión con la lombriz <i>E. fetida</i> , (ISO 2008)	102
8.1.2. Determinación de plaguicidas	102
8.1.3 Desarrollo del método de medición de actividad fenoloxidasas para suelo y biomezclas (Adaptado de Castillo y col. 1994 y Tortella y col., 2012)	106
8.1.4 Desarrollo del método de hidrólisis de fluoresceína diacetato -FDA- (Adaptación de Schnurer y Rosswall, 1982; Adam y Duncan, 2001 para aplicar en suelos y biomezclas)	108

Índice de Figuras

Figura 1: Evolución del uso de plaguicidas (tn) desde 1990 a 2019 en la Argentina	19
Figura 2: Uso de plaguicidas (tn) desde 1990 a 2019 a nivel mundial	19
Figura 3: Uso de plaguicidas (kg) por hectárea de tierras de cultivo	20
Figura 4: Componentes de una cama biológica directa	24
Figura 5: Componentes de una cama biológica directa.	24
Figura 6: Componentes de una cama biológica indirecta	25
Figura 7: Cama biológica indirecta con recirculación	26
Figura 8: Cama biológica indirecta sin recirculación	26
Figura 9: Cama biológica indirecta con recirculación construida en INTEC en el predio del CONICET Santa Fe	27
Figura 10: Una máquina fumigadora estacionada sobre una plataforma impermeable por la que escurre el líquido hacia la cama biológica indirecta	27
Figura 11: Cama biológica indirecta en construcción	28
Figura 12: Cama biológica indirecta experimental	28
Figura 13: Cama biológica indirecta instalada en Brasil	29
Figura 14: Camas biológicas indirectas experimentales instaladas en Brasil	29
Figura 15: (a) Localización del Predio experimental respecto de la ciudad de Santa Fe (b) Paraje de Ángel Gallardo, perteneciente a la Comuna de Monte Vera	35
Figura 16: Vista del Predio experimental INTA Ángel Gallardo	38
Figura 17: Vista del Predio experimental INTA Ángel Gallardo	38
Figura 18: Vista del Predio experimental INTA Ángel Gallardo	38
Figura 19: Entrevistas y charlas con los productores en el predio experimental Ángel Gallardo	43
Figura 20: Acompañamiento de las tareas en el predio experimental Ángel Gallardo	43
Figura 21: Acompañamiento de las tareas en el predio experimental Ángel Gallardo	44
Figura 22: Charla con los productores que además viven en el predio experimental Ángel Gallardo	44
Figura 23: Colecta de envases con restos de plaguicidas junto a los productores	45
Figura 24: Contenedores identificados para recolectar los restos de plaguicidas preparados y no utilizados.	46
Figura 25: Estado inicial del sector de acopio de plaguicidas	47

Figura 26: Mejoras en el orden de la sala de guardado de plaguicidas	47
Figura 27: Mejoras en el almacenamiento de los plaguicidas.	46
Figura 28: Colecta de residuo hortícola en un lote atacado por un hongo, sin posibilidades de comercialización. Mayo 2019	48
Figura 29: Armado de las bandejas para compostar con la Dra. Masin. Mayo 2019	49
Figura 30: Bandejas del material compostando en las instalaciones del INTEC	50
Figura 31: Control de temperatura y humedad del compost ya madurado. Mayo 2019	50
Figura 32: Evolución de la temperatura (°C) en el sustrato mezcla durante el período de compostaje. Las flechas negras indican los volteos.	49
Figura 33: Registro del pH en el sustrato mezcla durante el período de compostaje.	50
Figura 34: Secado de residuo hortícola (lechuga). Mayo 2019	52
Figura 35: Rastrojo de Maíz	53
Figura 36: Colecta de suelo de un lote activo. Septiembre 2019	54
Figura 37: Camas biológicas y blancos instalados en el predio	57
Figura 38: Disposición de los materiales para la construcción	59
Figura 39: Etiquetado de las camas biológicas y sus blancos	59
Figura 40: Disposición de grava gruesa sobre la base	59
Figura 41: Cubierta de arena	60
Figura 42: Mezcla proporcional de los componentes	60
Figura 43: Riego para llevar la humedad al 80%	60
Figura 44: Funcionamiento de la cobertura de uno de los blancos después de una lluvia	61
Figura 45: Recuento de levaduras y hongos presentes en las camas biológicas	63
Figura 46: Hongo blanco encontrado en el sustrato el día 0	63
Figura 47: Secuencia del ensayo de germinación	65
Figura 48: Secuencia de la realización del Test de Huida	66
Figura 49: Jornada interna de capacitación en el Centro Operativo Ángel Gallardo	68
Figura 50: Imágenes de la difusión institucional del proyecto por el INTA	69
Figura 51: Imagen de difusión de la actividad mencionada	70
Figura 52: Miniatura del e-poster presentado	71
Figura 53: Detalle de una de las muestras al ser extraídas de la cama biológica	72
Figura 54: Concentración de plaguicidas en los días 0 y 120 en CBI	73
Figura 55: Concentración de plaguicidas en los días 0 y 120 en CBII	74
Figura 56: Evolución de la FOX durante los días de muestreo	78
Figura 57: Evolución de la FDA durante los días de muestreo	80

Figura 58: Evolución del porcentaje de Germinación G% durante los días de muestreo	81
Figura 59: Evolución de la Inhibición de la Elongación de la Raíz durante los días de muestreo	83
Figura 60: Evolución de la elongación radicular durante los días de muestreo	83

Índice de Tablas

Tabla 1: Materiales agrícolas compostados utilizados como reemplazo de la turba	31
Tabla 2: Evolución en el Centro Operativo Experimental de Ángel Gallardo	39
Tabla 3: Plaguicidas utilizados en el predio del INTA	41
Tabla 4: Propiedades de los plaguicidas analizados	42
Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas del compost utilizado	
Tabla 6: Características del suelo. Serie Ascochinga (ASC) - Datos analíticos	55
Tabla 7: Propiedades fisicoquímicas de materiales utilizados en las biomezclas.	¡Error!
Marcador no definido.	
Tabla 8: Composición de las camas biológicas	57
Tabla 9: Ensayos planificados y realizados sobre las camas biológicas	62
Tabla 10: Ensayo sobre la muestra líquida	72
Tabla 11: Ensayos sobre muestras sólidas de la Cama Biológica I	73
Tabla 12: Ensayos sobre muestras sólidas de la Cama Biológica II	74
Tabla 13: Recuento de hongos y levaduras y bacterias mesófilas totales	76
Tabla 14: Estadísticos para hongos, levaduras y bacterias mesófilas totales	77
Tabla 15: Evaluación de la elongación de la raíz.	82
Tabla 16: Evaluación de la Cama Biológica I vs Suelo de Referencia día 90	85
Tabla 17: Testeo de Cama Biológica II vs Suelo de Referencia día 90	85
Tabla 18: Testeo de Cama Biológica I vs Suelo de Referencia día 120	86
Tabla 19: Testeo de Cama Biológica II vs Suelo de Referencia día 120	86

Abreviaturas y símbolos

BPA *Buenas Prácticas Agrícolas*

BPS *Sistemas de Biopurificación*

CASAFE *Cámara de Sanidad de Agropecuaria y de Fertilizantes*

CB *Camas Biológicas*

CENUR *Centro Universitario Regional Norte de la Universidad de la República*

CEPA *The Canadian Environmental Protection Act*

CHF *Censo Horti Florícola*

CONICET *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*

E *Elongación radicular*

ELr *Inhibición de la elongación de la raíz*

EPA *United States Environmental Protection Agency*

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

FAOSTAT *División de Estadística de la FAO*

FBCB *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*

FDA *Diacetato de Fluoresceína*

FIQ *Facultad de Ingeniería Química*

GACT *Grupo de Análisis de Compuestos Traza*

GEF *Global Environmental Facility*

IDRC *International Development Research Centre*

IMTA *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*

IRAM *Instituto Argentino de Normalización y Certificación*

INTEC *Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química*

INTA *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*

ISO *Organización Internacional de Normalización*

Lac *Actividad Lacasa*

Lip *Lignina Peroxidasa*

MA *Ministerio de Ambiente del Uruguay*

MGAP *Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay*

MSP *Ministerio de Salud Pública del Uruguay*

OECD *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos*

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

RALACA Red Latinoamericana de Lechos Biológicos y la Red Analítica de Latino América y el Caribe

SENASA Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SM Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater

TCP 3,5,6-tricloro-piridinol

UFC Unidades Formadoras de Colonias

UNL Universidad Nacional del Litoral

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera visto la luz, ni el ocaso, ni la lluvia ni la noche y demás estadios climáticos que atravesó, de no haber sido por el acompañamiento constante de mi directora Dra. Cristina Zalazar y mi Co Directora Dra. Maia Lescano. Gracias por la confianza y el afecto.

Gracias a Manuela Garibaldi, compañera de aventuras en todas las curvas y cuestas de este camino, siempre dispuesta a cargar una bolsa de achicoria más.

Gracias a todo el personal del INTEC, especialmente a Carolina Masin, quienes me recibieron en cada laboratorio con generosidad y alegría.

Gracias al personal del INTA Ángel Gallardo que nos abrió las puertas de la institución sin miramientos, especialmente a Ariel Belavi, Jorge Pane y Mariano Gatti.

Gracias a Néstor, Palito, Patroncho, Joaquín y Florindo por su trabajo silencioso que nos alimenta cotidianamente y por dejarme conocerlos, interrogarlos, seguirlos y aprender de ustedes.

Gracias a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por permitirme transitar este camino con excelentes compañeras y profesionales comprometidos en su quehacer.

Gracias a mi mamá, a mi familia, amigos y a mi compañero por estar siempre a disposición para contener, cebar mates, escuchar resultados, buscar rastrojo y creer firmemente en mi obstinada determinación de transformar -un poquito- el mundo.

Resumen

En la actualidad la contaminación por plaguicidas es uno de los problemas ambientales más importantes y relevantes que enfrentan diferentes países. La misma puede ser originada mediante fuentes puntuales o difusas, las cuales muchas veces no están claramente diferenciadas. Los residuos de los plaguicidas se dispersan en el ambiente y se convierten en contaminantes para el suelo, aire y agua, lo que representa un gran riesgo para la salud de la población y el ambiente.

Los Biolechos o Camas Biológicas (CB) son sistemas de biorremediación desarrolladas con el fin de aportar a la gestión responsable del uso de plaguicidas. Están constituidas por un receptáculo o depósito impermeabilizado, que contiene una biomezcla activa compuesta por suelo, material lignocelulósico y un sustrato orgánico humidificado. La finalidad de esta tecnología es que la manipulación de los plaguicidas durante el llenado del equipo de aspersión sea realizada sobre la cama, de manera que los plaguicidas derramados puedan ser retenidos y degradados dentro del biosistema. Si bien son sistemas muy estudiados y aplicados en Europa, en Latinoamérica su desarrollo es incipiente.

El objetivo principal del presente trabajo de tesis fue el diseño, construcción e implementación de camas biológicas a escala mediana como sistemas de tratamiento de las corrientes residuales de plaguicidas generadas en un predio del cinturón hortícola santafesino.

Para la realización del presente trabajo se diseñaron dos tipos de camas biológicas (CBI y CBII) de diferente composición utilizando contenedores de 200 litros sin recirculación. Además, se utilizaron dos contenedores más pequeños que funcionaron como blancos (sin aplicación de plaguicidas).

La composición de la CBI fue del 25% de compost (obtenido a partir de cama de pollo y residuo hortícola), 25% de suelo, 15% de residuo hortícola y 35% de rastrojo de maíz mientras que la CBII estuvo compuesta por 50% de suelo, 15% de residuo hortícola y 35% de rastrojo de maíz. Estas camas biológicas fueron maduradas por 70 días manteniendo la humedad adecuada. Posteriormente, se regaron con la solución colectada de las mochilas de aplicación que utilizan los productores en el predio productivo. Los plaguicidas encontrados en la solución fueron: λ cialotrina, azoxistrobina, carbendazim, imidacloprid, metaloclor, tebuconazole y abamectin B1a. El ensayo se extendió por 120 días y se realizaron las siguientes determinaciones: análisis

de plaguicidas al inicio y al final, determinaciones enzimáticas (hidrólisis de la Fluoresceína Diacetato (FDA) y actividad fenoloxidasa (FOX)), ensayos de germinación con semillas de lechuga y prueba de huida o de evasión con lombrices. Además, se realizaron recuentos de bacterias totales y de hongos y levaduras antes y después de la aplicación de la solución de plaguicidas.

En ambas camas biológicas se obtuvieron buenos porcentajes de degradación. Particularmente, en la CBI se obtuvo una degradación superior al 70% para los siete plaguicidas analizados, superior al 80% en el caso del abamectin B1a y al 90% para el carbendazim. No es posible realizar una comparación del desempeño de ambas camas ya que las concentraciones iniciales (luego de la aplicación) fueron muy diferentes. La CBII presentó concentraciones de plaguicidas aproximadamente un 30 % más bajas que las halladas en la CBI, a pesar de haber aplicado el mismo volumen de la solución colectada de las mochilas. Esta diferencia podría deberse a los caminos preferenciales por los que hayan discurrido los plaguicidas aplicados, a las diferencias entre las densidades de los sustratos, entre otras.

En cuanto a la actividad enzimática debida a enzimas hidrolíticas (FDA) en ambas camas biológicas para el día 120 se observó una disminución significativa de la actividad respecto del inicio. Sin embargo, en las enzimas de origen lignocelulósico la disminución no fue tan marcada y los valores obtenidos al final del ensayo indican que las camas biológicas se encontraban activas y podrían ser utilizadas para una nueva aplicación de plaguicidas.

Tanto los bioensayos de germinación como el de huida coinciden en evidenciar una “recuperación” de la calidad llegando al día 120 del ensayo lo que muestra una buena calidad de las biomezclas para su re utilización y/o incorporación al medio como abono o enmienda.

Las camas biológicas ensayadas resultaron ser eficientes para la descontaminación de las corrientes residuales de plaguicidas generadas en el predio. La CBI presentó mayor dificultad en su construcción, por el tiempo que insumió la preparación del compost adicionado. Si bien la biomezcla tuvo una buena estructura, el contenido de humedad presentó las mismas variaciones que la CBII, es decir, la retención de humedad fue similar.

Se destaca especialmente el alto porcentaje de degradación obtenido para el imidacloprid en comparación con trabajos previos publicados en los que se reportan tanto concentraciones iniciales como porcentajes de degradación menores.

Es importante remarcar que esta experiencia fue realizada enteramente en campo, con residuos reales, en tiempos y procesos propios de la actividad agrícola, no de una programación ajena a la realidad cotidiana de quienes utilizan los plaguicidas. En este sentido, los tipos y las concentraciones de plaguicidas utilizados no fueron diagramados como parte del proceso experimental y tres de los siete plaguicidas presentes fueron fungicidas, que, por su función inherente, podrían haber generado inhibición en el desarrollo de hongos asociados a la presencia de enzimas lignocelulósicas.

Los componentes de las biomezclas se eligieron basándose en la disponibilidad, manejo y factibilidad estacional, por lo que no todos ellos responden a los de mejores aptitudes comprobadas, sino a la posibilidad certera de formar parte de un cotidiano que permita reproducir la experiencia en manos de quienes necesitan instalar la tecnología en su labor diaria.

Abstract

Agrochemical pollution is one of the most important and relevant environmental issues faced by different countries nowadays. It can be generated by point or diffuse sources, which are often not distinct. Pesticide residues spread into the environment and become pollutants that affect the soil, air and water, which represents a great risk to the health of people as well as the environment.

Biobeds are bioremediation systems which have been developed in order to contribute to responsible management of agrochemicals. They consist of a receptacle or pit lined with an impermeable layer which contains an active biomixture of soil, lignocellulosic material and a humidified organic substrate. The purpose of this technology is that agricultural chemicals are handled above the biobed when filling sprayers, so that spilled pesticides are collected, retained and degraded within this biosystem. Despite the fact that these systems have been extensively studied and applied in Europe, their development in Latin America is still at an incipient stage.

The main purpose of this thesis has been the design, construction and implementation of medium-scale biobeds as treatment systems for residual currents of agricultural chemicals generated in an area of the horticultural belt in the province of Santa Fe, Argentina.

For this project, two types of biobeds with different compositions were built (BBI and BBII) using 200-liter containers with no recirculation. In addition, two smaller containers were used as controls (with no application of agrochemicals).

Composition of BBI was 25% compost (obtained from poultry litter and horticultural waste), 25% soil, 15% horticultural waste and 35% corn stubble, while composition of BBII was 50% soil, 15% horticultural waste and 35% corn stubble. These biobeds had a 70-day period of maturation, during which proper humidity was maintained. Afterwards, they were watered with the solution collected from knapsack sprayers used by producers in the productive area. The agrochemicals found in the solution were: λ cyhalothrin, azoxystrobin carbendazim,

imidacloprid, metolachlor, tebuconazole and abamectin B1a. The test lasted for 120 days and the following determinations were made: agrochemical analysis at the beginning and at the end, enzyme determinations (hydrolysis of Fluorescein Diacetate, FDA) and phenol oxidase activity), lettuce seed germination tests, and avoidance tests with earthworms. Moreover, counts of total bacteria, fungi and yeast were performed before and after applying the agrochemical solution.

Both biobeds showed good degradation percentages. Particularly, on day 120 BBI reached levels of degradation above 70% for the seven agrochemicals analysed, above 80% in the case of abamectin B1a and 90% for carbendazim. It is not possible to compare the performance of both beds since the initial concentrations (after application) were very different. BBII had agrochemical concentrations approximately 30% lower than those found in BBI, which may be due to the preferred paths through which the applied agrochemicals flowed or the different densities of the substrates used, among other reasons.

Regarding enzymatic activity due to hydrolytic enzymes (FDA), by day 120 activity decreased significantly in both biobeds relative to the beginning. However, the decrease of lignocellulosic enzymes was not so dramatic and the values obtained at the end of the test indicate that the biobeds were active and could be used for a new application of agrochemicals.

Germination tests as well as avoidance tests both show a quality “recovery” by day 120 of the test, which makes it clear that the biomixtures present good quality for reuse and/or incorporation into the environment as fertilizer or soil improver,

The biobeds tested turned out to be efficient for decontamination of residual currents of agrochemicals generated on site. BBI presented the greatest challenge in its construction due to the amount of time required to prepare the added compost. Even though the biomixture presented a good structure, the humidity content showed the same variations as in BBII; that is to say, humidity retention was similar.

The high percentage of degradation reached for imidacloprid is particularly remarkable relative to previously-published works in which smaller initial concentrations were used and the degradation reached was lower.

It is important to highlight that this experience was entirely a field experiment, carried out with actual waste, following and respecting the times and processes which are typical of agriculture, not with parameters far removed from the everyday reality of those who use agrochemicals. In this respect, the types and concentrations of agrochemicals used were not designed as part of the experimental process, and three of the seven agrochemicals present were fungicides, which, because of their inherent function, could have inhibited the development of fungi associated with the presence of lignocellulosic enzymes.

Biomixture components were chosen based on availability, handling, and seasonal feasibility, which is why not all of them are the ones with the best verified capabilities, but rather those which are more likely to be readily available so that those who need to implement this technology in their daily work can reproduce the experience.

1. Introducción

1.1. La actividad hortícola y el uso de plaguicidas en Argentina

Argentina tiene una superficie continental de 2,8 millones de kilómetros cuadrados y cuenta con unas 34 millones de hectáreas cultivadas, principalmente con cultivos extensivos (soja, trigo, maíz, girasol, sorgo y arroz). Si bien la producción de hortalizas y legumbres ocupa solamente el 1,5 % de la superficie cultivada del país (500.000 hectáreas) se producen de 8 a 10 millones de toneladas de hortalizas por año. La producción física (y en algunos casos la calidad) ha aumentado en los últimos años debido a innovaciones tecnológicas, como el uso de variedades mejoradas y la incorporación de híbridos, mayor empleo de fertilizantes, mejoramiento en la tecnología de riego y difusión de cultivos bajo invernáculo. Su participación en el Producto Bruto Agropecuario (agricultura y ganadería) es de aproximadamente el 10 %.¹

Por agroquímicos entendemos al total de sustancias abarcando insecticidas, fungicidas y bactericidas (incluidas las sustancias para el tratamiento de las semillas), herbicidas, reguladores del crecimiento de las plantas, rodenticidas, aceites minerales, desinfectantes, fertilizantes minerales y otros utilizados en la producción de alimentos.

En este trabajo se puntualizó en los plaguicidas, por ser los productos que se aplicaban en el establecimiento a la hora de realizar las experiencias.

Según el artículo 2° del Código Internacional de conducta para la Distribucion y Utilizacion de Plaguicidas (FAO, 1990) se define plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura

¹ Informes Sectoriales del Consejo Federal de Inversiones Sector Hortícola CFI 2016

de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte.

El tamaño medio de los establecimientos hortícolas es de 5,2 ha. Lo que distingue a la producción hortícola de las tradicionales producciones extensivas de cereales y oleaginosas es su elevado valor económico por unidad de peso, su alta producción por unidad de superficie cultivada y su alto grado de intensidad en cuanto a la utilización de los factores de producción: tierra, trabajo, capital y tecnologías. Si se la compara con el sector agropecuario extensivo, la horticultura demanda 30 veces más mano de obra, 20 veces más uso de insumos y 15 veces más inversión en maquinaria y equipos por unidad de superficie. Las hortalizas y las legumbres sin elaborar absorben más del 36 % de la demanda de mano de obra del sector de la producción primaria de la Argentina: unas 350.000 personas. Esta cifra debe sumarse a aquellas personas ocupadas en el resto de la cadena de valor (selección, empaque, comercialización, proveedores de insumos, asesores, transportistas, etc.). Es posible afirmar que se encuentran horticultores en todas las provincias del país y que sus sistemas de producción son en su mayoría de origen familiar, sean estos pequeños o grandes, diferenciándose por las formas sociales del trabajo y la organización laboral presentes en ellas (asalariados, medieros, etc.).

El sector hortícola argentino engloba la producción de las "hortalizas pesadas y de raíz" de la producción de "hortalizas de hojas y frutos", y de la producción de "hortalizas crucíferas". En el caso de las hortalizas pesadas (papa, zanahoria), éstas se cultivan, generalmente, en grandes espacios y su cosecha está en buena parte mecanizada, para lo cual se requiere de una gran inversión de capital. En tanto que las de hoja (lechuga, acelga) y de frutos (tomate, pimiento), y las crucíferas (brócoli, coliflor, repollo) se realizan generalmente, por su perecibilidad, cerca de los centros urbanos, con acceso rápido al mercado, y no se requiere, por lo general, de grandes inversiones; aunque también tienen diferente comportamiento y tratamiento según los cultivos sean realizados "a campo" o "forzados" (bajo cubierta). Estos últimos requieren mayor inversión de capital, por la tecnología que deben utilizar, aunque pueden redituar mayor ganancia. El clima y el suelo tienen alta incidencia en los rendimientos, en las épocas de oferta y en el acceso a mercados, sean estos nacionales o internacionales. Teniendo en cuenta la interacción de factores ecológicos, económicos, políticos, sociales, y sus variaciones en el marco de la amplia y variada geografía del país, se ha elaborado una tipología de ocho regiones representativas de la horticultura argentina:

Noroeste, Noreste, Central, Andina, Valles del Rio Negro y Neuquen, Litoral, Patagonia Sur, Buenos Aires.

La distribución territorial de la producción de hortalizas permite detectar zonas hortícolas a lo largo del país, no solo conformadas por bloques de provincias, sino apuntando también a la importancia que se le adjudica a los cinturones verdes que rodean a los grandes aglomerados urbanos, sean estos capitales provinciales o no. A su vez, es importante considerar la variedad de producciones que muestran las regiones Buenos Aires (en particular los cinturones hortícolas que en ésta se detectan), con 16 tipos de hortalizas, y Litoral (Santa Fe y Entre Ríos), con 13. En tanto que otras regiones, como la Patagonia Sur (Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego), se caracterizan por la especialización en sólo 3 productos, pero básicamente lo hacen en papa y ajo para semilla. Entre ambos extremos, se encuentran diversas situaciones. Por ejemplo, en el caso de las regiones Noroeste (Salta, Tucumán y Jujuy) y Andina (Catamarca, La Rioja, Mendoza y San Juan) adquiere importancia la producción de tomate para industria.

Según el Censo Hortícola del Cinturón Verde de Santa Fe (INTA) llevado a cabo en el año 2012 la extensión del cinturón hortícola de la ciudad de Santa Fe abarca aproximadamente 870 hectáreas. Las mismas se ubican en el departamento La Capital y se distribuyen entre las localidades de Santo Tomé, Chaco Chico, Ángel Gallardo, Monte Vera, Campo Creso, Recreo y Candiotti.

Respecto de las condiciones de trabajo de los horticultores y su relación con el uso de plaguicidas, según Casadinho (2009), los mismos están sometidos a condiciones de trabajo en las cuales priman la ausencia de jornadas laborales fijas y dependen de factores externos que no dominan, como la determinación de sus ingresos y la convivencia permanente con los plaguicidas.

Los horticultores recrean y depositan en el cuerpo la aceptación de las condiciones de vida y trabajo imperantes, la autoexplotación, la explotación de otros miembros de su clase que se hallan jerárquicamente por debajo de ellos en el campo, la creencia en la necesidad de presentar un producto de alta calidad formal para obtener ingresos adecuados y la adhesión a una agricultura basada en alta cantidad de insumos, como los plaguicidas. De acuerdo con información del Censo Horti-Florícola de la Provincia de Buenos Aires (CHF) 2005, esta situación se produce en la provincia de Buenos Aires en el 73,0% de los horticultores. La venta

de insumos a precios accesibles, el estilo de asesoramiento y la falta de conocimiento profundo acerca del efecto de estos tóxicos en el medio ambiente, influyen sobre la cantidad de casos de intoxicación.

Según la División de Estadística de la FAO (FAOSTAT) si tomamos los datos de uso de plaguicidas (promedio total) desde el año 1990 al 2019, tanto en la producción intensiva como hortícola, Argentina ocupa el 4to puesto a nivel mundial habiendo pasado de consumir 26156 toneladas en 1990 a 204559 toneladas en el 2019 como se aprecia en las Figuras 1 y 2. Esto representa un uso de cerca de 5 kg de plaguicidas por hectárea de superficie de tierra de cultivo, cuando en 1990 este valor era de 1 kg ha⁻¹ (Figura 3).

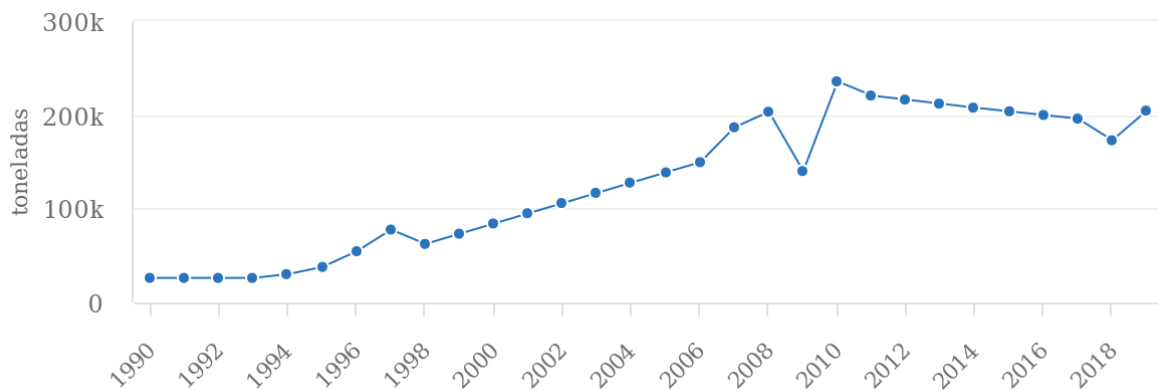


Figura 1: Evolución del uso de plaguicidas (tn) desde 1990 a 2019 en la Argentina
Fuente: Modificado de FAOSTAT

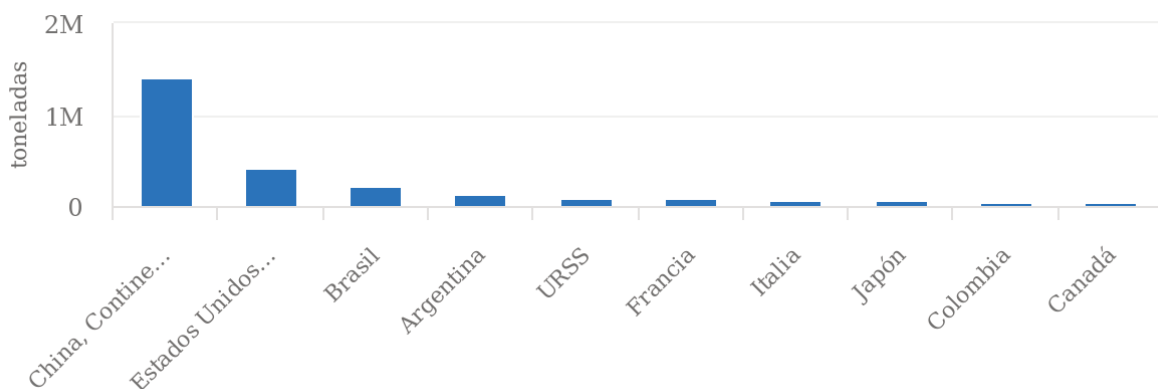
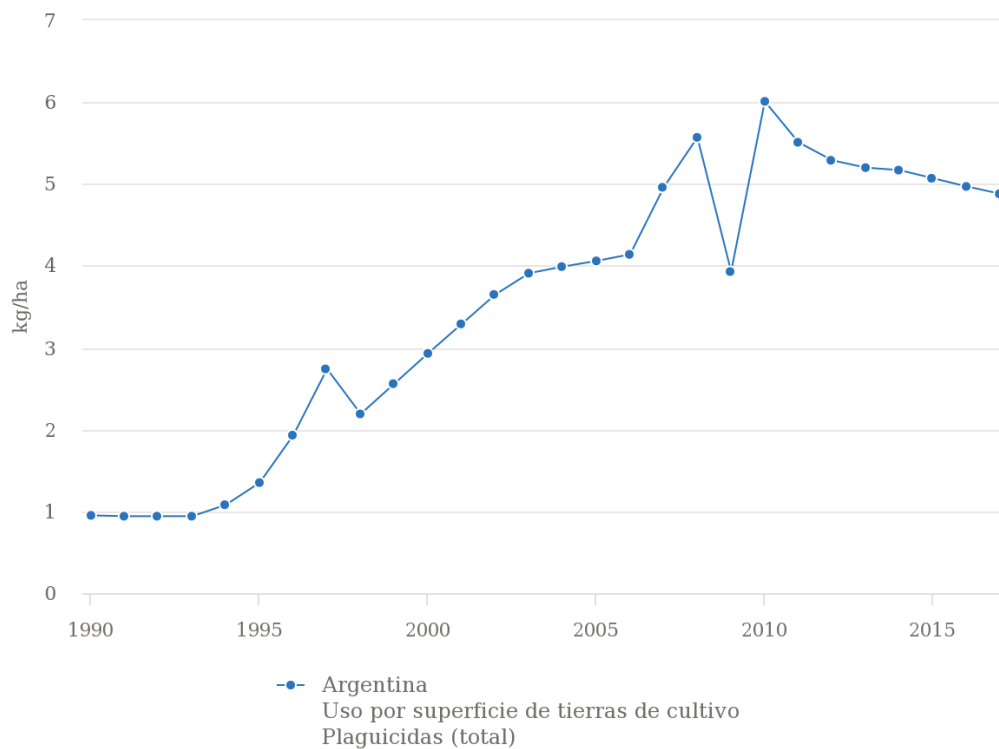


Figura 2: Uso de plaguicidas (tn) promedio entre 1990 y 2019 a nivel mundial
Fuente: Modificado de FAOSTAT



Source: FAOSTAT (ago. 06, 2020)

Figura 3: Uso de plaguicidas (kg) por hectárea de tierras de cultivo
Fuente: Modificado de FAOSTAT

En el informe “La Horticultura en la Argentina” presentado por el Ministerio de Educación de la Nación y el Instituto Nacional de Educación Tecnológica en el año 2010 se menciona que, entre los factores que incrementan el riesgo en la manipulación de plaguicidas, se pueden citar:

- la persistencia del producto químico en el ambiente (suelo y agua)
- la capacidad de acumulación en las cadenas tróficas
- la movilidad del producto en el ambiente
- la forma de presentación del plaguicida
- la facilidad de dosificación, el modo de aplicación del producto químico y
- la cantidad recomendada en el marbete y realmente aplicada del plaguicida.

Con respecto a la aplicación de plaguicidas, el informe plantea que las y los productores se hallan condicionados por los siguientes actores y procesos:

- Los consumidores que, a partir de un cambio en las pautas de consumo, enfatizan en la calidad formal del producto, buscando hortalizas de tamaño homogéneo, sin manchas, ni restos del

ataque de insectos u hongos. La presión sobre estos indicadores de calidad lleva a los productores a extremar la protección de los cultivos realizando un uso abusivo de plaguicidas.

-Los procesos globales, en especial el de modernización productiva, que lleva a los productores a utilizar cada vez mayor cantidad de insumos sintéticos, con origen en empresas transnacionales.

-Los proveedores de insumos quienes, en la búsqueda de un mayor volumen de venta y a partir de las necesidades y temores específicos de los productores, refuerzan la dependencia hacia los tóxicos, sostenida por una profusa publicidad y permanentes visitas a las quintas, durante el transcurso de las cuales asesoran sobre el estado de los cultivos y recomiendan los plaguicidas “más adecuados” para solucionar los problemas ocasionales.

-Sus temores de perder el cultivo o, cuando menos, las posibilidades de comercialización. Los productores presentan y expresan un sentimiento de vulnerabilidad cuando se ven imposibilitados de aplicar plaguicidas, ya sea por su precio o por la presencia de condiciones climáticas adversas.

-La necesidad de incrementar los rendimientos en una actividad caracterizada por una permanente caída en los precios de los productos. Ante esta merma o amenaza de reducción económica, los productores oponen estrategias que llevan a un incremento en la producción. En éstas combinan el aumento de la superficie bajo cultivo con la aplicación de tecnologías químicas y biológicas.

-El proceso de descapitalización, que se manifiesta de manera selectiva según zonas y tipos sociales, que obliga a realizar aplicaciones de plaguicidas discontinuas y selectivas. Todas estas circunstancias impregnan de manera decisiva las estrategias productivas y comerciales de los horticultores.

1.2. La contaminación por plaguicidas: las camas biológicas como buenas prácticas agrícolas

La contaminación del ambiente por plaguicidas puede ser originada mediante fuentes puntuales o difusas, las cuales muchas veces no están claramente diferenciadas y puede darse antes,

durante o posterior a la aplicación de los plaguicidas. La contaminación difusa ocurre principalmente por pérdidas por escorrentía y deriva. La contaminación puntual se origina en el lugar de preparación de los plaguicidas, previo a su aplicación o cuando se produce el manejo inadecuado de los plaguicidas y sus envases. Los residuos de los plaguicidas se dispersan en el ambiente y se convierten en contaminantes para el suelo, aire y agua lo que representa un gran riesgo para la salud de la población y el ambiente.

En este contexto surge la necesidad de implementar actividades y buenas prácticas que impulsen un desarrollo sustentable de la producción agrícola de la región y el país. Para ello es necesario desarrollar tecnologías simples, de bajo costo y eficientes para la remoción *in situ* de los residuos generados.

Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) “consisten en la aplicación del conocimiento disponible a la utilización sostenible de los recursos naturales básicos para la producción, en forma benévola, de productos agrícolas alimentarios y no alimentarios, inocuos y saludables, a la vez que se procura la viabilidad económica y la estabilidad social”. Según la Cámara de Sanidad de Agropecuaria y de Fertilizantes (CASAFE), las BPA son un “conjunto de principios, normas y recomendaciones técnicas aplicables a la producción, procesamiento y transporte de alimentos, orientadas a asegurar la protección de la higiene, la salud humana y el medio ambiente, mediante métodos ecológicamente seguros, higiénicamente aceptables y económicamente factibles”. En ese marco, la gestión responsable de plaguicidas tiene como objetivo lograr el manejo y uso responsable de dichas sustancias durante todo su ciclo de vida: desde su descubrimiento y desarrollo, ciclo comercial y uso en el campo, hasta su eliminación por el uso y disposición final de envases.

Una de las tecnologías desarrolladas con el fin de aportar a la gestión responsable del uso de plaguicidas son los “Biolechos”, “Camas Biológicas (CB)” o “Sistemas de biopurificación” (también denominados BPS por su sigla en inglés). Son sistemas de construcción sencilla y económica diseñados para coleccionar y degradar derrames de agroquímicos. Las camas biológicas están constituidas básicamente por excavaciones impermeabilizadas rellenas con una matriz activa biológicamente (denominada biomezcla) que consiste en suelo, material lignocelulósico y un sustrato orgánico humidificado, mezclados en relaciones de volúmenes variables y cubiertas por una capa vegetal. La biomezcla es el componente más importante de los lechos

biológicos ya que permite la retención y posterior degradación de los agroquímicos por acción de los microorganismos que se desarrollan en la misma.

La típica biomezcla (en su diseño original) está compuesta por paja, suelo y turba. La paja estimula la actividad de hongos ligninolíticos y la formación de enzimas que degradan la lignina y que también degradan una amplia variedad de plaguicidas. El suelo provee capacidad de retención y es fuente de otros microorganismos degradadores de plaguicidas. La turba contribuye también con capacidad de retención y a su vez ayuda a mantener la humedad de la mezcla. La capa de césped en la superficie es importante para mantener la humedad y sirve asimismo como indicador de derrame de plaguicidas. En Europa, las camas biológicas adquirieron importancia por su sencillez y eficacia en degradar y retener altas cargas de plaguicidas que son descargados durante los períodos de fumigación (Antonious 2012; Karanasios y col. 2012; Tortella y col. 2012). En estos países se realizaron estudios de adaptación a las condiciones de cada región y se los conoce como sistemas de biopurificación, biofiltros, biobac, phytobac, entre otros. Asimismo, en algunos países centroamericanos se están comenzando a implementar para minimizar el efecto negativo de las prácticas agrícolas citadas (Lizano-Fallas y col. 2017; Góngora-Echeverría y col. 2017; Castro-Gutiérrez y col. 2017) así como en producciones hortícolas y frutícolas (Cesio y col. 2021; Acosta-Sánchez y col. 2020; Delgado-Moreno y col. 2021)

Reino Unido, Suecia (país de origen de la tecnología de camas biológicas con más de 1500 unidades instaladas), Francia, Bélgica, Guatemala y Polonia están entre los países que oficialmente usan esta tecnología. En España actualmente no están siendo utilizados, mientras que en América Latina, los estudios sobre camas biológicas están centrados en Chile, Costa Rica, Brasil, Argentina, México y Uruguay.

A diferencia de los demás países latinoamericanos y debido a la demanda agroindustrial, Guatemala fue el primer país de América Latina en adoptar este tipo de sistemas como una tecnología oficial para la disposición de residuos de plaguicidas (Dias y col. 2020).

Las camas biológicas pueden ser directas o indirectas según como se apliquen en ellas los plaguicidas. En las directas, generalmente preparadas para equipos traccionados, se preparan bajo el nivel del suelo para que la aplicación de los sobrantes de plaguicidas y/o los residuos

provenientes de la limpieza de los equipos caiga directamente sobre la cama biológica, como se puede apreciar en las Figuras 4 y 5.

Cama Biológica en línea (de manejo sobre ella)

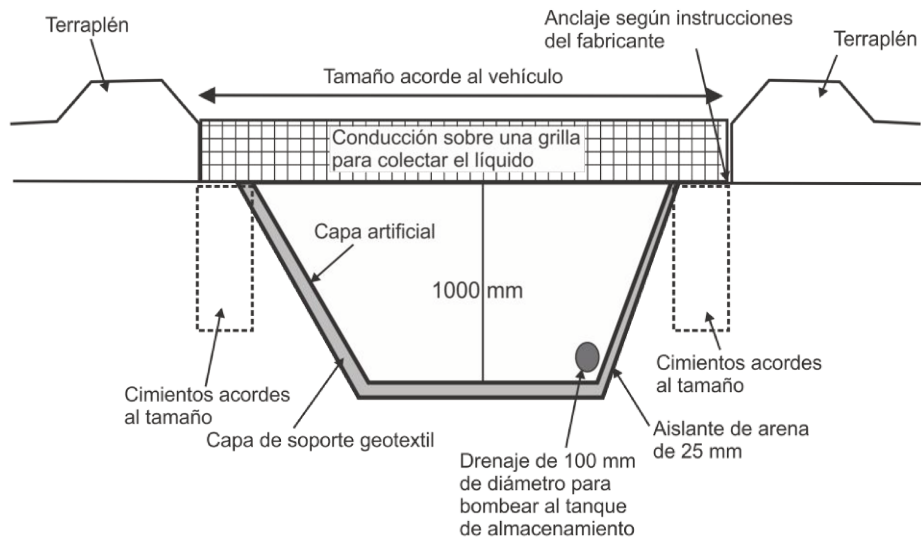


Figura 4: Componentes de una cama biológica directa
Fuente: Modificado de Pesticide Handling Area and Biobed Manual²

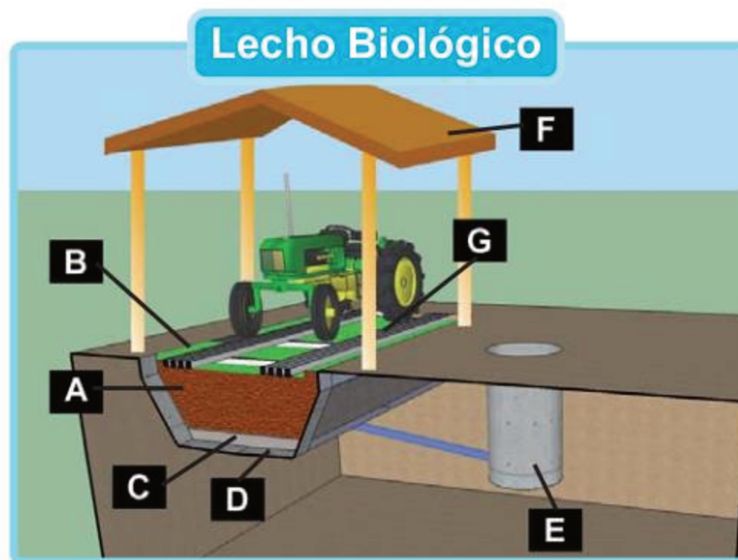


Figura 5: Componentes de una cama biológica directa. Biomezcla (A), cubierta vegetal (B), capa de gravilla (C), sistema de impermeabilización (D), sistema de recirculación (E), techo de protección (F) y sistema de soporte para el equipo de aplicación (G)
Fuente: Modificado de MANUAL DE CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE LECHOS BIOLÓGICOS Editorial Universidad de la Frontera

² El manual fue preparado por Environment Agency, The Voluntary Initiative and Catchment Sensitive Farming with expert help provided by ADAS, Bill Basford and Horticultural Development Company (HDC). Versión de 2015

Por otro lado, las camas biológicas indirectas, como las mostradas en las Figuras 6 a 14, son generalmente usadas para el depósito de los sobrantes de plaguicidas provenientes de equipos manuales, como mochilas de fumigación o residuos provenientes de enjuagues y preparaciones anteriores o posteriores al proceso de aplicación de plaguicidas en los que la maquinaria se estaciona sobre plataformas impermeables y los lixiviados son transportados hacia las camas biológicas.

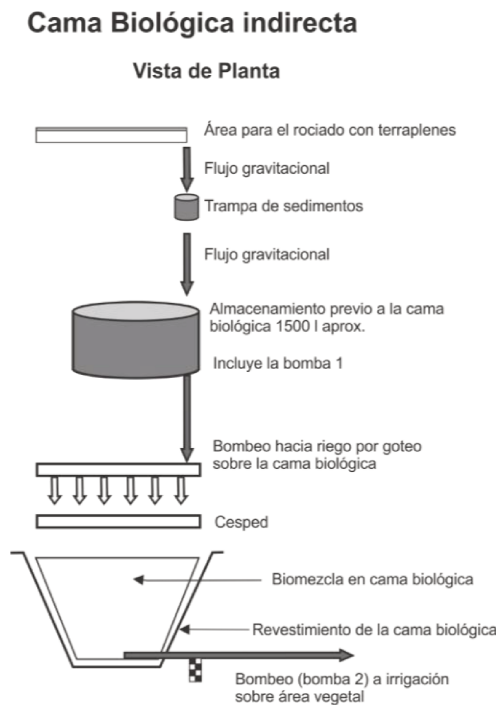


Figura 6: Componentes de una cama biológica indirecta

Fuente: Modificado de Pesticide Handling Area and Biobed Manual³

³ El manual fue preparado por Environment Agency, The Voluntary Initiative and Catchment Sensitive Farming with expert help provided by ADAS, Bill Basford and Horticultural Development Company (HDC). Versión de 2015



Figura 7: Cama biológica indirecta con recirculación.

Fuente: Modificado de Manual de Construcción y Operación de Lechos Biológicos
Editorial Universidad de la Frontera



Figura 8: Cama biológica indirecta sin recirculación.

Fuente: Modificado de Manual de Construcción y Operación de Lechos Biológicos
Editorial Universidad de la Frontera



Figura 9: Cama biológica indirecta con recirculación construida en INTEC en el predio del CONICET Santa Fe



Figura 10: Una máquina fumigadora estacionada sobre una plataforma impermeable por la que escurre el líquido hacia la cama biológica indirecta

Fuente: Modificado de Pesticide Handling Area and Biobed Manual



Figura 11: Cama biológica indirecta en construcción.

Fuente: Modificado de Pesticide Handling Area and Biobed Manual



Figura 12: Cama biológica indirecta experimental.

Fuente: Modificado de la Tesina de grado de la alumna de Licenciatura en Biotecnología Nerina Fussoni (FBCB-UNL): “Tratamiento de un efluente real proveniente de una planta productora de plaguicidas mediante Procesos Avanzados de Oxidación y Camas Biológicas”



Figura 13: Cama biológica indirecta instalada en Brasil.

Fuente: Modificado de Review Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in Latin America. Dias y col. 2020



Figura 14: Camas biológicas indirectas experimentales instaladas en Brasil.

Fuente: Modificado del Review: Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in Latin America. Dias y col. 2020

A pesar de su simplicidad, Karanasios y col. (2012) muestran que, en Argentina, este tipo de sistema aún no se ha implementado, pero ya hay algunos estudios a escala laboratorio y piloto que muestran la factibilidad de su utilización (Lescano y col. 2020, 2022, Masin y col. 2018, Lescano y col. 2018, Pioli y col. 2020).

Para ello, es importante proponer diseños que tengan en cuenta materiales residuales disponibles y económicos para preparar la biomezcla y los plaguicidas más empleados y tipos de efluentes generados junto a las condiciones climáticas locales (temperatura, humedad). Un

aspecto a estudiar es ensayar materiales que reemplacen la turba ya que es un recurso escaso y de alto valor económico (Gao y col. 2015) por lo que su incorporación no aportaría a una práctica agrícola sustentable (Karanasios y col. 2012). En este sentido, uno de los principales sustratos que puede reemplazar la turba es el compost obtenido a partir de diferentes materiales agrícolas (Castillo y col. 2008; Karanasios y col. 2012).

Cuando se habla de *compost*, se hace referencia al abono orgánico equilibrado en nutrientes y con buenas propiedades físicas, químicas y biológicas como resultado de la descomposición por fermentación aeróbica/respiración oxidativa (Garra y col. 2011). En general las biomezclas preparadas con compost poseen mayor capacidad de degradación que las biomezclas que contienen turba (Karanasios y col. 2012; Coppola y col. 2011; Omirou y col. 2012). Si bien las propiedades de cada compost dependen en gran medida de las prácticas de compostaje, generalmente, en comparación con la turba utilizada en las biomezclas originalmente, el compost se caracteriza por poseer contenidos bajos de carbono, mayores niveles de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio), niveles de pH neutros o básicos (Zmora-Nahum y col. 2007) y contener una comunidad microbiana metabólicamente activa (Karanasios y col. 2012). El origen y características del compost utilizado pueden afectar significativamente el comportamiento de la degradación de los plaguicidas. Por ejemplo, se comprobó que el compost de residuos de jardín es más eficiente que el compost de residuos urbanos para la degradación de clorpirifos y su principal metabolito, 3,5,6-tricloro-piridinol (TCP) (Coppola y col. 2007).

En Latinoamérica se están evaluando diferentes composts para reemplazar la turba, tradicionalmente usada en las camas biológicas europeas. En Costa Rica, por ejemplo, se están evaluando biomezclas compuestas de fibras de coco, compost de residuos vegetales y suelo (Chin-Pampillo y col., 2016; Rodríguez-Castillo y col., 2018). En México se están testeando biomezclas de pulpa sisal, compost de residuos vegetales, chala de maíz y algas marinas (Góngora-Echeverría y col. 2018). En la Tabla 1 se resumen los trabajos en los cuales se utilizaron diferentes composts para la degradación de diversos plaguicidas.

Tabla 1: Materiales agrícolas compostados utilizados como reemplazo de la turba

Sustratos	Plaguicidas	Referencias
Compost de champiñón común; compost de hojas de olivo; turba	dimetoato, indoxacarb, buprofezin, terbutilazina, metalaxyl, metribuzin, azoxistrobina, iprodiona	Karanasios y col. (2012a)
Compost de orujo de uva; compost de hojas de olivo; turba	terbutilazina, metalaxyl, metribuzin, clorpirifós, iprodiona	Karanasios y col. (2012b)
Compost de hojas de olivo; turba	clorpirifós, indoxacarb, buprofezina, terbutilazina, metalaxyl, metribuzin, azoxistrobina, iprodiona	Karanasios y col. (2010a)
Compost de champiñón común; compost de hojas de olivo; compost de algas de mar; compost de residuos de cultivo de algodón; compost de semillas de algodón; turba	dimetoato, indoxacarb, buprofezina, terbutilazina, metalaxyl, metribuzin, azoxistrobina, iprodiona	Karanasios y col. (2010b)
Podas de olivos-; poda de la vid; orujo de uva; compost de semillas y piel de uva	deltametrina, cipermetrina, clorpirifós, ortofenilfenol, tiabendazol, imazalil	Omirou y col. (2012)
Compost de flores y residuos de las semillas de algodón.	terbutilazina, clorpirifós	Kravariti y col. (2010)
Compost sin turba	isoproturón, pendimetalina, clorpirifós, clorotalonil, epoxiconazol, dimetoato	Fogg y col. (2003); Fogg y col. (2004a, b)
Compost de desperdicios de jardín; turba	linurón, isoproturón, metalaxyl, bentazón	De Wilde y col. (2009b, c)
Turba	azoxistrobina, bentazón, bromoxinil, ioxinil, dimetoato, diuron, fenpropimorf, fluazifop-p-butil, glifosato, kresoxim-metil, mcpa, mecoprop-p, pirimicarb, propiconazol, propizamida, prosulfocarb, metamidtrona, cloridazon, metribuzina, metabenzthiazuron, isoproturón, terbutilazina, linurón, metalaxyl, clorpirifós	Spliid y col. (2006), Castillo y Torstensson (2007), De Wilde y col. (2010c), De Wilde y col. (2010d), Tortella y col. (2012)
Compost de residuos urbanos; Compost de residuos de jardín; turba	clorpirifós, metalaxyl, isoproturón, bentazón	Vischetti y col. (2004, 2008), Coppola y col. (2007, 2011a)
Compost de podas	penconazol, dimetomorf, iprovalicarb, metalaxyl, azoxistrobina, fludioxinil, ciprodinil	Monaci y col. (2009)

1.3. Determinaciones de actividad enzimática para seguimiento de la actividad de las Camas Biológicas.

Las enzimas son relativamente resistentes a los procesos de desnaturalización (Ladd 1978), por lo que es difícil extraerlas del suelo y, por tanto, se estudian indirectamente, midiendo su actividad.

Las actividades enzimáticas relacionadas con el procesamiento del nitrógeno, fósforo, carbono y azufre en los suelos proporcionan información sobre el estado microbiológico del mismo y sobre sus propiedades físico-químicas (Aon y Colaneri 2001), siendo indicadores tempranos de cambios en la calidad del suelo. La fluctuación en la presencia y/o ausencia de las enzimas de un suelo o biomezcla puede ser considerada como un indicador de una posible perturbación ambiental, en este caso por la contaminación con plaguicidas.

Las actividades enzimáticas de las peroxidasas (lignina peroxidasa (Lip), actividad lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP)) en su conjunto se denominan actividad fenoloxidasas. Son enzimas que degradan la lignina, polímero orgánico complejo que forma materiales estructurales importantes en los tejidos de soporte de plantas vasculares. Estas enzimas son producidas por *Phanerochaete chrysosporium* o el “hongo de la pudrición blanca” reconocido también por su habilidad para degradar una amplia variedad de contaminantes orgánicos, entre ellos algunos plaguicidas (Castillo 2001).

La hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) es una reacción que involucra diversos grupos de enzimas hidrolasas tales como: proteasas, lipasas, esterases; constituyendo un indicador sensible de la actividad microbiana total de la hojarasca y el suelo (Adam y Duncan 2001; Green y col. 2006).

Monitorear FDA y FOX en las biomezclas de las camas biológicas es solo uno de los acercamientos a los efectos de los plaguicidas sobre la actividad biológica, considerando que la degradación de plaguicidas en las biomezclas o el suelo es una serie de interacciones físicas, químicas y biológicas (Tortella y col. 2011). Además, aportan información sobre la capacidad de las biomezclas para continuar degradando nuevos contaminantes y, por lo tanto, tomar decisiones sobre su reemplazo parcial o total.

1.4. Uso de Bioensayos para monitoreo de Camas Biológicas

Un aspecto muy poco abordado es la implementación de bioensayos para poder determinar si las biomezclas usadas están correctamente descontaminadas al final del proceso de biorremediación (Roffignac y col. 2008). Un ejemplo es el trabajo de Ruiz-Hidalgo y col. (2014) donde se evalúa la toxicidad de los lixiviados de una biomezcla utilizada para la degradación del pesticida carbofuran con el microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna*. Sin embargo, la aplicación de organismos que puedan utilizarse directamente sobre la biomezcla monitoreando su toxicidad durante el proceso es un aspecto prácticamente no estudiado.

Los ensayos con oligoquetos (en particular las lombrices de tierra), permiten determinar la inocuidad de las biomezclas usadas. De los invertebrados que habitan en el perfil del suelo, las lombrices cobran importancia pues intervienen en el mantenimiento de la estructura y servicios ecosistémicos de los suelos, permanecen en el perfil todo el ciclo de vida y constituyen cerca del 80 % de la biomasa total edáfica. Además, son un componente esencial de la trama trófica terrestre como presa para numerosos organismos depredadores. Por estar expuestas a los contaminantes que llegan y permanecen en el suelo son susceptibles a la acción de xenobióticos como los plaguicidas, cuyos efectos pueden sentirse a nivel de especie, población y comunidad (Edwards y Bohlen 1992, Paoletti 1999). Cualquier cambio o influencia con respecto a su número poblacional o rol que ocupan en la transferencia trófica de energía repercute en adversos efectos ecológicos del sistema terrestre. Debido a ello, las lombrices son organismos clave para evaluar la toxicidad de los plaguicidas presentes en el suelo o biomezclas mediante pruebas de laboratorio, son ampliamente usadas como organismos para evaluar la contaminación y son consideradas indicadores sensibles del daño al ambiente (OECD, 2004; Eisenhauer y col. 2008; Römbke y col. 2005c, Xiao y col. 2006; Ricardo y col. 2010; Lorenzatti, y col. 2016).

Entre todas las especies de lombrices, *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* son los organismos estándar más usados en ecotoxicología terrestre (OECD N° 207 1984; ISO 11268-1 1993, ISO 11268-3 1999, ISO 17512 2008).

La variable respuesta de evasión se basa en la presencia de quimiorreceptores en el prostomio y en el segmento anterior, así como la distribución de tubérculos a lo largo del cuerpo, los cuales hacen a las lombrices muy sensibles a los agentes químicos en el ambiente y les permiten

evitar condiciones ambientales desfavorables gracias a su capacidad locomotriz (Curry y Schmidt 2007, Udovic y Lestan 2010).

Otros bioensayos de aplicación directa sobre la biomezcla son los que utilizan plantas vasculares. El uso de semillas de plantas terrestres permite evaluar el efecto de los contaminantes en el proceso de germinación, desarrollo y establecimiento de la plántula en los primeros días de crecimiento. Estas pruebas son aplicadas para muestras ambientales, monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reutilización de biosólidos (OECD 2003; IDRC/IMTA 2004). Los protocolos para evaluar fitotoxicidad de contaminantes en semillas, proponen diferentes organismos vegetales siendo *Lactuca sativa* y *Eruca sativa*, especies ampliamente difundidas para su aplicación en este tipo de ensayos, tanto por la sensibilidad a diferentes tipos de compuestos como por la simplicidad en la ejecución del bioensayo (OECD 2004 y 2010).

La importancia de los bioensayos para la presente investigación radica en su simple implementación por parte de los productores agrícolas en quienes se está pensando para facilitar la puesta en marcha de las camas biológicas: los bioensayos son fáciles de llevar adelante y económicos. Todo lo contrario ocurre con las técnicas analíticas para determinar y cuantificar la presencia de plaguicidas o de sus metabolitos en los sustratos, las cuales son complejas y costosas.

En relación a la línea de camas biológicas en el grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo de tesis existe experiencia en el uso de camas biológicas para tratar efluentes con altas concentraciones de glifosato y su principal metabolito de degradación, el ácido aminometilfosfónico-AMPA-, empleando biomezclas basadas en materiales de la región, como el rastrojo de trigo, la paja de alfalfa y la resaca de río (Lescano y col. 2020; Lescano y col. 2018, Masín y col. 2018). Además, también se evaluaron otros sustratos como los rastrojos de trigo/soja, maíz, repollo y moha para la degradación de 2,4-D y atrazina en altas concentraciones a escala laboratorio (Pioli y Lescano 2021). En relación a la escala piloto, se diseñó un contenedor de 1 m³ con recirculación para la degradación de atrazina, imidacloprid, prometrina, carbendazim y glifosato provenientes de un efluente de origen industrial (Lescano 2022). Este último trabajo se realizó en el marco de un convenio de Investigación y Desarrollo con una empresa de la región con el objeto de implementar, en su planta de producción de plaguicidas, alternativas tecnológicas fundadas en procesos de biorremediación (camas biológicas y vermirremediación), para optimizar el proceso de tratamiento de sus efluentes, y

así poder sumar a la gestión sustentable de su producción (Convenio Red Surcos - CONICET). Por otra parte, algunos integrantes del grupo están participando de la comisión de suelo de IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) con el objetivo de normalizar la construcción y funcionamiento de camas biológicas en el país (IRAM 29561 “Guía para la construcción y el manejo de camas biológicas”).

A pesar de la concreción de estos trabajos de investigación, a la fecha no se ha concretado la aplicación de esta tecnología en los predios hortícolas de la región, por lo que el desarrollo de este trabajo de tesis permitirá implementar esta tecnología a campo trabajando en forma conjunta con los productores hortícolas santafesinos de manera de lograr incorporar prácticas que contribuyan a la sustentabilidad ambiental.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo principal es el diseño, construcción e implementación de camas biológicas a escala mediana como sistemas de tratamiento de las corrientes residuales de plaguicidas generadas en un predio del cinturón hortícola santafesino.

2.2. Objetivos específicos

Entre los objetivos específicos se encuentran:

- Relevar la zona de estudio: tipo de producción, plaguicidas más usados, formas de manipulación, tratamiento de residuos, medidas de seguridad.
- Diseñar e implementar sistemas de biopurificación (camas biológicas a escala media) para el tratamiento de corrientes residuales de plaguicidas provenientes de equipos aplicadores de pequeña dimensión.
- Interactuar con los productores de la zona y brindar capacitación sobre el uso y mantenimiento de las camas biológicas.
- Incorporar bioensayos para el monitoreo de los sistemas de biopurificación.

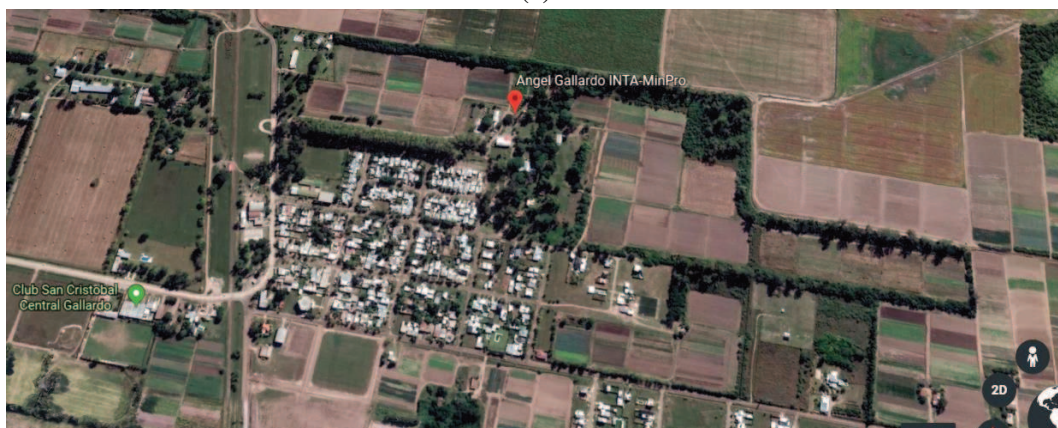
3. Materiales y Métodos

3.1. Caracterización del área y el módulo rural en estudio

El trabajo de campo de colección de los materiales necesarios para el armado de las camas biológicas y sus respectivos blancos se realizó en el predio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA ubicado en la localidad de Ángel Gallardo, el cual conforma junto con el Ministerio de la Producción de la provincia de Santa Fe un Centro Operativo Experimental cuya localización puede observarse en la Figura 15.



(a)



(b)

Figura 15: (a) Localización del Predio experimental respecto de la ciudad de Santa Fe
(b) Paraje de Ángel Gallardo, perteneciente a la Comuna de Monte Vera
Fuente: Modificado de Google Earth 2020

En las Figuras 16 a 18 pueden observarse imágenes del Predio experimental INTA.



Figura 16: Vista del Predio experimental INTA Ángel Gallardo



Figura 17: Vista del Predio experimental INTA Ángel Gallardo



Figura 18: Vista del Predio experimental INTA Ángel Gallardo

El predio posee un programa de Transición Agroecológica para las producciones hortícolas intensivas. Uno de sus objetivos específicos es el de “Aumentar la eficiencia de las prácticas convencionales para reducir el uso y consumo de insumos costosos, escasos o dañinos para el ambiente, sustituir insumos y prácticas convencionales reemplazándolas por prácticas alternativas.”⁴ Algunos avances logrados en este sentido pueden verse en la Tabla 2, respecto de la cuantificación y disminución de los plaguicidas utilizados.

En el marco de esos objetivos es que la implementación de las camas biológicas como ejemplo de buenas prácticas agrícolas fue bien recibida e integrada con las necesidades y expectativas de ambas instituciones.

El predio experimental lo constituyen 11 hectáreas. En ellas se llevan adelante varias prácticas agroecológicas. La diversificación y rotación de los cultivos, no solo en el predio sino por parcela de 4200 m². Se siembran 4 cultivos por parcela y se rotan. Esto ha permitido diversificar la producción de 9 especies a 21 desde el año 2014 a la actualidad.

Tabla 2: Evolución en el Centro Operativo Experimental de Ángel Gallardo

Año	Hectáreas Sembradas	Uso de plaguicidas L ha⁻¹ cultivadas
2016	17,3	sin datos
2017	20,6	1,8
2018	22,8	1,1

El proyecto de transición agroecológica incluye la implementación de corredores biológicos, abono verde (sorgo) y un apiario cuya miel se utiliza como indicador de la presencia o ausencia de plaguicidas.

El sistema de producción hortícola en el centro Ángel Gallardo está sostenido por tres horticultores: Joaquín, Florindo y Patroncho que tienen parcelas diferentes asignadas. De todas

⁴ Programa de Transición Agroecológica en Producciones Agrícolas intensivas. INTA

maneras, los equipos utilizados para preparar los plaguicidas y fumigar son de uso colectivo. Según las entrevistas personales realizadas, ninguno de los productores realiza el lavado de las mochilas utilizadas para la aplicación de los productos. Para un uso más eficiente de los recursos y generar menos agua de lavado, utilizan una mochila diferente para cada tipo de producto (herbicida, fungicida, etc). Si hay sobrante dentro de las mochilas una vez terminada la aplicación, admiten realizar un “repasso” sobre zonas ya aplicadas o verter la preparación al borde del lote trabajado.

Las aplicaciones son realizadas por los mismos productores o contratan peones para la tarea, dependiendo de la época y de las posibilidades físicas y económicas del momento.

Los plaguicidas utilizados por los tres productores son comprados y administrados por los técnicos del INTA que realizan el acompañamiento de las producciones. En la elección de los productos a comprar favorecen productos de bajo tiempo de carencia. Los mismos son almacenados en una pequeña sala dentro del predio que cuenta con ventilación, piso y paredes recubiertas. Los productos utilizados se pueden observar en la Tabla 3.

En la misma sala se guardan las mochilas ya que la aplicación de los productos se realiza generalmente por ese medio. De manera excepcional, se utiliza una fumigadora conectada a un tractor de unos 600 litros de capacidad.

Tabla 3: Plaguicidas utilizados en el predio del INTA

Producto	Estado	Tipo	Marca	Clase
clorotalonil	Sólido	Fungicida	Cheminova TALONE	Clase toxicológica IV: Normalmente no ofrece peligro
captan	Sólido	Fungicida	Merpan ADAMA	Clase toxicológica III: Poco Peligroso
profenofos	Líquido	Insecticida	Red Surcos TROMPO	Clase toxicológica II: moderadamente peligroso
azoxistrobina 20 g tebuconazole 12 g	Líquido	Fungicida	Acento Red Surcos	Clase toxicológica III: Poco Peligroso
carbendazim tebuconazole	Líquido	Fungicida	Arbus Red Surcos	Clase toxicológica IV: Normalmente no ofrece peligro
imidacloprid-3-fenoxibencil	Líquido	Insecticida	Nero Surcos	Clasificación toxicológica II: moderadamente peligroso.
abamectin: ≥80% avermectina b1a	Líquido	Insecticida- Acaricida	Mectina Forte	Clase toxicológica II: moderadamente peligroso
metolaclor 96%p/v	Líquido	Herbicida	Bagual	Clase toxicológica III: Poco Peligroso

A continuación, se presenta la Tabla 4 con las características principales de los plaguicidas encontrados en la mezcla de residuos proveniente de las mochilas de fumigación. La mayoría son insecticidas y fungicidas, ya que el uso de herbicidas en el predio es muy bajo. Todos ellos presentan una movilidad en el suelo de moderada a nula siendo los tiempos de vida medio en suelo desde 6 días a 1200 días.

Tabla 4: Propiedades de los plaguicidas analizados

Fuente: Elaboración por parte del equipo INTEC en base a las Hojas de Seguridad de los formulados comerciales.

Agroquímico	Tipo	PM (g/mol)	Solubilidad en agua (20°) (mg/L)	Log Kow	Log Koc	Movilidad en suelo	T _{1/2} en aguas (días)	T _{1/2} en suelos (días)
Imidacloprid	Insecticida	255,70	0,61	0,57	2,64	Moderada	Mayor 30	30 a 1200
Carbendazim	Fungicida	191,07	0,006	1,50	2,35	Moderada	60	40 a 200
λ cialotrina	Insecticida	449,35	Baja	5,5	5,19 (aprox)	Inmóvil	30	6 a 40
Azoxistrobina	Fungicida	403,4	6	2,5	2,5	Moderada	214	72-164
Abamectin B1a	Insecticida	873,09	0,01	2,02	3,75	Baja	3	14-20
Metolaclor	Herbicida	283,80	530	3,4	2,079	Moderada	97-200	15-70
Tebuconazole	Fungicida	307,82	36	3,7	2,88	Moderada	365	47

Una de las primeras actividades en el predio (que se sostuvo a lo largo del tiempo de realización de la presente tesis) fue charlar, indagar y consultar con los productores sobre sus prácticas habituales y en especial, relacionarse con ellos a la hora de la aplicación de diversos productos químicos en sus lotes. Se registró a través de entrevistas la frecuencia de aplicación, medidas de seguridad tenidas en cuenta, horarios, costumbres y equipos utilizados. En las Figuras 19 a 23 se muestran algunas imágenes que revelan estas actividades.



Figura 19: Entrevistas y charlas con los productores en el predio experimental Ángel Gallardo.



Figura 20: Acompañamiento de las tareas en el predio experimental Ángel Gallardo.



Figura 21: Acompañamiento de las tareas en el predio experimental Ángel Gallardo.



Figura 22: Charla con los productores que además viven en el predio experimental Ángel Gallardo.



Figura 23: Colecta de envases con restos de plaguicidas junto a los productores.

Conocer sus prácticas y rutinas fue fundamental para diseñar e instalar el sistema de camas biológicas y que fueran realmente utilizados y tenidos en cuenta como algo útil y positivo para su salud y la del ambiente de trabajo. Establecer esta relación fue esencial para que los productores no interpretaran la utilización de estos sistemas como un trabajo extra a sus jornadas laborales.

Para probar la eficacia de las camas biológicas instaladas, ya que no hay efluentes de lavado del material utilizado, se pidió la colaboración de los productores para coleccionar esos restos de plaguicidas ya preparados y no utilizados. De esta manera, no solo se evita su llegada al ambiente, sino que no se realiza una sobredosis a la producción vegetal evitando su llegada a los consumidores.

Para acopiar estos efluentes se colocaron dos bidones provistos por el equipo de trabajo del INTEC en la sala donde se guardan los plaguicidas y las mochilas y otros elementos de trabajo al finalizar las jornadas (Figura 24). Esta sala se encuentra dentro del predio experimental. Su organización y orden formó parte de las tareas realizadas dentro del predio, para mejorar las condiciones de higiene y seguridad del trabajo con plaguicidas (Figuras 25, 26 y 27). Se separaron por tipo de producto, identificando los sectores para cada tipo y a su vez se incorporaron las hojas de seguridad correspondientes. Asimismo, se retiraron objetos y materiales en desuso.



Figura 24: Contenedores identificados para recolectar los restos de plaguicidas preparados y no utilizados.



Figura 25: Estado inicial del sector de acopio de plaguicidas.



Figura 26: Mejoras en el orden de la sala de guardado de plaguicidas.



Figura 27: Mejoras en el almacenamiento de los plaguicidas.

La muestra residual es un cóctel de 20 litros correspondiente a la totalidad de “sobrantes” de los productos aplicados en el predio por los tres productores en un lapso de tres meses de trabajo. Esto determinó que no haya certezas de las cantidades, tipos o concentraciones de los preparados, situación que le otorga al trabajo la posibilidad de tratar con efluentes reales que se originan en las parcelas hortícolas del cinturón verde de la ciudad de Santa Fe. De todas formas, esta muestra fue caracterizada para conocer la concentración de plaguicidas presentes tal como se indica en la sección Materiales y Métodos, Determinaciones Químicas, Biológicas y Bioensayos, Determinación de plaguicidas.

3.2. Construcción de camas biológicas para una producción hortícola del periurbano santafesino

Para la preparación de la biomezcla se utilizaron materiales del mismo predio agrícola del INTA, favoreciendo tanto la adaptabilidad de los microorganismos presentes en las matrices como la facilidad de colección y preparación por parte de quien lo quisiera implementar en sus parcelas (Figura 28).



Figura 28: Colecta de residuo hortícola en un lote atacado por un hongo, sin posibilidades de comercialización. Mayo 2019

3.2.1. Materiales empleados

3.2.1.1. Compost

En este trabajo el compost se obtuvo de compostar la mezcla de cama de pollo y residuos hortícolas, en particular de repollo colorado y achicoria durante un lapso de 5 semanas. Fueron los vegetales de estación que más se cultivaron y su abundante disponibilidad facilitó su uso en los meses de preparación de las camas biológicas. La cama de pollo provino de un establecimiento avícola de la localidad de San Agustín, provincia de Santa Fe y los residuos hortícolas fueron colectados en el mes de febrero en el predio del INTA, de uno de los lotes en producción.

En el predio se utiliza cama de pollo para realizar el abono de los lotes que es comprada en grandes cantidades. Es el abono que se utiliza en el predio con normalidad y, por lo tanto, para los productores de la zona, es de fácil acceso.

El proceso de compostaje de la mezcla de cama de pollo y residuos hortícolas se realizó en un sector de las instalaciones de la Planta Piloto del INTEC (UNL-CONICET) bajo condiciones de intemperie, al resguardo de lluvias, durante 28 días. La mezcla fue puesta en 4 bateas plásticas de 10 litros de capacidad total (Figuras 29 y 30). De forma periódica (semanalmente) y en el mismo rango horario, se controló la humedad (alrededor de 60 %) y la aireación (mediante volteo manual), de manera que estos factores se mantuvieran relativamente constantes durante todo el proceso de compostaje. También se midieron la temperatura y el pH de cada uno de los recipientes (Figura 31).



Figura 29: Armado de las bandejas para compostar con la Dra. Masin. Mayo 2019



(a)



(b)

Figura 30: Bandejas del material compostando en las instalaciones del INTEC.

a) Mayo 2019 b) Junio 2019



Figura 31: Control de temperatura y humedad del compost ya madurado. Mayo 2019

Durante el proceso de compostaje, el rango de temperatura registrado en el sustrato mezcla osciló entre $24,1 \pm 1,9$ y $32,2 \pm 1,2$ °C, siendo en general valores superiores a 10 °C e inferiores a 40 °C. Por otra parte, el pH inicial registró un valor cercano a la neutralidad (6,7), incrementándose a levemente alcalino con valor de 7,7 a los 35 días. En consideración a los valores de ambos parámetros, la mezcla se caracterizó por transitar una prolongada etapa mesófila (10 – 45 °C), con un rango de pH dentro del óptimo (5,5 – 8,0), donde los microorganismos (bacterias y hongos) mesófilos desarrollados tienen el potencial para actuar en procesos de oxidación aeróbica y nitrificación de compuestos carbonados y de aquellos resistentes a la biodegradación (tales como restos de celulosa y lignina) (Moreno y Moral 2008; Lavado 2012). Lo mencionado puede apreciarse en las Figuras 32 y 33.

El volteo periódico contribuyó a una aireación adecuada ya que, mediante esta técnica, se reactiva el proceso debido a la incorporación, al interior del sustrato, del material expuesto en

la superficie del mismo, proporcionando un sustrato degradable para la biomasa microbiana (García Gómez et al., 2003). Por otra parte, el mantenimiento del contenido de humedad de los sustratos benefició el sostenimiento de la actividad microbiana.

Por el tiempo de compostaje que se aplicó a los materiales de la mezcla, con desarrollo de temperaturas mesófilas (no mayores a 40 °C) y valores de pH óptimo, el compost obtenido no llegó a un estado de madurez, de estabilidad, sino de inmadurez. Esta condición de la mezcla compostada fue la requerida, donde todavía presenta fuentes de carbono y nitrógeno a degradarse y una carga diversa y activa de microorganismos (bacterias y hongos), que aportarán actividad biológica a los materiales de un tipo de cama biológica (CBI). Monaci y col. (2007) reportan que la maduración prolongada de un compost generalmente reduce la eficiencia de degradación en camas biológicas, ya que un compost de 12 meses fue superado por un compost menos maduro.

Las propiedades fisicoquímicas del compost a los 35 días se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas del compost utilizado

Propiedades	Unidades	Valores
pH	unidades de pH	7,3
Humedad	%	30
Materia orgánica	% en masa seca	20

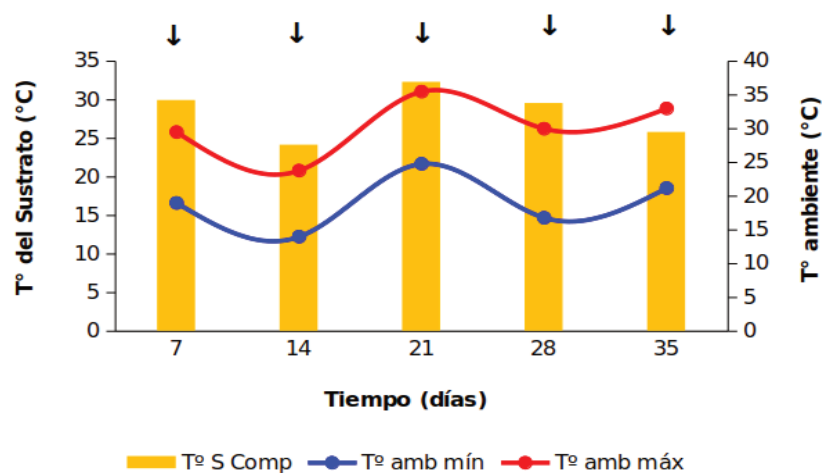


Figura 32: Evolución de la temperatura (°C) en el sustrato mezcla durante el período de compostaje⁵. Las flechas negras indican los volteos.

⁵ Los registros de T ambiente fueron los registrados por el Centro de Información Meteorológica (CIM) de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas de la UNL.

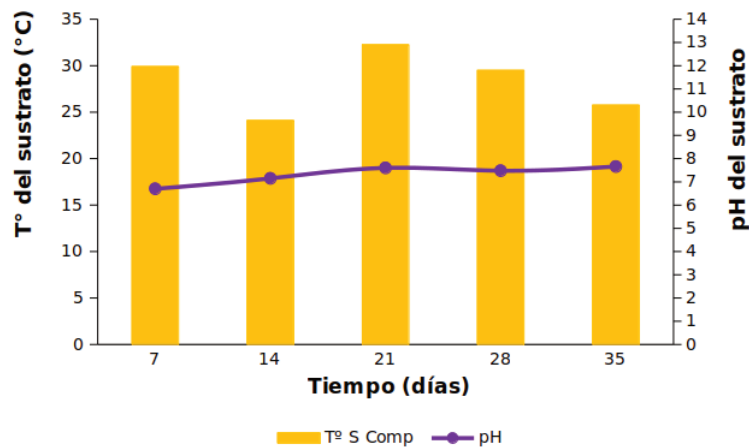


Figura 33: Registro del pH en el sustrato mezcla durante el período de compostaje.

3.2.1.2. Residuo Hortícola

Se trabajó con el residuo que se encontraba en los lotes en el momento de realizar el trabajo. En ese sentido se pudo colectar residuo proveniente de tres cultivos hortícolas de amplia producción en el predio: repollo morado, achicoria y lechuga. En los tres casos, los cultivos contienen un alto porcentaje de humedad por lo que hubo que someterlos a procesos de secado. En este punto es interesante resaltar que el método más efectivo fue el secado a la intemperie: al sol y al viento. Esta experiencia permite recomendar que la preparación del residuo hortícola y de las camas biológicas en general aproveche los meses más cálidos y de más horas de sol para poder colocar a secar las hojas y tallos colectados.



Figura 34: Secado de residuo hortícola (lechuga). Mayo 2019

En este trabajo se colocaron las hojas del residuo hortícola en una capa, teniendo en cuenta que no quedaran pilas del material, sobre un silobolsa extendido y colocado a secar al sol directo, aproximadamente 12 días durante de 3 o 4 horas por día (Figura 34).

Cabe destacar que la reducción del material es muy importante, lo que constituyó uno de los problemas centrales de la preparación previa de las camas biológicas, fundamentalmente por el tiempo que insumió.

3.2.1.3. Rastrojo

Para aportar material lignocelulósico se eligió trabajar con rastrojo de maíz proveniente de un lote en Aldea Santa María, Departamento Paraná, Entre Ríos, con el cual se tenía contacto previo. Si bien es un cultivo presente en la zona y al que fácilmente se puede tener acceso, en el momento del armado no estaba disponible en el predio del INTA y por eso fue colectado y llevado al INTEC. El rastrojo se encontraba ya seco en el campo, por lo que no fue necesario someterlo a secado. En dichas instalaciones se procedió a cortarlo, a mano y con tijeras de podar hasta alcanzar el tamaño de chips de aproximadamente 10 cm (Figura 35).



Figura 35: Rastrojo de Maíz.

3.2.1.4. Suelo

El suelo colectado para las biomezclas provino del mismo predio del INTA y se tomó de lotes en producción, es decir que es suelo de uso agrícola, que ya no cuenta con cubierta vegetal. La profundidad a la que se recolectó el suelo nunca excedió los 15 cm (Figura 36).

El suelo elegido ha sido expuesto previamente a los plaguicidas, un aspecto crítico a ser considerado, para poder lograr una población microbiana adaptada en las biomezclas. (Rodríguez-Castillo 2018).



Figura 36: Colecta de suelo de un lote activo. Septiembre 2019

La caracterización del suelo se obtiene de datos proporcionados por el INTA en sus Cartas de Suelo. Los valores de las variables de interés para el presente proyecto se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6: Características del suelo. Serie Ascochinga (ASC) - Datos analíticos

Fuente: Carta de suelos Hoja 3160-26 y 25; Esperanza-Pilar; 1991.

INTA Estación Experimental Agropecuaria Rafaela

Horizonte		A	E
Profundidad muestra	cm	0	24
		24	34
Mat. orgánica	%	1,55	0,33
C orgánico	%	0,90	0,19
N total	%	0,120	0,075
Relación C/N	---	8	3
pH pasta (1:1)	---	5,2	5,4
pH agua (1:2,5)	---	5,3	5,9
Ca⁺⁺ intercambio	me/100g	5,7	4,2
Mg⁺⁺ intercambio	me/100g	1,3	1,7
Na⁺ intercambio	me/100g	0,3	0,8
K⁺ intercambio	me/100g	0,5	0,5
C.I.C. (T)	me/100g	9,4	9,1

En la Tabla 7 se pueden ver las propiedades fisicoquímicas de los materiales hortícolas colectados y utilizados en las biomezclas.

Tabla 7: Propiedades fisicoquímicas de materiales utilizados en las biomezclas.

Fuente: Elaboración por parte del equipo INTEC

Parámetro (%)	Repollo	Rastrojo de Maíz
Materia Orgánica	89,5	83,7
Materia Seca	90	87
Cenizas	0,6	3,3
Fibra bruta	3,6	36,1
Fósforo	0,023	0,03
Nitrógeno	0,41	0,74

3.2.2. Diseño de camas biológicas

Para la realización del presente trabajo se diseñaron dos tipos de camas biológicas con sus respectivos blancos o controles (sistemas sin aplicación de plaguicidas). Las camas biológicas fueron estancas, realizadas en tachos de 200 litros, adquiridos en la empresa Tambores Trod con sede en la ciudad de Esperanza, Santa Fe. Se diseñaron en este tipo de contenedores de fácil acceso para los productores, ya que se debe tener en cuenta que uno de los objetivos es que los productores se apropien de la técnica y la aplique en sus predios (Figura 37). La composición de las camas biológicas se especifica en la Tabla 8.



Figura 37: Camas biológicas y blancos instalados en el predio

Tabla 8: Composición de las camas biológicas

Cama Biológica	Porcentaje en volumen (%)			
	Rastrojo de Maíz	Residuo Hortícola	Compost	Suelo
Cama Biológica I (CBI)	35	15	25	25
Cama Biológica II (CBII)	35	15	0	50

Para cada una de las camas biológicas se construyó un correspondiente blanco de un volumen de 25 litros.

El armado fue realizado en el mismo lugar en el que las camas quedarían fijas ya que se debe tener en cuenta que una vez armadas el traslado se torna dificultoso por el peso y la estructura de los tachos utilizados como base de las mismas. Es clave identificar en un comienzo un lugar accesible, al resguardo del sol directo y principalmente de las lluvias. También se debe tener en cuenta que el espacio elegido no sea de alto tránsito ni dificulte las tareas cotidianas de los productores a fin de que la tecnología propuesta sea aceptada y no una complicación a su jornada. En este caso el sitio elegido fue dentro del invernadero del predio, bajo las mesadas de trabajo.

En primer lugar, se preparó la totalidad de los materiales, tanto los que se estaban acondicionando en las instalaciones del INTEC, como los que se tenían en el mismo predio del INTA (Figura 38). Se rotularon todos los tachos para que sean correctamente identificados en todo momento (Figura 39).

Se eligió una ubicación al resguardo de las inclemencias climáticas. Esto es sumamente importante ya que una lluvia copiosa puede inundar la cama biológica o generar un exceso de humedad que no permita al sistema funcionar de la mejor manera. En esta experiencia, además de trabajar bajo el invernadero y poder asistir al lugar de manera asidua, se contaba con las tapas de los tachos para las dos camas biológicas y una tapa armada con material impermeable para el caso de los blancos (Figura 44). Cuando el pronóstico meteorológico anunciaba condiciones desfavorables las camas biológicas eran resguardadas para destaparlas una vez pasado el temporal. Asimismo, el fortalecimiento del vínculo con los productores permitió acceder a sus números telefónicos para, en caso de emergencia, solicitar que taparan las camas y los blancos.

El relleno de los tachos se realizó comenzando con una capa de canto rodado y una de arena de manera de constituir el fondo de las camas biológicas y generar un soporte de la biomezcla en su parte inferior. A su vez, si se piensa en la colocación de algún tipo de colección de lixiviados, el canto rodado actuaría de filtro para retener partículas sólidas (Figura 40 y 41).

Se realizó la homogeneización de los materiales descritos en la Tabla 8 mediante técnicas y herramientas manuales según los porcentajes correspondientes a la CB I y II y sus respectivos blancos para ser incorporados finalmente a los tachos (Figura 42). Una vez llenos con los materiales se los regó con agua potable hasta alcanzar una humedad del 80%, la cual se mantuvo a lo largo de toda la experiencia (Figura 43). A partir de este momento comenzó la maduración de las camas biológicas por un periodo de 70 días previos a la aplicación de los plaguicidas. Esta etapa se realiza fundamentalmente para favorecer el desarrollo de los microorganismos presentes en la biomezcla.



Figura 38: Disposición de los materiales para la construcción



Figura 39: Etiquetado de los camas biológicas y sus blancos



Figura 40: Disposición de grava gruesa sobre la base



Figura 41: Cubierta de arena



Figura 42: Mezcla proporcional de los componentes



Figura 43: Riego para llevar la humedad al 80%



Figura 44: Funcionamiento de la cobertura de uno de los blancos después de una lluvia

3.2.3. Plaguicidas

Se regaron ambas camas biológicas con 8 litros de solución colectada de plaguicidas y se controlan, nuevamente, la humedad a fin de mantenerla siempre a un nivel no menor del 60%.

Los blancos fueron regados de manera proporcional a su volumen con agua de red.

Asimismo, de la mezcla de plaguicidas colectados, se tomó una muestra lo más homogénea posible en frasco de vidrio color caramelo de 200 mL y se la refrigeró hasta su análisis.

3.3. Determinaciones fisicoquímicas, biológicas y bioensayos

Para poder realizar un seguimiento de la evolución de la fitotoxicidad, la actividad microbiana, la degradación de los plaguicidas y evaluar de esta manera el desempeño de las biomezclas se plantearon y realizaron los ensayos presentados en la Tabla 9.

El día -1 corresponde al momento inmediato anterior del ingreso de los plaguicidas al sistema.

El día 0 corresponde a 24 horas después de la incorporación de los plaguicidas.

Para la totalidad de ensayos a realizar se tomó una muestra compuesta de cada cama biológica y de cada blanco. Las muestras se colectaron con muestreador metálico de barrena intentando

tomar una muestra representativa de la totalidad del perfil y en 4 puntos por cada cama biológica y blanco.

Para la determinación de las enzimas y los bioensayos las muestras fueron guardadas en bolsas plásticas herméticas rotuladas con la fecha, el número de cama biológica y el nombre de la operaria. En el caso del recuento de bacterias, hongos y levaduras se tomaron las muestras en colectores estériles de 100 mL de capacidad con las mismas anotaciones. Al finalizar el proceso fueron llevadas al laboratorio y colocadas en estufa a 25° C y posterior procesamiento según la técnica a realizar.

Tabla 9: Ensayos planificados y realizados sobre las camas biológicas

Ensayos realizados	Días de Muestreo					
	Inicial -1	0	30	60	90	120
Recuento de bacterias mesófilas totales y hongos	x	x				
Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA)	x	x	x	x	x	x
Determinación de Actividad Fenoloxidasas (FOX)	x	x	x	x	x	x
Germinación		x	x	x	x	x
Test de Huida					x	x
Determinación de plaguicidas		x				x

3.3.1. Recuento Biológico

Se realizó el recuento de bacterias mesófilas totales y hongos y levaduras en dos ocasiones: antes de adicionar la mezcla de plaguicidas y 24 horas después de su incorporación (Figura 45).

Para realizar el recuento biológico en las biomezclas se utilizó la técnica adaptada de Bórtoli 2012 y Ratcliff 2016 (recuento en placa) por el grupo de investigación.

Para el recuento de bacterias mesófilas totales, las placas se incubaron a 30°C durante 24 a 48 horas y para los hongos y levaduras se empleó la misma temperatura en un periodo de 5 a 7 días.

Para el recuento, luego del tiempo de incubación, se tuvieron en cuenta aquellas diluciones cuyas UFC estuvieran entre 30 y 300 UFC g biomezcla⁻¹ por placa para las Bacterias y entre 15 y 150 UFC g biomezcla⁻¹ en cada placa para los hongos y las levaduras.

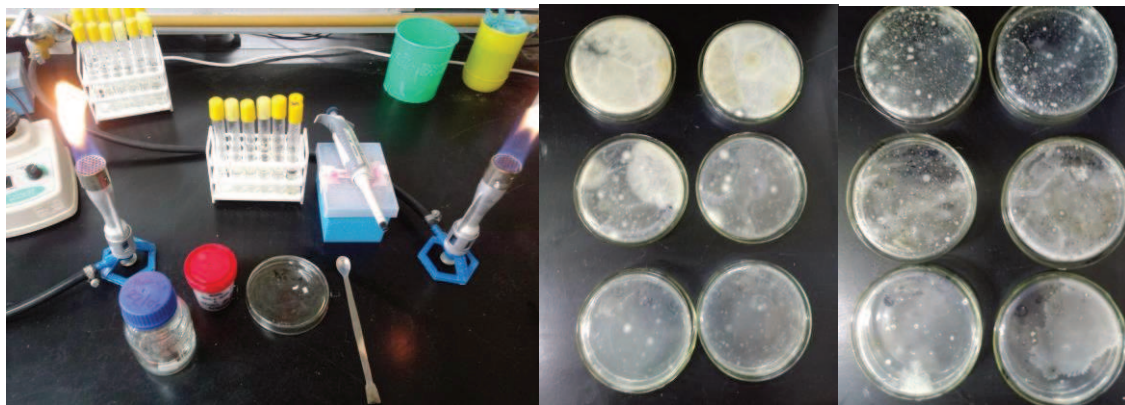


Figura 45: Recuento de levaduras y hongos presentes en las camas biológicas.

3.3.2. Determinación de Actividad Fenoloxidasas (FOX)



Figura 46: Hongo blanco encontrado en el sustrato el día 0.

Para la determinación de la actividad fenoloxidasas en la biomezclas se utilizó la técnica de Castillo y col. 1994 y Tortella y col. 2012 con algunas modificaciones. El detalle de la técnica utilizada puede consultarse en el anexo.

La medición espectrofotométrica se realiza a 590 nm, con coeficiente de extinción de 53000 $M^{-1} cm^{-1}$ (de Castillo y col. 1994) siendo la longitud de paso cubeta de 1 cm.

En la figura 46 se aprecia una muestra de la biomezcla en la que se puede observar al “hongo planco”.

3.3.3. Determinación de Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA)

Para la determinación de FDA en el presente trabajo se utilizó una adaptación de Schnurer y Rosswall, 1982; Adam y Duncan, 2001 para aplicar en suelos y biomezclas (Lescano y col. 2018). El límite de detección es de 0,04 ppm y el límite de cuantificación de 0,14 ppm. El detalle de la técnica puede consultarse en el Anexo.

3.3.4. Bioensayos de toxicidad aguda con semillas

Para la realización de estos ensayos se siguió un procedimiento para el cual se utiliza como base la técnica para muestras líquidas de la USEPA (1996) con algunas modificaciones para muestras sólidas y para su análisis, se emplean los trabajos de Bagur-González y col. (2011).

Se utilizaron semillas de Lechuga *L. sativa* (variedad grand rapid) provistas por el programa Pro-Huerta⁶ del INTA (cosecha 2018). Las mismas se clasificaron manualmente, tratando de trabajar con semillas de tamaño, forma y color lo más homogéneas posible.

Mediante este procedimiento se expusieron las semillas a las biomezclas de las dos camas biológicas y sus respectivos blancos a través de los sucesivos muestreos. Luego se colocaron las placas en estufa a 24°C durante cinco días. Finalmente, se midió la elongación radicular y se contabilizó el número de semillas germinadas por placa (Figura 47). Asimismo, se registraron posibles anomalías como alteraciones en el color o morfología radicular.

⁶ El programa ProHuerta depende del Ministerio de Desarrollo Social de la Nación así como del INTA y celebra en el 2020 30 años de vida acercando a las familias argentinas semillas seguras para la producción de alimentos.

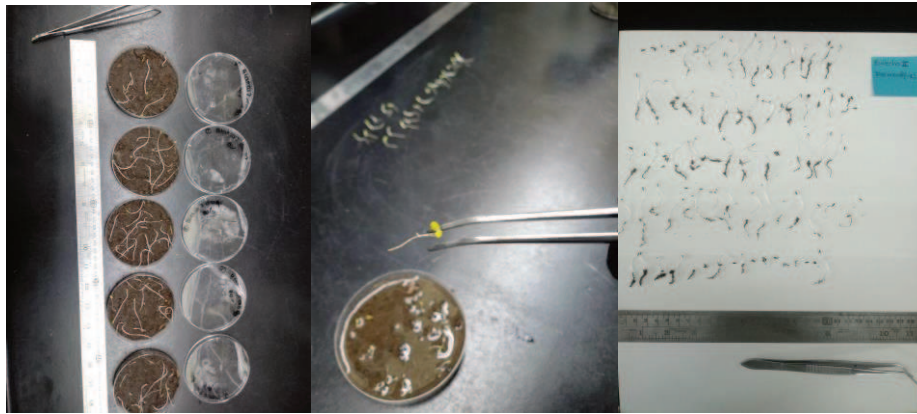


Figura 47: Secuencia del ensayo de germinación.

La experiencia se realizó también sobre el suelo del predio (sin madurar con otros componentes de la biomezcla) a modo de referencia. Cada muestra se ensayó por quintuplicado (n =100 semillas).

3.3.5. Bioensayo de Huida

En este proyecto se utilizó el bioensayo de conducta llamado de huida o evasión con la lombriz *E. fetida*. Esta prueba se usa como herramienta de monitoreo de alerta temprana de toxicidad de suelos, ya que permite evaluar en corto tiempo (48-72 horas) el efecto de éstos sobre la capacidad de las lombrices para seleccionar un hábitat para sus procesos biológicos y ecológicos.

Los bioensayos se realizaron siguiendo la norma ISO 17512-1 (2008), el detalle de la técnica puede consultarse en el Anexo. El ensayo se realizó en contenedores de vidrio, cada uno dividido en dos compartimentos por un separador removible. Una mitad contenía 250 g de la muestra contaminada (biomezclas I o II) y la otra igual cantidad pero de suelo control (de una zona sin actividad antrópica). El separador fue removido y en el espacio se colocaron 10 ejemplares clitelados de *E. fetida*, criadas en el bioterio de INTEC. Transcurridas 72 h (con un régimen de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura ambiental de 22 ± 2 °C), se dividió nuevamente el sustrato mediante separador y se contabilizó el número de individuos presentes en cada una (Figura 48).

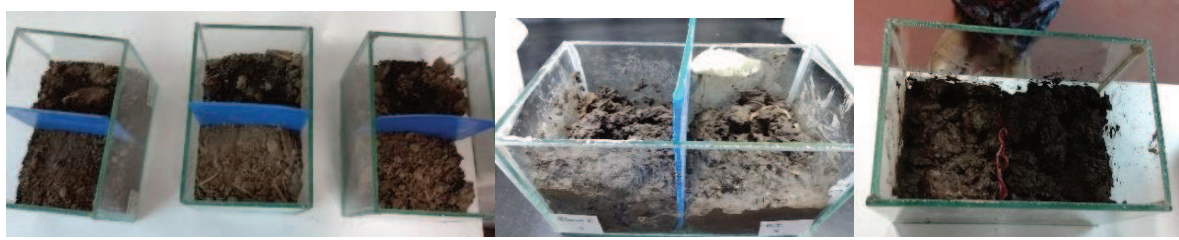


Figura 48: Secuencia de la realización del Test de Huida

3.3.6. Análisis de plaguicidas

La composición de la mezcla de plaguicidas aplicados, así como su presencia se determinó a las 24 horas después de la realización del riego con plaguicidas y luego de transcurridos 120 días de la experiencia. En ambos casos la caracterización de los plaguicidas presentes en las dos camas biológicas se realizó en el Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos, PRINARC de la FIQ-UNL utilizando dos réplicas por muestra. Los análisis se llevaron a cabo aplicando métodos estándares aprobados por organismos internacionales (EPA, SM, entre otros), y técnicas oficiales validadas en el laboratorio, alcanzando los niveles establecidos en las regulaciones internacionales. Estas determinaciones fueron realizadas por el equipo de la profesora María Rosa Repetti, responsable del Área Cromatografía-Espectrometría de Masa. El detalle de las técnicas utilizadas se encuentra en el Anexo.

3.4. Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos se sometieron al análisis de la varianza de una vía (ANOVA), y los promedios se compararon mediante el test de Duncan, con un 95 % de confianza. Se empleó el software de uso libre R (versión 2.3.3.3).

4. Resultados y discusión

4.1. Relevamiento inicial

Esta experiencia, la primera en terreno por fuera de los laboratorios y el predio del INTEC CONICET, permitió en primera medida conocer los tiempos y algunas de las necesidades de los productores del cordón hortícola santafesino.

La primera instancia de relevamiento abrió las puertas a la realización de un convenio con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria quienes pusieron a disposición el centro Experimental de Ángel Gallardo y nos dieron libertad y autonomía para ingresar y relacionarnos con el personal que trabaja en el predio.

El desafío de construir las camas biológicas en parcelas productivas, en condiciones reales de tiempos, inclemencias climáticas y prioridades temporales y económicas de los procesos productivos demostraron que la estación preferencial para preparar los residuos hortícolas debía ser el verano, permitiendo que las altas temperaturas y el sol efectivicen el proceso, sin atravesar pérdidas de material ni de tiempo.

Asimismo, luego de las entrevistas, se cambió la idea de utilizar las camas biológicas para tratar el agua de lavado, ya que ese proceso es casi inexistente en las parcelas de interés. En lugar de intentar cambiar un hábito muy común entre los productores, se cambia el diseño experimental, ya que la aceptación de los sistemas por parte de los trabajadores y el éxito de la implementación en más parcelas productivas depende realmente de que el sistema aporte a la solución de problemáticas sociales y ambientales, no a sumar dificultades o tareas que generen su abandono.

La presencia constante durante seis meses previos a la instalación de las Camas Biológicas y el relevamiento llevado adelante generó también que se pudiera intervenir en el orden y la limpieza del sector destinado al guardado de los plaguicidas y que se pudiera implementar una carpeta con las hojas de seguridad de todos los productos utilizados.

4.2. Difusión de las actividades realizadas en el predio

4.2.1. Jornadas Institucionales en el INTA

El viernes 2 de agosto de 2019 se realizó una “Jornada Interna de Capacitación” para los coordinadores del Centro Experimental Ángel Gallardo (Figura 49).

En esta jornada se presentó el proyecto, los alcances y avances realizados hasta ese momento.



Figura 49: Jornada interna de capacitación en el Centro Operativo Ángel Gallardo

El 9 y 10 de septiembre de 2019 se publicaron desde INTA Informa dos videos explicativos del trabajo que se venía realizando, en los que se incluye una entrevista a la Dra. Cristina Zalazar y a la autora de esta Tesis y una visita a los laboratorios del INTEC (UNL-CONICET) por parte del área de comunicación del INTA (Figura 50).



Figura 50: Imágenes de la difusión institucional del proyecto por el INTA

Fuente: Facebook INTA Monte Vera

Por último, el 22 de octubre del mismo año se formó parte del Ciclo de Actualización Técnica para Profesionales en Producciones Intensivas que se llevó a cabo en el Centro Operativo Experimental Ángel Gallardo (Figura 51).

En esta instancia se pusieron en común la actualización de programas, ensayos e investigaciones que técnicos y profesionales llevan adelante desde INTA, en articulación con el Gobierno de la Provincia de Santa Fe, SENASA, CONICET y Facultades de la región.

Presentamos el panel “Camas biológicas para reducir la contaminación ambiental por el uso de plaguicidas”.



Figura 51: Imagen de difusión de la actividad mencionada

Fuente: Modificada de INTA Monte Vera

4.2.2. Taller “Lechos Biológicos en tiempos de COVID-19”

Los días jueves 3 y viernes 4 de diciembre de 2020 a través de la plataforma ZOOM se llevó adelante el Taller “Lechos Biológicos en tiempos de COVID-19” organizado por el Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT) del Departamento de Química Orgánica de Facultad de Química y del Departamento de Química del Litoral, CENUR del Litoral Norte de la Universidad de la República, Uruguay, en conjunto con el “Proyecto Plaguicidas”(MSP-MGAP-MA-FAO-GEF), con el apoyo de la Red Latinoamericana de Lechos Biológicos y la Red Analítica de Latino América y el Caribe (RALACA). Este taller reemplazó al IV Workshop Latinoamericano sobre Lechos Biológicos 2020, que debería haber tenido lugar en Montevideo, Uruguay, en forma presencial debido a las repercusiones de la pandemia.

Se participó del taller presentando un e-poster (Figura 52), el cual fue aprobado y publicado en la página web del evento que se puede visitar en el link: <http://www.lechosbiologicos2020.com/>

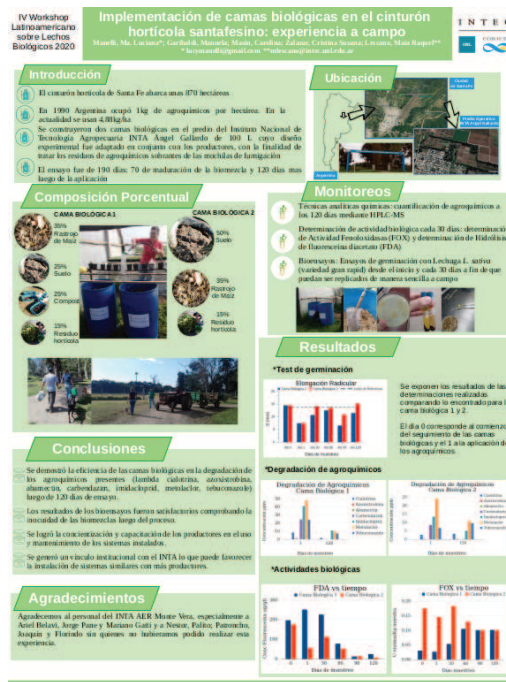


Figura 52: Miniatura del e-poster presentado

4.3. Resultados de los ensayos

4.3.1. Análisis de plaguicidas

Se realizó en primera medida el análisis de una porción del cóctel utilizado para aplicar sobre las camas biológicas. El mismo arrojó como resultado la presencia de λ cialotrina, azoxistrobina, abamectin b1a, carbendazim, imidacloprid, metolaclor y tebuconazole en las concentraciones que se observan en la Tabla 10. De todos ellos, el único registrado en trabajos anteriores con biomezclas con incorporación de compost (Tabla 1) fue Azoxistrobina.

Tabla 10: Ensayo sobre la muestra líquida

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)
λ cialotrina	39
Azoxistrobina	1,4
Abamectin B1a	0,2
Carbendazim	28
Imidacloprid	69
Metolaclor	42
Tebuconazole	23
Captan	n.d.
THPI	n.d.
Clorotalonil	n.d.
Profenofos	n.d.*
Lufenuron	n.a.**

*n. d. No detectado. Límite de detección 1 parte por billón (ppb)

**n.a. No analizado

Asimismo, se realizó la extracción a los sustratos que componen las camas biológicas en el día inicial y final para la determinación de plaguicidas (Figura 53).

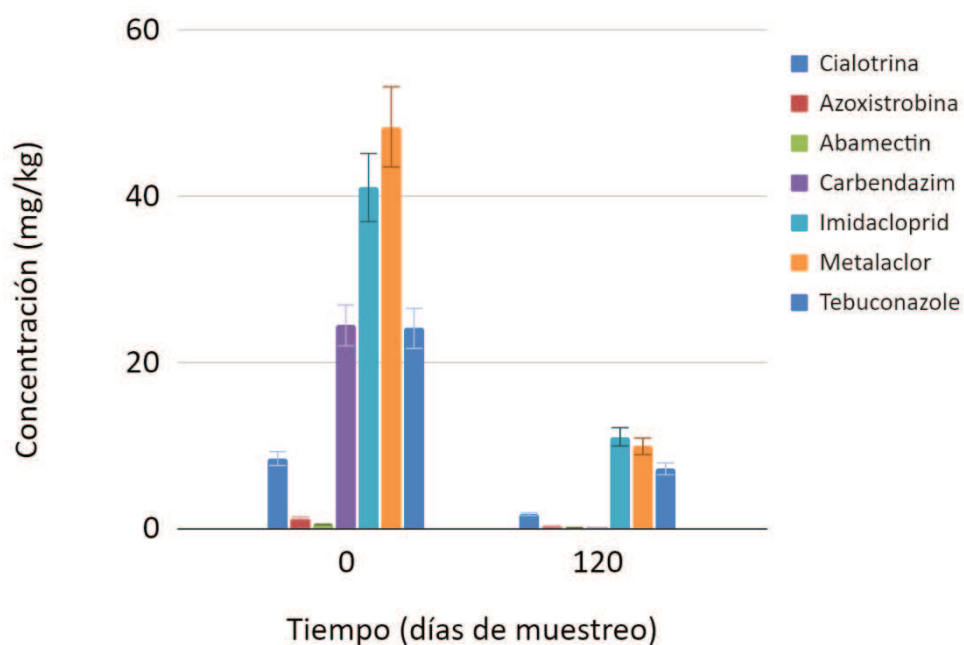


Figura 53: Detalle de una de las muestras al ser extraídas de la cama biológica

La Tabla 11 y la Figura 54 presentadas a continuación, ilustran las concentraciones en mg kg⁻¹ que se detectaron en el día inicial y 120 de la CBI incluyendo el porcentaje de degradación alcanzado.

Tabla 11: Ensayos sobre muestras sólidas de la Cama Biológica I

Compuesto	Cama Biológica I (mg kg ⁻¹)		Degradación %
	Día 0	Día 120	
λ cialotrina	8,4±1,5	1,7±0,3	79,76
Azoxistrobina	1,25±0,07	0,255±0,007	79,60
Abamectin B1a	0,45±0,01	0,08±0,01	82,81
Carbendazim	24,4±0,7	0,09±0,03	99,63
Imidacloprid	41,0±0,1	11,0±0,3	73,17
Metolaclor	48,3±1,3	9,85±0,5	79,61
Tebuconazole	24,05±3,32	7,15±0,49	70,27

**Figura 54:** Concentración de plaguicidas en los días 0 y 120 en CBI

Es importante remarcar que las concentraciones presentes en la CB II en el día inicial son un 30% menor (en promedio) que lo encontrado en la CBI. La diferencia entre las concentraciones determinadas en el día 0 puede deberse a las diferentes densidades de los sustratos presentes, a la forma de aplicar el cóctel sobre las camas biológicas (vertido con una probeta de un litro pero sin rociar la totalidad sobre la superficie) lo cual puede haber resultado en la elección de caminos preferenciales debido a la heterogeneidad de la biomezcla o a la tortuosidad que haya experimentado el efluente con plaguicidas al discurrir por la matriz.

Asimismo al conformar la mezcla de muestra a través de la extracción de submuestras, si bien se tomaron porciones cubriendo toda la cama biológica tanto en su altura como en su superficie, puede haber ocurrido una no representatividad absoluta de la matriz en su conjunto para cada una de las muestras.

La Tabla 12 y la Figura 55 presentadas a continuación ilustran las concentraciones en mg kg^{-1} que se detectaron en el día inicial y 120 de la CBII.

Tabla 12: Ensayos sobre muestras sólidas de la Cama Biológica II

Compuesto	Cama Biológica II (mg kg^{-1})		Degradación %
	Día 0	Día 120	
λ cialotrina	2,7±0,3	3,3±0,4	-
Azoxistrobina	0,3±0,1	0,355±0,007	-
Abamectin B1a	0,05±0,01	n.d.	100
Carbendazim	8,5±0,6	0,27±0,01	96,82
Imidacloprid	13,5±0,6	5,0±0,3	62,83
Metolaclor	24,1±0,6	10,9±1,2	54,98
Tebuconazole	6,8±0,01	9,55±0,07	-

*n. d. No detectado. Límite de detección 1 parte por billón (ppb)

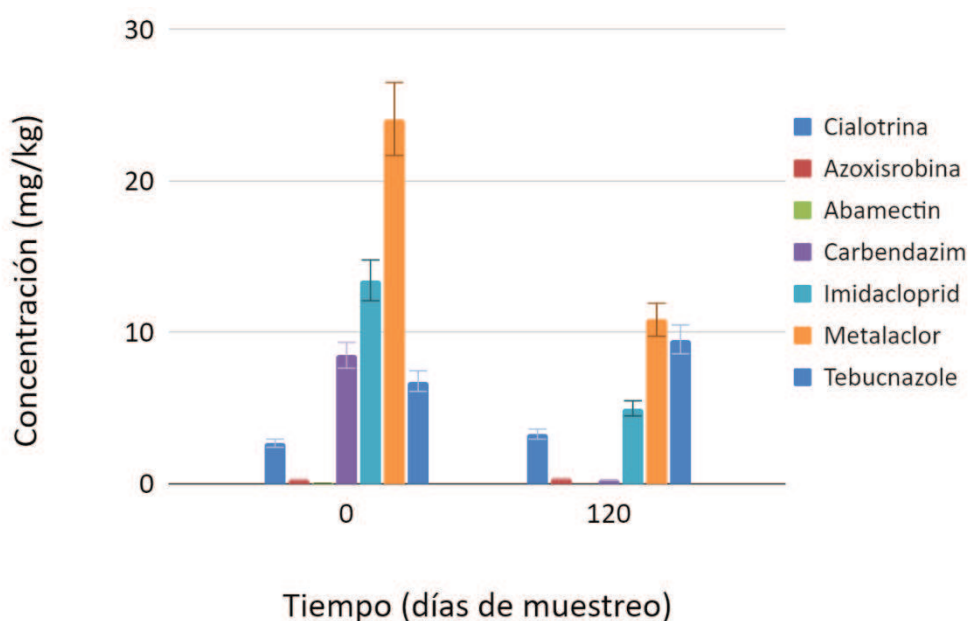


Figura 55: Concentración de plaguicidas en los días 0 y 120 en CBII

En el caso de la Cama Biológica I en 120 días se obtuvo una degradación superior al 70% para los siete plaguicidas analizados, superior al 80% en el caso del abamectin b1a y al 90% para el carbendazim. Se destaca especialmente el alto porcentaje de degradación obtenido para el imidacloprid con respecto a trabajos previos publicados donde se utilizaron concentraciones iniciales mucho menores y la degradación lograda fue menor.

Para el caso de la Cama Biológica II en 120 días se produce una degradación superior al 50% para todos los plaguicidas, superior al 60% en el caso del imidacloprid y superior al 90% en el caso del carbendazim. en el caso de los plaguicidas λ cialotrina, azoxistrobina, abamectin b1a y tebuconazole para los cuales no se observó degradación, y los valores finales fueron aún un poco mayor a los iniciales, se puede explicar en las propiedades de la biomezcla y la forma de aplicación de los plaguicidas como fue mencionado anteriormente.

En este punto es importante resaltar que tanto el compostaje de residuos hortícolas utilizados en el presente trabajo como los plaguicidas degradados son diferentes y complementarios de lo registrado en la bibliografía (resumido en la Tabla 1).

Es interesante comparar los datos de degradación propios con los obtenidos por otros trabajos y estudios previos, en los que se puede observar porcentajes de remoción similares o menores a los mostrados con anterioridad, lo que supone una elevada efectividad de las biomezclas para los compuestos analizados en los tiempos que duró el análisis, considerando además que tres de los compuestos son fungicidas, que por su función inherente, dificultan el desarrollo de la comunidad microbiana responsable, entre otros factores, de la degradación de los plaguicidas.

Rodríguez-Castillo y col. (2018) midieron la remoción de imidacloprid y thiamethoxam en biolechos y suelo. Al finalizar 228 días de tratamiento, los niveles de remoción identificados fueron bajos, pasando de 7 mg kg⁻¹ a 5 mg kg⁻¹ para el primer compuesto (porcentaje de remoción del 28,57%) y de 4 mg kg⁻¹ a 2,5 mg kg⁻¹ aproximadamente para el segundo (porcentaje de remoción del 37,5% aproximadamente) en biomezclas conteniendo suelo pre expuesto a imidacloprid.

En Uruguay, luego de 196 días se demostró que las concentraciones de metolaclor decrecían considerablemente, logrando una remoción cercana al 90%, pasando de 85000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ aproximadamente (S. Rezende y col. 2020)

Otro estudio llevado adelante en Chile demostró que, para un tratamiento de 40 días, partiendo de una concentración de 100 mg kg⁻¹ se logra una degradación de poco más del 60% del carbendazim, en biomezclas de arcilla con 5% de biocarbón y 20% de turba, otra biomezcla con 15% de biocarbón y 10% de turba y finalmente una biomezcla arenosa con 5% de biocarbón y 20% de turba (Diez y col. 2013).

4.3.2. Recuento biológico en sustratos

El recuento de hongos y levaduras y bacterias mesófilas se expone en la Tabla 13. La diferencia en las unidades formadoras de colonias contabilizadas entre los días iniciales (día -1) y 24 hs después de la aplicación de los plaguicidas (día 0) resultó estadísticamente significativa en todos los casos excepto en la Cama Biológica I para Hongos y Levaduras (Tabla 14). Es decir que tanto las Bacterias Mesófilas Totales en las CBI y CBII como los Hongos y Levaduras de la CB II fueron afectados por el agregado de la mezcla de plaguicidas, si bien no se tiene certeza de cuáles son esos microorganismos puntualmente y que rol juegan específicamente en la degradación de los compuestos adicionados.

Lo que se observa pasadas 24 horas del agregado de los plaguicidas en la CBI es que, tanto la concentración de hongos y levaduras como la de bacterias decrecen, lo cual indica sensibilidad hacia la mezcla de plaguicidas. Por el contrario, en la CBII se observó un aumento en las UFC lo cual indicaría el uso de plaguicidas como fuente de energía y/o de materia. Hay que tener en cuenta que en este caso la concentración de plaguicidas en la biomezcla fue significativamente menor y probablemente sea la causa de que no se visualice un efecto negativo sobre la comunidad microbiológica.

Tabla 13: Recuento de hongos y levaduras y bacterias mesófilas totales

	Hongos y Levaduras UFC g ⁻¹		Bacterias Mesófilas Totales UFC g ⁻¹	
	Día inicial -1	Día 0	Día inicial -1	Día 0
Cama Biológica I	1,35×10 ⁷	1,44×10 ⁶	1,34×10 ¹⁰	1,59×10 ⁹
Cama Biológica II	8,35×10 ⁵	4,5×10 ⁶	1,44×10 ⁸	8,85×10 ⁸

Tabla 14: Estadísticos para hongos, levaduras y bacterias mesófilas totales

	Hongos y Levaduras UFC g ⁻¹		Bacterias Mesófilas Totales UFC g ⁻¹	
	Valor p	Promedio	Valor p	Promedio
Cama Biológica I	0,1422	7,47x10 ⁶	0,0011	7,5x10 ⁹ *
Cama Biológica II	0,0043	2,66x10 ⁶ *	0,0009	1,02x10 ⁸ *

* indica una diferencia significativa.

4.3.3. Determinación de Actividad Fenoloxidasa

Tanto para la CBI como para la CBII los valores p, luego de aplicar ANOVA fueron menores a 0,05, es decir, que existió una diferencia estadísticamente significativa entre la media de las enzimas cuantificadas entre un nivel de días y otro, con un nivel del 95% de confianza.

En la Figura 56 se muestra la evolución de la actividad biológica (FOX), para las CB I y II y sus respectivos blancos.

Al realizar la prueba de Duncan de múltiples rangos se obtiene que en la CBI hay tres grupos homogéneos con diferencias estadísticamente significativas (-1-0), (30-60) y (90-120). Para la CBII hay diferencias significativas entre los valores obtenidos en el día -1 y el día 0 y a su vez, de éstos con los muestreos realizados en los días 90 y 120.

Para la CBI los niveles de FOX al día 120 fueron aproximadamente 4 veces mayores al valor inicial, habiendo partido de un valor inicial muy bajo en dicha cama. Para el caso de la CBII por el contrario los valores de FOX al finalizar el ensayo representan el 69,15% del valor inicial, habiéndose reducido en un 30,85%.

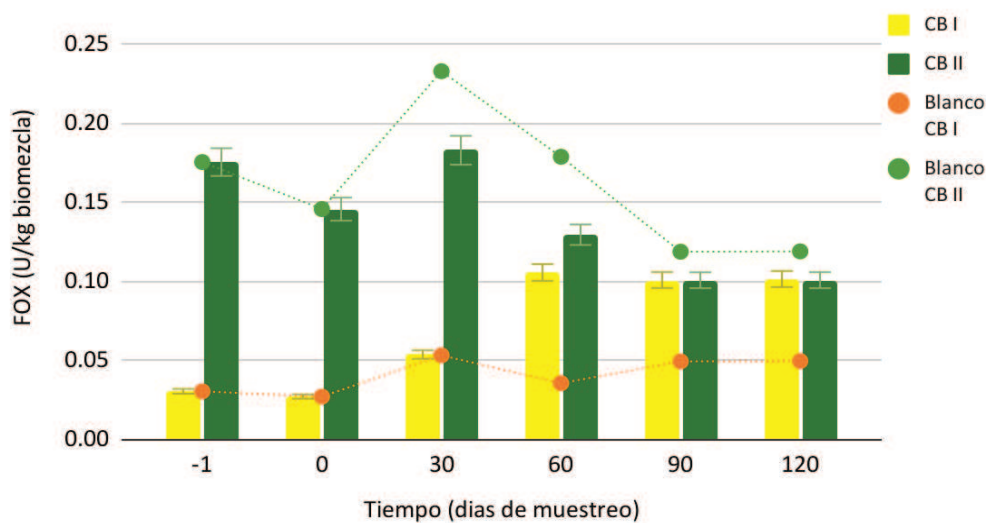


Figura 56: Evolución de la FOX durante los días de muestreo

Los valores obtenidos en el día 120 de muestreo indican que las camas biológicas se encuentran activas y podrían ser utilizadas nuevamente para otra aplicación de plaguicidas.

En trabajos previos realizados por el grupo se puede constatar valores de FOX similares; en un ensayo de 180 días. Los valores de FOX reportados fueron siempre superiores a 0,10 pero no llegaron nunca a 0,20 U kg biomasa⁻¹ (Lescano 2022).

Respecto de valores que se encuentran en la bibliografía, en un estudio de 40 días para tres tiempos de maduración diferentes de una biomasa compostada, los valores finales reportados fueron entre 7 y 14 U kg⁻¹ (Tortella y col. 2012). En otro estudio realizado en Chile en el 2016, en una biomasa compuesta de suelo Andisol mezclado con rastrojo de trigo y turba en proporciones volumétricas de 1:2:1 y aplicada con atrazina se midieron valores de actividad fenoloxidasa (U Kg⁻¹), registrando valores menores a 1 para el día inicial y el día 7 y valores menores a 2 para el día 15 y 30 (Elgueta y col. 2016).

Respecto de la evolución de la FOX en las CB y sus blancos, en el caso de la CBII los valores del control siguen una tendencia similar en el tiempo con los valores registrados para la biomasa aplicada (con un poco más de dispersión en los días 30 y 60). Para el caso de la CBI los valores de FOX del control siguen la misma tendencia de la biomasa aplicada solamente hasta el día 30 ya que a partir del día 60 el control siempre registró menor valor que la

biomezcla aplicada (aproximadamente la mitad). Este comportamiento podría deberse a un mejor aprovechamiento de los plaguicidas como fuente de energía y/o materia por parte de los microorganismos presentes, ya que esta biomezcla se caracterizó por tener mayor concentración de todos los plaguicidas (en promedio un 30 % mayor).

4.3.4. Determinación de Hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA)

En la Figura 57 se muestra la evolución de la Hidrolisis de fluoresceína diacetato (FDA) en el tiempo, para las CB I y II y sus respectivos blancos.

Las diferentes concentraciones de FDA, tanto en la CBI como en la CBII, tienen diferencias significativas entre un nivel de días de muestreo y otro (-1, 0, 30, 60, 90 y 120) arrojando un valor del estadístico $p=0,0000$ para la CBI y un valor de $p=0,0108$ para la CBII.

Para la CBI, aplicando la prueba de múltiples rangos (Duncan) se puede observar que hay diferencia significativa entre cada muestreo, teniendo entonces seis grupos homogéneos. Por el contrario, en el caso de la CBII solo se puede afirmar que hay dos grupos homogéneos formados por el día -1 y el resto de los días (0, 30, 60, 90 y 120).

En el caso de la CBI a las 24 horas de haber aplicados los plaguicidas (día 0) la concentración de la FDA es de $252,48 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y a los 120 días el valor es de $25,02 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, es decir un 90% menor.

En este mismo periodo, entre el día 0 y el día 120 para la cama biológica 1 se obtiene una degradación superior al 70% para los 7 plaguicidas analizados (ver apartado Análisis de plaguicidas).

En la Cama Biológica II para estos mismos periodos de tiempo el valor de FDA varía desde $55,97 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ a $7,44 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ registrando una disminución del 86,7%.

En ese mismo periodo de tiempo en el caso de la Cama Biológica II se produce una degradación superior al 50% para todos los plaguicidas (ver apartado Análisis de plaguicidas).

Estos resultados muestran que ambas biomezclas disminuyeron notablemente la actividad enzimática debida a enzimas hidrolíticas para el día 120, a diferencia de lo que ocurre con las enzimas de origen lignocelulósico en las cuales su disminución no fue tan marcada.

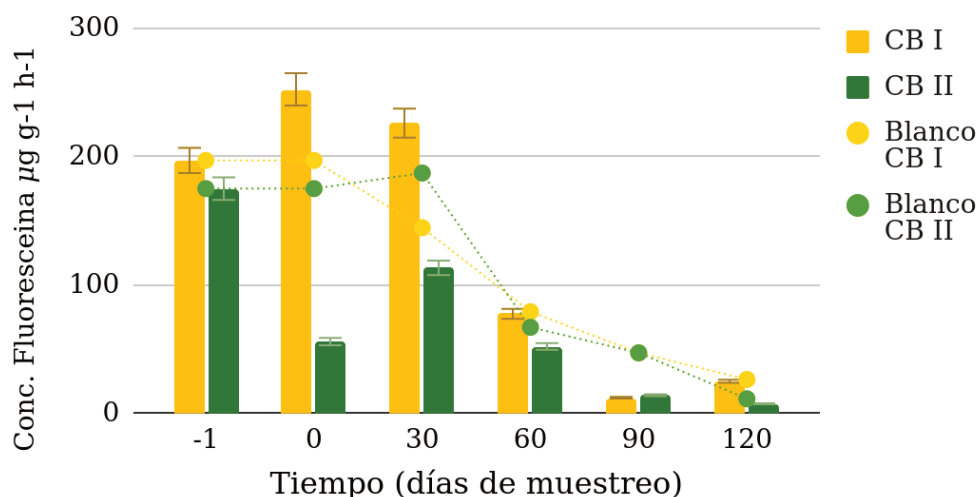


Figura 57: Evolución de la FDA durante los días de muestreo

Estos niveles de FDA son comparables a los reportados en trabajos previos por el grupo. Partiendo de niveles de $95 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para una biomezcla de suelo y moha en una proporción en volumen de 50 % de cada componente, tratada con una mezcla de plaguicidas compuesta de glifosato, atrazina, imidacloprid, prometrina y carbendazim luego de 180 días se tuvieron niveles menores a $10 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Lescano 2022).

En otro estudio realizado por el grupo en el que se construyeron 7 biomezclas compuestas por 50% de suelo, 25% de distintos rastrojos (maíz, trigo, trigo-soja, repollo y moha) y 25% de material humidificante (resaca de río) se encontraron valores iniciales entre 50 y $90 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y valores finales al día 50 de entre 10 y $30 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Estas biomezclas fueron tratadas con atrazina y 2,4-D (Pioli y Lescano 2020).

Los valores finales de FDA son similares también a los reportados por otros autores. En un estudio de 40 días para una biomezcla compostada durante tres periodos de maduración diferentes, los valores finales rondaron los $40 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Tortella y col. 2012).

También se evidencia un acompañamiento de los valores registrados en las biomezclas y sus blancos en el inicio de la experiencia, pero luego de la aplicación de plaguicidas en la CBII los valores son muy diferentes para el control y la biomezcla tratada. Esto podría deberse a un efecto inhibitor en la producción de este tipo de enzimas por la presencia de plaguicidas que posteriormente mejora restableciendo un valor más cercano al control en los muestreos posteriores.

4.3.5. Bioensayos de toxicidad aguda con semillas

Se calcularon tres parámetros para evaluar los resultados obtenidos en este bioensayo. El primero de ellos fue el porcentaje de germinación (%G) que expresa qué porcentaje de las semillas sembradas germinan. Los resultados se muestran en la Figura 58. Tanto para el día -1 como para el día 0 en la CBI no se ha producido la germinación de semillas en ninguna de las 5 réplicas, a diferencia de la CBII que en el día -1 ha tenido un porcentaje de germinación de más del 50%. Esto puede deberse a la presencia de compost en la CBI. El compost es utilizado como enmienda orgánica una vez que las plantas han germinado y crecido, y puede haber aportado una carga orgánica o de nutrientes demasiado elevada para que el proceso de germinación sea viable. Esto se ve sustentado si se observa el mismo comportamiento en los blancos de cada una de las CB. Al avanzar la maduración de los sustratos, a partir del día 30 ya pudo observarse porcentajes de germinación en ambas CB, siendo siempre superior en la CB II. Puede observarse que en cada blanco la germinación sigue la tendencia de lo que sucede en la CB respectiva, lo que puede significar que, para el caso de la germinación, posee mayor importancia el tipo de sustrato que la concentración de plaguicidas.

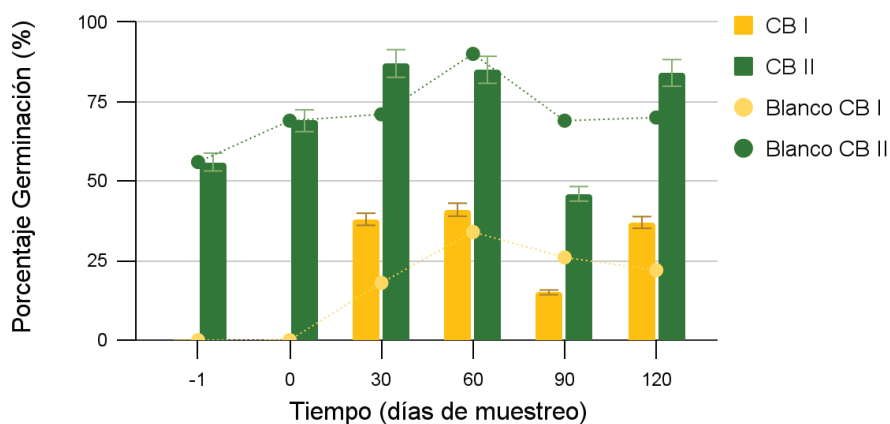


Figura 58: Evolución del porcentaje de Germinación G% durante los días de muestreo

El segundo parámetro utilizado fue la Inhibición de la elongación de la raíz (ELr). Según el trabajo de Bagur-González 2011, la toxicidad de un sustrato puede evaluarse a partir de los rangos de valores obtenidos que se muestran en la Tabla 15. Estos valores surgen del promedio de la elongación radicular de todas las semillas germinadas en las 5 réplicas respecto de los valores obtenidos para el control según la fórmula:

$$ELr = (EL_{\text{muestra}} - EL_{\text{control}}) / EL_{\text{control}}$$

Tabla 15: Evaluación de la elongación de la raíz.

Fuente: Modificado de Bagur-González 2011

Inhibición de la elongación de la raíz	Toxicidad
>0	Nula - Estimulación de la elongación de la raíz
0 a -0,25	Baja
-0,25 a -0,50	Moderada
-0,5 a -0,75	Alta
-0,75 a -1	Muy Alta

Para el caso en estudio para los días -1 y 0 no se registraron valores, pues para la CBI no hubo germinación y en el caso de la CB II los obtenidos para la cama biológica y su respectivo blanco fueron iguales.

La CBI presentó valores de toxicidad moderada en los muestreos de los días 60 y 90, pasando a obtener valores de estimulación de la elongación radicular para el día 120 (Figura 59).

La CBII presentó valores de toxicidad moderada en el día 60 y alta en el día 90, pasando a ser baja en el día 120 (Figura 59).

Este aumento de la toxicidad alrededor del día 90 podría explicarse por el proceso de degradación de los diferentes plaguicidas aplicados que da lugar a la formación de metabolitos que, en algunos casos, presentan mayor toxicidad que la de los propios compuestos de partida.

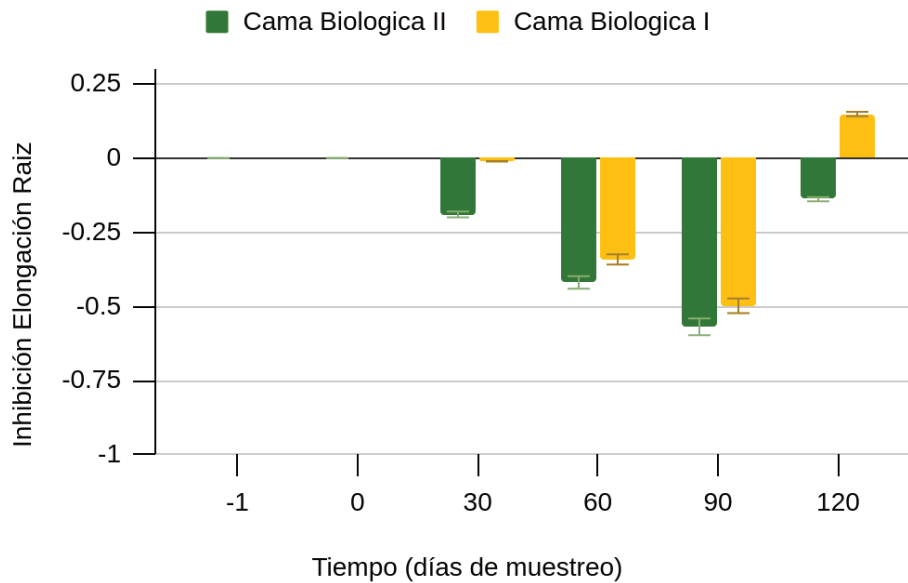


Figura 59: Evolución de la Inhibición de la Elongación de la Raíz durante los días de muestreo

Por último, el tercer parámetro evaluado fue la elongación radicular (E) que se calcula como el promedio en milímetros de las mediciones de las raíces de todas las semillas que han germinado en una determinada fecha. En este caso se observa un desarrollo similar para los diferentes días de muestreo, observándose un detrimento en el día 90, que puede estar correlacionado con lo explicado anteriormente (Figura 60). Asimismo, excepto en ese muestreo, la E se mantuvo relativamente cercana a la obtenida con el sustrato “Suelo de Referencia” que corresponde a suelo de uso agrícola del mismo predio.

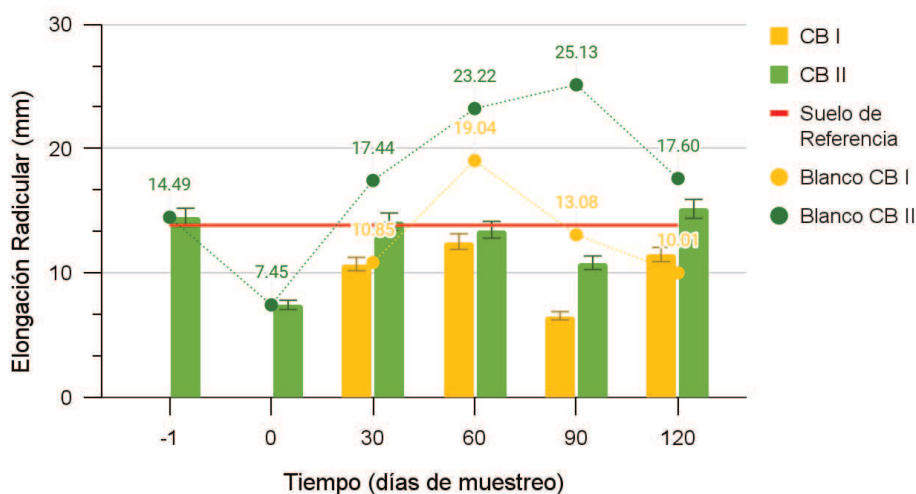


Figura 60: Evolución de la elongación radicular durante los días de muestreo

Existen pocos estudios que incluyan ensayos ecotoxicológicos para evaluar la detoxificación de las biomezclas o para monitorizar la detoxificación durante el proceso de degradación en las camas biológicas. El ensayo de germinación con *Lactuca sativa* sobre lixiviados se ha utilizado para evaluar biomezclas contaminadas (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018, Acosta-Sánchez et al., 2020). Solamente hay un trabajo del propio grupo donde se evaluó la fitotoxicidad de una cama piloto con recirculación tanto sobre la biomezcla como sobre el agua de recirculación para degradar seis plaguicidas (glifosato, atrazina, imidacloprid, prometrina, carbendazim y AMPA) (Lescano et al. 2022). Si bien en el trabajo citado se evaluaron otros plaguicidas los resultados obtenidos en ambos estudios muestran que la aplicación del ensayo de germinación de semillas directo sobre biomezclas demostró ser una herramienta sencilla y de bajo costo para poder determinar el punto final del proceso.

4.3.6. Bioensayo de Huida

Los sustratos se consideran tóxicos si hay un porcentaje de evasión de más del 80 % en las biomezclas en análisis. (Hund-Rinke y Wiechering 2000). A continuación, se discuten los resultados obtenidos de la aplicación de este bioensayo para cada día de experiencia evaluado.

4.3.6.1. Día 90

Como puede observarse en la Tabla 16, algunos ejemplares se encontraron muertos en el compartimento del sustrato correspondiente a la CBI por lo que no es posible calcular un promedio o realizar un análisis estadístico, ya que el objetivo de este ensayo fue contabilizar la evasión o huida de las lombrices. Sin embargo, se pudo obtener información valiosa analizando los datos obtenidos de forma cualitativa.

En dos de las réplicas la evasión fue total, es decir, todas las lombrices escogieron el sustrato control (R2 y R4). En la réplica R3 la mayoría de las lombrices escogió el control y el único ejemplar que eligió el sustrato contaminado apareció muerto mientras que en R1 hubo 8 lombrices en el control y 2 en el sustrato contaminado, aunque una de ellas estaba muerta. Por lo tanto, la CBI contaminada a los 90 días no es un sustrato apto para *E. fetida*.

Tabla 16: Evaluación de la Cama Biológica I vs Suelo de Referencia día 90

	R1		R2		R3		R4	
	Suelo R	CB I	Suelo R	CB I	Suelo R	CB I	Suelo R	CB I
N° lombrices vivas	8	1	10	0	9	0	10	0
N° lombrices muertas	0	1	-	-	0	1	-	-

En el caso de la CB II también se encontraron ejemplares muertos. Como puede observarse en la Tabla 17, en una de las réplicas hubo 9 lombrices que escogieron el control y una el sustrato contaminado (R1), mientras que en el resto de las réplicas si bien va aumentado la cantidad de lombrices que escogen el sustrato contaminado ninguno de los ejemplares logró sobrevivir. Por lo tanto, también para este caso se puede decir que la CB II contaminada a los 90 días no es un sustrato apto para *E. fetida*.

Tabla 17: Testeo de Cama Biológica II vs Suelo de Referencia día 90

	R1		R2		R3		R4	
	Suelo R	CB II	Suelo R	CB II	Suelo R	CB II	Suelo R	CB II
N° lombrices vivas	9	1	8	0	7	0	6	0
N° lombrices muertas	0	1	-	2	0	3	-	4

4.3.6.2. Día 120

Los datos obtenidos con la CBI a los 120 días no mostraron mortalidad, pero la evasión fue del 100 %, es decir, la biomezcla continúa siendo no apta para las lombrices, si bien en esta oportunidad no resulta letal (Tabla 18).

Tabla 18: Testeo de Cama Biológica I vs Suelo de Referencia día 120

	R1		R2		R3		R4	
	Suelo R	CB I	Suelo R	CB I	Suelo R	CB I	Suelo R	CB I
N° lombrices vivas	10	0	10	0	10	0	10	0
N° lombrices muertas	0	0	0	0	0	0	0	0

En el caso de la biomezcla II solamente en una de las réplicas se desplazaron 2 ejemplares al compartimiento del sustrato contaminado (R1), mientras que en el resto de las réplicas los 10 ejemplares eligieron el control, con lo cual el promedio fue una evasión del 95 %, lo que se muestra en la Tabla 19. Según Hund-Rinke y col. (2000) cuando el porcentaje de evasión es mayor al 80 % se considera que el sustrato tiene un efecto sobre el comportamiento de las lombrices y, por lo tanto, es tóxico o de baja calidad para su desempeño.

Tabla 19: Testeo de Cama Biológica II vs Suelo de Referencia día 120

	R1		R2		R3		R4	
	Suelo R	CB II	Suelo R	CB II	Suelo R	CB II	Suelo R	CB II
N° lombrices vivas	8	2	10	0	10	0	10	0
N° lombrices muertas	0	0	0	0	0	0	0	0

A pesar de los resultados numéricos obtenidos con este bioensayo, el hecho de que a los 120 días no haya mortalidad de lombrices en ninguna de las biomezclas indica una evolución positiva en el tiempo. A su vez, este resultado tiene correlación con la degradación de plaguicidas observada para el día 120 en ambas camas biológicas.

Esta mejora en la calidad del sustrato significa que, una vez agotada la capacidad degradativa de las Camas Biológicas, esta especie podría ingresar a los sustratos para transformarlos en abono a través del proceso conocido como vermicompostaje. Otra estrategia posible es realizar

el proceso de vermicompostaje con el agregado de materiales residuales vegetales que contribuyan a una acción transformadora favorable por parte de las lombrices. De esta manera, cuando sea necesario reemplazar la biomezcla, se puede tratar apropiadamente con este proceso, para luego ser esparcida en el predio como enmienda orgánica.

5. Discusión integradora de los Resultados Obtenidos

Analizando en su conjunto los resultados expuestos en el apartado anterior, no parece apropiado realizar una comparación entre ambas camas biológicas, ya que si bien la primera de ellas (CBI) pareciera tener un mejor desempeño en la degradación de plaguicidas, la segunda (CBII) presenta resultados más favorables a través de los bioensayos aplicados aunque las concentraciones iniciales de plaguicidas fueron muy diferentes para las dos.

La CBI, cuya composición posee un 25% de compost, un 25% de suelo, un 15% de residuo hortícola y un 35% de rastrojo de maíz presentó mayor dificultad en su construcción, por la cantidad de tiempo de preparación que el 15% en volumen de compost requirió. Si bien la biomezcla presenta una buena estructura (que se evidencia al momento de retirar las muestras con el muestreador), el contenido de humedad presentó las mismas variaciones que en la CB II. Se observa una muy buena degradación de los siete plaguicidas presentes, en todos los casos mayor al 70% y en promedio 80%.

La construcción de la CBII, cuyos componentes son un 50% de suelo, un 15% de residuo hortícola y un 35% de rastrojo de maíz, no presentó mayores dificultades, siendo un proceso que depende principalmente del secado de los residuos hortícolas para su posterior mezclado. Se observa una buena degradación de cuatro de los plaguicidas presentes (carbendazim, imidacloprid, metaloclor y abamectin B1a), en todos los casos mayor al 50% y en promedio 78,6%.

En la CBI estos porcentajes se correspondieron con la presencia de enzimas de manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y actividad lactasa (FOX) medidas al comienzo (días -1 y 0), durante (días 30 y 60) y al final (días 90 y 120) de la experiencia, aumentando su presencia en este último tramo, finalizando con valores 233% mayores que al inicio.

Por el contrario, los niveles medidos en la CB II fueron disminuyendo, finalizando con valores un 30% menores que al inicio. En ambos casos fueron valores bajos -no se superó el 0,2 microgramo de enzima por miligramo de muestra- lo que podría mejorarse incrementando el porcentaje de rastrojo incorporado a la biomezcla.

Lo sucedido con las enzimas hidrolíticas (medición de FDA) en la CBI demostró que la actividad microbiana fue descendiendo a medida que avanzó la experiencia, llegando a valores del 10% de la concentración inicial en el día 120, presentando un pico de actividad luego del agregado de los plaguicidas.

En la CB II se observa una brusca disminución de los valores de FDA en el día 0, lo cual no ocurrió en la CBI, y se puede explicar debido a un efecto buffer del compost adicionado. En este caso la actividad microbiana tiene fluctuaciones, finalizando con una disminución del 86,7% respecto de los valores iniciales

Por último, si analizamos la calidad del sustrato para su re utilización y/o incorporación al medio como abono o enmienda, tanto los bioensayos de germinación como el de huida coincidieron en evidenciar una “recuperación” de la calidad para estas formas de vida llegando al día 120 del ensayo.

La CBI logró una categoría de “estimulante para la raíz” en el Test de Germinación y la CB II la categoría de “baja toxicidad” y en el Test de Huida tanto la CBI como la CB II no producen mortalidad a las lombrices, evidenciando una evolución positiva del sustrato.

Es importante remarcar que esta experiencia fue realizada enteramente en campo, con residuos reales, en tiempos y procesos propios de la actividad agrícola, no de una programación ajena a la realidad cotidiana de quienes utilizan los plaguicidas. En ese sentido, los tipos y las concentraciones de plaguicidas utilizados no fueron diagramados como parte del proceso experimental. Es importante resaltar que tres de los siete plaguicidas presentes son fungicidas, que por su función inherente, podrían haber generado inhibición en el desarrollo de hongos en particular y de la comunidad microbiana en general.

En este mismo sentido, los componentes de las biomezclas se eligieron basándose en la disponibilidad, manejo y factibilidad estacional, por lo que no todos ellos responden a los de mejores aptitudes comprobadas, sino a la posibilidad certera de formar parte de un cotidiano que permita reproducir la experiencia en manos de quienes necesitan instalar la tecnología en su labor diaria.

6. Conclusiones

El trabajo demuestra que es factible económica y operativamente llevar adelante este tipo de instalaciones en predios hortícolas manejados por pequeños productores ya que tienen una capacidad de degradación satisfactoria para los tipos y volúmenes de plaguicidas manejados. Asimismo, y no menos importante para su exitosa apropiación, su instalación y mantenimiento no requirió tecnología por fuera de lo que se encuentra en cualquier taller u hogar rural. En el plano personal, considero y apuesto a un sistema de producción de alimentos libre de plaguicidas, sobre todo para los mercados frutihortícolas y de cercanía. Más allá de eso, la presente tesis permite brindar herramientas para las productoras y productores que están apostando a una transición agroecológica y quisieran incorporar buenas prácticas de manejo para los plaguicidas que aún utilizaran en sus producciones.

Como una consideración especial, es factible realizar el control de la evolución de las camas biológicas mediante bioensayos que no requieren un adiestramiento profesional y pueden comenzar a realizarse a partir de los cuatro meses de tratamiento para determinar el estado de las biomezclas, ya sea utilizando bioensayos de germinación o bioensayos de huida. En ambos casos, las pruebas son reproducibles en el ámbito rural y doméstico sin mayores complicaciones.

Sería interesante repetir la construcción de la CBI adicionando compost de residuos agrícolas, tal vez de mayor contenido lignocelulósico, para incorporar mayores cantidades de materia orgánica a las biomezclas y probar su efectividad, ya que el origen y características del compost pueden afectar significativamente la degradación y el comportamiento de la adsorción.

Sería interesante optar por otras técnicas para aplicar los plaguicidas en las camas biológicas, como las mismas mochilas que se utilizan para aplicar en los cultivos, teniendo en cuenta que una fracción siempre va a ser vertida sin pulverizar al finalizar la capacidad de bombeo del equipo.

En el caso de los análisis realizados, tanto para la CBI como para la CBII, se podría realizar un segundo uso ya que los valores de FDA y de FOX alcanzados al día 120 según la bibliografía consultada permitirían seguir aprovechando la capacidad de degradación de las biomezclas.

Una vez que el proceso de degradación está llegando a su fin, además de los procesos que se estuvieron analizando las biomezclas, van disminuyendo su volumen. Se recomienda adicionar un 25% de biomezcla fresca a la ya utilizada para “refrescarlas” y poder entonces continuar su uso.

Una vez disminuida la capacidad de los sustratos de las camas biológicas al punto de no permitir reutilizarlas, se puede realizar su mezcla con rastrojo fresco y suelo para disponerlas como abono. Las proporciones de sustratos frescos a agregar se pueden determinar utilizando como indicador la no reticencia de las lombrices a ingresar e ir transformando y compostando los sustratos.

7. Referencias Bibliográficas

Aon, M. A., & Colaneri, A. C. (2001). II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied soil ecology*, 18(3), 255-270.

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.

Adam, D.; 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 & Biochemistry* 33, 943-951.

Antonious G. F. (2012) On-farm bioremediation of dimethazone and trifluralin residues in runoff water from an agricultural field. *Journal of Environmental Science and Health B* 47, 608-621.

Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid) s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of soils and sediments*, 11(2), 281-289.

Bórtoli, P.; Verdeneli, R.; Conforto, C.; Vargas, S.; Meriles, J. (2012) Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecología Austral* 22, 33-42.

Casadinho, J. S. (2009). La problemática del uso de plaguicidas en Argentina. Modelos productivos e impacto en el ambiente. In *XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociología. VIII Jornadas de Sociología de la Universidad de Buenos Aires. Asociación Latinoamericana de Sociología*.

Castillo, M. P.; Torstensson L.; Stenström J. (2008) Biobeds for environmental protection from pesticide use. A review. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 6206-6219.

Castillo, M. P.; Andersson, A.; Ander, P.; Stenström J.; Torstensson, L.; (2001) Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17, 627-633.

Castro-Gutiérrez, V.; Masís-Mora, M.; Diez, M. C.; Tortella, G.R.; Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Aging of biomixtures: Effects on carbofuran removal and microbial community structure. *Chemosphere* 168, 418-425.

Cesio, V.; Heinzen, H.; Banhero, L.; Enrich, N.; Buschiazzo, M.; Rodriguez, N.; Righi, E.; Falco, S.; Viroga, S. (2020) Guía para el diseño, construcción y mantenimiento de camas biológicas en la producción hortifrutícola. Enmarcado en los proyectos GCP/URU/031/GFF y FUCREA-INAVI-VICCA, FPTA-INIA: 353. Ministerio de Ambiente. Gobierno de Uruguay.

Chin Pampillo, J. S. (2020). *Environmental benefits of using biochar as an amendment in pineapple cultivation in Costa Rica: soil physicochemical and biological effects and interaction with agrochemicals* (Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona)

Coppola, L., Castillo, M. ; Monaci, E. ; Vischetti, C. (2007) Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to Southern Europe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 396-401.

Coppola, L., Pilar Castillo, M. D., & Vischetti, C. (2011). Degradation of isoproturon and bentazone in peat-and compost-based biomixtures. *Pest management science*, 67(1), 107-113.

Curry, J. P., & Schmidt, O. (2007). The feeding ecology of earthworms—a review. *Pedobiologia*, 50(6), 463-477.

Davies, J. (1989) Enfoque agro médico sobre el manejo de plaguicidas. Washington, USA. Organization Mundial de la Salud. Pág 4 y siguientes.

De Wilde, T., Spanoghe, P., Sniegowski, K., Ryckeboer, J., Jaeken, P., & Springael, D. (2010). Transport and degradation of metalaxyl and isoproturon in biopurification columns inoculated with pesticide-primed material. *Chemosphere*, 78(1), 56-60.

De Wilde, T., Spanoghe, P., Ryckeboer, J., Jaeken, P., & Springael, D. (2010). Transport and degradation of pesticides in a biopurification system under variable flux, part I: a microcosm study. *Environmental pollution*, 158(10), 3309-3316.

De Wilde, T., Spanoghe, P., Ryckeboer, J., Jaeken, P., & Springael, D. (2010). Transport and degradation of pesticides in a biopurification system under variable flux Part II: A macrocosm study. *Environmental pollution*, 158(10), 3317-3322.

Delgado-Moreno, L., Bazhari, S., Gasco, G., Méndez, A., El Azzouzi, M., & Romero, E. (2021). New insights into the efficient removal of emerging contaminants by biochars and hydrochars derived from olive oil wastes. *Science of The Total Environment*, 752, 141838.

Días, L.; Gebler, L.; Niemeyer, J.; Itako, A.; (2020) Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in Latin America. *Chemosphere* 248, 126038.

Diez, M. C.; Levio, M.; Briceño, G.; Rubilar, O.; Tortella, G.; Gallardo, F.; (2013) Biochar as a Partial Replacement of Peat in Pesticide-Degrading Biomixtures Formulated with Different Soil Types. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 7, 741–747.

Diez Jerez, M. C.; Palma Cifuentes, G.; Altamirano Quijada, C.; Briceño Muñoz, G.; Calderon Ramirez, C.; Jorge Diaz, S.; Rubilar Araneda, O.; Tortella Fuentes, G. (2013) *Manual de Construcción y Operación de Lechos Biológicos* Editorial Universidad de la Frontera, Chile.

Eisenhauer, N.; Marhan, S.; Scheu, S. (2008). Assessment of anecic behavior in selected earthworm species: Effects on wheat seed burial, seedling establishment, wheat growth and litter incorporation. *Applied Soil Ecology* 38, 79-82.

Edwards, C. A., & Bohlen, P. J. (1992). The effects of toxic chemicals on earthworms. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 23-99.

Elgueta, S.; Santos, C.; Lima, N.; Diez, M. C. (2016) Immobilization of the white-rot fungus *Anthracyllum discolor* to degrade the herbicide atrazine AMB Expr 6, 104.

Fogg, P. ; Boxall, A. B. A. (2004) Degradation of pesticides in biobeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5643-5652.

Foti, M. N. (2017) “Bioensayos de germinación para determinar toxicidad por glifosato en rastrojo y suelo de un lote agrícola”. Tesis para obtener el grado académico de Doctor en Ingeniería, mención en Ciencias Agropecuarias de las Facultades de Ciencias de la Alimentación, Ciencias Agropecuarias e Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

Fussoni, N. (Defensa oral: Agosto 2020) “Tratamiento de un efluente real proveniente de una planta productora de plaguicidas mediante Procesos Avanzados de Oxidación y Camas Biológicas” Tesina de grado de Licenciatura en Biotecnología (FBCB-UNL) realizado en el INTEC (UNL-CONICET).

Gao, W. ; Liang, J. ; Pizzul, L. ; Zhang, K. ; Castillo, M. P. (2015) Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 98, 107–112.

Garcia-Gomez, A., Bernal, M. P., & Roig, A. (2002). Growth of ornamental plants in two composts prepared from agroindustrial wastes. *Bioresource technology*, 83(2), 81-87.

Garra, A. S., Pequeño, M. R., & de la Cruz Martín, S. (2011). El uso de biofertilizantes en el cultivo del frijol: una alternativa para la agricultura sostenible en Sagua la Grande. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*, (159).

Góngora-Echeverría, V.R.; Martin-Laurent, F.; Quintal-Franco, C.; Giacomán-Vallejos, G.; Ponce-Caballero, C. (2017) Agricultural effluent treatment in biobed systems using novel substrates from southeastern Mexico: the relationship with physicochemical parameters of biomixtures. *Environ Sci Pollut Res* 24, 9741-9753.

Green, V. S., Stott, D. E., & Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), 693-701.

Huete-Soto, A.; Masís-Mora, M.; Lizano-Fallas, V.; Chin-Pampillo, J. S.; Carazo-Rojas, E.; Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: Detoxification and effect of oxytetracycline. *Chemosphere* 169, 558-567.

Hund-Rinke, K.; Wiechering, H. (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments. *Journal of Soils and Sediments*, 1(1), 15-20.

Karanasios, E. ; Tsiropoulos N. ; Karpouzas, D. (2012) On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation* 23, 787-802.

Kravariti K, Tsiropoulos NG, Karpouzas DG (2010) Degradation and adsorption of terbuthylazine and chlorpyrifos in biobed biomixtures from composted cotton crop residues. *Pest Manag Sci* 66:1122–1128

Ladd, J.N. (1978) Origin and Range of Enzyme in Soil. Burns, R.G. (Ed.), *Soil enzymes*. Academic Press, London, 51-96.

Lavado, R. (2012). Origen del compost, proceso de compostaje y potencialidad de uso. *Compostaje en Argentina: Experiencias de Producción, Calidad y Uso*. UNRN y Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires, 3-12.

Lescano, M.; Pizzul, L.; Castillo, M.P.; Zalazar, C. (2018) Glyphosate and aminomethylphosphonic acid degradation in biomixtures based on alfalfa straw, wheat stubble and river waste. *Journal of Environmental Management* 228, 451-457.

Lescano, M.; Masin, C.; Rodriguez, A.; Godoy, J. L.; Zalazar, C.; (2020). Earthworms to improve glyphosate degradation in biobeds. *Environmental Sciences and Pollution Research* 27, 27023-27031.

Lescano, M.; Masin, C.; Fussoni, N.; Lammertyn, S.; Rodríguez, A.; Vidal, E.; Durán, A.; Ballari, MdM.; Zalazar, C. (2018) Diseño de biolechos a escala piloto para descontaminar efluentes con plaguicidas. Libro de resúmenes VII Congreso Argentino de la Sociedad de

Toxicología y Química Ambiental SETAC ARG, Capítulo Argentina; San Luis, Argentina. pág 121, número de abstract P08.

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, (2022), 150758.

Lizano-Fallas, V.; Masís-Mora, M.; Espinoza-Villalobos, D.; Lizano-Brenes, M.; Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. *Chemosphere* 182, 106-113.

Lorenzatti, E.; Maitre, M.I.; Marino, F.; Masin, C.; Rodríguez A.R.; Lenardon A. (2016). Contaminación ambiental por plaguicidas. Colección Ciencia y Tecnología. ISBN: 978-987-749-047-3. Ediciones UNL. Santa Fe. 168p.

Masin, C. E.; Lescano, M. R.; Rodríguez, A. R.; Godoy, J. L.; Zalazar, C. S.; (2018). Earthworms to assess the innocuousness of spent bio mixtures employed for glyphosate degradation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53, 519-525.

Ministerio de Salud. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable UnIDA: Unidad de Investigación y Desarrollo Ambiental, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. (2007). La problemática de los plaguicidas y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente. Estudio Colaborativo Multicéntrico. Buenos Aires ISBN 978-987-96256-7-5 <https://www.aamma.org/descargas/plaguicidas.pdf>
Fecha de acceso 5/06/2020

Monaci, E., Coppola, L., Casucci, C., Perucci, P., & Vischetti, C. (2009). Retention capacity of an organic bio-mixture against different mixtures of fungicides used in vineyards. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44(7), 724-729.

Moreno Casco, J., Moral Herrero, R. (2008). *Compostaje*. Mundi-Prensa Libros

OECD Organization for Economic Cooperation and Development. (2003). Guideline for the testing of chemicals. Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 19p.

OECD Organization for Economic Co-operation and Development. (2004). Guideline for Testing of Chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*). 18p.

Omirou, M.; Dalias, P.; Costa, C.; Papastephanou, 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.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Ganadería (FAO) (1990) Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma, Italia.

Paoletti, M. G. (1999). Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. In *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes* (pp. 1-18). Elsevier.

Peruzzo, P.; Porta, A.; Ronco, A. (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61-66.

Pioli, J.; Lescano, M. (2020) Desarrollo de una Técnica Analítica para monitorear la evolución de la degradación de mezclas de plaguicidas en camas biológicas. INTEC UNL CONICET http://www.lechosbiologicos2020.com/E_posters_final.pdf Fecha de acceso 1/06/ 2021

Ratcliff, A. ; Busse, M. ; Shestak, C. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34, 114–124.

Rezende, N.; Besil, L.; Archondo, A.; Riverob, S.; Niell, R.; Hladki, C.; Rodríguez, H.; Heinzena, M.V.; Cesio (2020) Camas biológicas una alternativa viable para la degradación de plaguicidas utilizados en el paquete tecnológico de soja. Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT), Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, CeNUR Litoral

Norte, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.
http://www.lechosbiologicos2020.com/E_posters_final.pdf Fecha de acceso 1/06/ 2021

Ricardo, T.; Maitre, M. I.; Rodríguez, A. R. (2010). Efectos subletales de la Lambda-cialotrina sobre *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae). *Ci. Suelo Argentina* 28, 39-46.

Rodríguez-Castillo, G., Molina-Rodríguez, M., Pérez-Villanueva, M., Masís-Mora, M., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2018). Removal of two neonicotinoid insecticides and mineralization of ¹⁴C-imidacloprid in biomixtures. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101(1), 137-143.

Rodríguez-Rodríguez, C. E.; Castro-Gutierrez, V.; Lizano-Fallas, V. (2018). Toxicity and Biodegradation Testing, in: Montagnolli, E.D.B. and R.N. (Ed.), *Methods in Pharmacology and Toxicology*. pp. 57–74.

Roffignac, L.; Cattan, P.; Mailloux, J.; Herzog, D.; Le Bellec, F. (2008). Efficiency of a bagasse substrate in a biological bed system for the degradation of glyphosate, malathion and lambda-cyhalothrin under tropical climate conditions. *Pest Management Science* 64, 1303-1313.

Römbke, J., Jänsch, S., & Didden, W. (2005). The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(2), 249-265.

Rubilar, O.; Tortella, G.R.; Diez, M.C. (2013). Degradation of pesticide mixture on modified matrix of a biopurification system with alternatives lignocellulosic wastes. *Chemosphere* 92, 1361-1366.

Ruiz-Hidalgo, K.; Chin-Pampillo, S.; Masis-Mora, M.; Carazo, E.; Rodríguez-Rodríguez, C. (2014). Degradation of carbofuran by *Trametes versicolor* in rice husk as a potential lignocellulosic substrate for biomixtures: From mineralization to toxicity reduction. *Process Biochemistry* 49, 2266–2271.

Ruiz-Hidalgo, K.; Masís-Mora, M.; Barbieri, E.; Carazo-Rojas, E.; Rodríguez-Rodríguez, C.E.; (2016) Ecotoxicological analysis during the removal of carbofuran in fungal bioaugmented matrices. *Chemosphere* 144, 864–871.

Sarandón, S. J.; Flores, C. C. (2014) Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables. Capítulo 1 La insustentabilidad del modelo agrícola actual. (Sarandón, S. J.; Flores, C. C.) Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 13-41.

Schnürer, J.; Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* 6, 256-1261.

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.

Tortella G.; Rubilar O.; Castillo M.; Cea M.; Mella-Herrera R.; Diez M. (2012) Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages, *Chemosphere* 88, 224-228.

Tortella, G.; Durán, N.; Rubilar, O.; Parada, M.; Diez, M. C. (2015) Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health. *Journal Critical Reviews in Biotechnology* 35, 165-172.

Udovic, M., & Lestan, D. (2010). *Eisenia fetida* avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. *Environmental pollution*, 158(8), 2766-2772.

US EPA. (1996). Ecological effects test guidelines. Seed germination/root elongation toxicity test. OPPTS 850.4200. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/850-1950.pdf> Fecha de acceso 23/01/ 2019

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.

Vischetti, C., Monaci, E., Cardinali, A., Casucci, C., & Perucci, P. (2008). The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere*, 72(11), 1739-1743.

Xiao, N., Jing, B., Ge, F., & Liu, X. (2006). The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 62(8), 1366-1373.

Zmora-Nahum, S., Hadar, Y., & Chen, Y. (2007). Physico-chemical properties of commercial composts varying in their source materials and country of origin. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(6), 1263-1276.

8. Anexos

Fichas con las técnicas utilizadas para las determinaciones en laboratorio

8.1.1. Bioensayo de conducta llamado de huida o evasión con la lombriz *E. fetida*, (ISO 2008)

En cada ensayo se emplean cuatro recipientes de vidrio de 15×10×10 cm, donde cada uno es dividido en dos secciones con un separador removible (lámina plástica), colocando en una sección 250 g de sustrato de prueba (biolecho tratado) y en la otra la misma cantidad, pero de suelo control.

Humedecer los sustratos con agua destilada considerando una humedad del 60%.

Posteriormente se remueve el separador de cada recipiente y se colocan 10 ejemplares (de igual tamaño y cliteladas) de *E. fetida* en la línea media que separaba las dos secciones. Las lombrices se obtuvieron del bioterio propio del grupo de INTEC.

Para evitar que las lombrices se escapen de los recipientes, se cubren con papel film transparente con agujeros para permitir el intercambio de gases y paso de la luz. La duración de cada ensayo es de 72 h de exposición, con un régimen de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura ambiental de 22 ± 2 °C.

Al cabo de tres días, los separadores son reinsertados en los recipientes y se cuenta el número de lombrices en cada sección.

Los ensayos de evasión reflejan la propiedad de las lombrices de evitar suelos contaminados. Los sustratos se consideran tóxicos (función del hábitat reducida) si > 80 % de las lombrices permanecen en el suelo control (Hund-Rinke y Wiechering 2000).

8.1.2. Determinación de plaguicidas

Método de partición (GC)

1er extracción

5 ml muestra + 5 ml EP: agitar 10 min; centrifugar 10 min; trasvasar fase etérea a tubo 1

2da extracción

Residuo de la 1er extracción + 5 ml EP/EE (85/15): agitar 10 min; centrifugar 10 min; trasvasar fase etérea a tubo 1

Lavado

Armar cartuchos con 2g Sulfato de Sodio
Lavar con 10 ml EP y 5 ml EP/EE (85/15)
Pasar lo recolectado en tubo 1
Enjuagar con 5 ml EP y 3 ml EP/EE (85/15)

A sequedad y reconstituir para GC.

Dilución (UHPLC)

Se realizó una inyección directa de la muestra, y dos diluciones (1 en 100 y 1 en 1000)

Biolechos

Paso 1

1er extracción

1 g muestra + 5 ml MeOH: agitar 2 horas; centrifugar 10 min; trasvasar
sobrenadante a tubo 1

2da extracción

Residuo de la 1er extracción + 5 ml MeOH: agitar 2 horas; centrifugar 10 min;
trasvasar sobrenadante a tubo 1

Paso 2

Residuo de la 2da extracción + 3 ml H₂O: agitar vórtex

Agregar 10 mL MeCN (1% ác. Acético); agitar en vórtex

Agregar 3 g MgSO₄ Anhidro: Agitar 3 min; centrifugar

Trasvasar sobrenadante a tubo 1

De tubo 1: tomar alícuota para UHPLC (inyección directa) y una alícuota a sequedad y reconstituir para GC.

Condiciones instrumentales GC

Inyector

- Modo: Splitless
- Volumen de inyección: 1 µl
- Temperatura: 280°C

Columna

- Flujo: 1 ml/min
- Gradiente de temperatura

	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Tiempo de espera min	Tiempo de corrida min
Inicio		60	1	1
Rampa 1	40	170	0	3,75
Rampa 2	10	310	3	20,75

Espectrómetro de masa

Temperatura de interfase: 310°C
Voltaje de ionización: 70 eV
Temperatura de ionización: 230°C
Caudal del gas de colisión: 1,5 mL/min

Condiciones instrumentales UHPLC

Sistema UHPLC

Fase móvil A: H₂O 5 mM NH₄F + 0,1 % ácido fórmico.
Fase móvil B: MeOH 5 mM NH₄F + 0,1 % ácido fórmico.

Comienzo con 5% fase B (durante 0,5 min), incremento lineal hasta hasta 100% de fase B (en 6,5 min). Permanencia en 100% de fase B (durante 1,5 min). Regreso a condiciones iniciales (en 0,5 min) y reequilibración durante 1 min. Tiempo total de corrida 10 min.

Flujo: 0,35 mL/min.

Volumen de Inyección: 4µL.

Columna: ACQUITY UPLC® BEH C18 RP Shield (1.7 µm x 2.1 x 100 mm) de Waters.

Temperatura de Columna: 40°C

Espectrómetro de masa

MRM ESI (+) y ESI (-)

Voltaje de Cono: 40 V

Voltaje Capilar: 1 kV

Dwell Time: 0,008-0,05 ESI (+) / 0,05 (ESI-)

Temperatura de Fuente: 120 °C

Temperatura de Desolvatación: 390°C

Flujo Gas de Cono (N₂): 48 L/h

Flujo Gas de Desolvatación (N₂): 900 L/h

8.3 Desarrollo del método de medición de actividad fenoloxidasas para suelo y biomezclas (Adaptado de Castillo y col. 1994 y Tortella y col., 2012)

En este método no se hace ninguna corrección por la posible presencia de lignina peroxidasa (Lip) y actividad lacasa (Lac), la medición puede representar la suma de manganeso peroxidasa, Lip y Lac (Castillo y Torstensson y col.) y se expresa como “Actividad fenoloxidasas”

Preparación del buffer de ácido succínico/láctico 100 mM pH 4,5 (500 mL finales):

1. Pesar 5,9 gr de ácido succínico.
2. Disolver en aprox. 250 ml de agua ultrapura.
3. Llevar a agitación.
4. Cuando el ácido esté bien disuelto agregar 4 ml de ácido láctico 85-90%.
5. Agregar un poco más de agua ultrapura hasta llegar a aprox. 400 ml totales.
6. Colocar el pH metro en el recipiente, medir pH y comenzar a agregar gota a gota con pipeta NaOH 1 N para llevar la solución al pH deseado (serán aprox. 50 ml de NaOH para llegar al pH de 4,5).
7. Habiendo llegado al pH deseado, pasar la solución a matraz de 500 ml y enrasar con agua ultrapura.

Preparación de los reactivos:

Se realizaron los cálculos de las cantidades necesarias en función de obtener un volumen de 100 ml finales de cada uno:

- 30,198 mg de MBTH en 100 ml de agua ultrapura
- 109,025 mg de DMAB en 100 ml de agua ultrapura
- 113 µl de H₂O₂ al 30% en 100 ml de agua ultrapura
- 338,04 mg de MnSO₄ en 100 ml de agua ultrapura

Procedimiento:

1. Si el grado de humedad de la muestra es elevado, se deja en campana (secado “al aire”)
2. Se tritura la mezcla con mortero y/o molinillo para obtener tamaño de partícula entre 2 y 5 mm
3. Pesar 10 gr de muestra y colocar en tubos de 50 mL.

4. Medir 25 ml de solución buffer de ácido succínico/láctico 100 mM (pH 4,5) y colocar en cada

uno de los tubos con muestra.

5. Cerrar los tubos y agitar manualmente durante 1 min

6. Llevar los tubos a agitador orbital a 150 rpm durante 2 horas.

7. Llevar los tubos a centrifuga a 4000 rpm durante 20 min.

8. De aquí en adelante se continúa el proceso de a una muestra por vez ya que inmediatamente después de haber filtrado debe realizarse la medición.

9. Filtrar el sobrenadante con filtro de nylon de 0,45 μm e inmediatamente llevar a medir.

10. En la misma cubeta que se utilizará para hacer la medición en el espectrofotómetro se realiza la mezcla de los reactivos, incorporarlos en el orden que se indica a continuación:

a. 3,120 mL del sobrenadante filtrado

b. 600 μl de DMAB

c. 200 μl de MBTH

d. 60 μl de MnSO_4

e. 20 μl de H_2O_2

Tapar la cubeta, invertir un par de veces para homogeneizar el contenido y colocar en el espectrofotómetro (se realiza previamente el autozero con la solución buffer de pH 4,5).

La medición se realiza a 590 nm, durante 30 min con un intervalo de tiempo de 30 segundos.

Repetir pasos 9 a 12 con todas las muestras que se tengan que analizar.

11. Se grafica la curva de Absorbancia vs tiempo (min) de todas las muestras realizadas.

12. Se hace un regresión lineal de la curva y se anota la pendiente ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$). Con este dato y teniendo en cuenta las diluciones realizadas, los gramos de muestra, el coeficiente de extinción molar y la longitud de la cubeta, se realiza el cálculo que se expresa en U/kg de muestra . Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto.

Cálculos

Coeficiente de extinción= 53000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (de Castillo y col. 1994)

Longitud de paso cubeta = 1 cm

$$\frac{U \text{ enzima} \left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min}} \right)}{\text{kg muestra}} = \frac{\frac{\Delta bs}{\text{min}} * \text{mol} * 1 \text{ cm}}{53000 \text{ L} * \text{cm}} * \frac{1000000 \mu\text{moles}}{1 \text{ mol}} * \frac{0,025 \text{ L}}{0,01 \text{ kg}} * \frac{4 \text{ mL}}{3,120 \text{ mL}}$$

8.4 Desarrollo del método de hidrólisis de fluoresceína diacetato -FDA- (Adaptación de Schnurer y Rosswall, 1982; Adam y Duncan, 2001 para aplicar en suelos y biomezclas)

Preparación de los reactivos

1. Buffer fosfato de potasio 60 mM pH 7,6: pesar 8,7 g de K_2HPO_4 y 1.3 g de KH_2PO_4 y disolver en 800 ml de agua destilada. Llevar a 1 L y almacenar a 4°C, chequear el pH el día de uso.
2. Solución stock 1000 μg FDA/ml: se disuelve 0,1 g de FDA en 80 ml de acetona y se lleva a 100 ml con acetona. Se almacena a -20°C.
3. Solución stock de 2000 μg Fluoresceína/ml: la sal de sodio de la fluoresceína (0,2265 g) se disuelve en 80 ml del buffer de fosfato de 60 mM y se lleva a 100 ml con el buffer.
4. Solución estándar de 20 μg Fluoresceína/ml: de la solución stock (2000 μg Fluoresceína/ml) se tomó 1 ml para colocarlo en un matraz de 100 ml y llevar a volumen con el buffer fosfato para obtener la solución estándar.

A partir de ésta, se preparan soluciones estándar de 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluyéndolas en el buffer de fosfato, las cuales se emplean para realizar la curva de calibrado a partir de la cual se obtendrán las concentraciones de fluoresceína producidas por las biomezclas al aplicar la técnica.

Procedimiento

1. Si el grado de humedad de la muestra es elevado, se deja en campana (secado “al aire”).
2. Se tritura la mezcla con mortero y/o molinillo para obtener tamaño de partícula entre 2 y 5 mm.
3. Pesar 1 g de muestra por duplicado y colocar en tubos de ensayo de 15 mL. Anotar los pesos finales y rotular cada tubo.
4. Medir 6 ml de solución buffer de fosfato de potasio 60 mM y colocar en cada uno de los tubos con muestra.
5. Con pipeta automática (de 100-1000 μl), medir 100 μl de solución stock de FDA (sacar del freezer al momento de usar) y colocar en los tubos para comenzar la reacción.

6. Agitar manualmente durante un minuto los tubos para homogeneizar el contenido y dejar incubando a temperatura ambiente (aprox. 25oC), durante 1 hora. Se puede usar aire acondicionado para regular la temperatura del ambiente si fuera necesario.
7. Cumplida la hora, se agregan 6 ml de acetona y se agitan manualmente durante un minuto los tubos para finalizar la reacción (la hidrólisis de la FDA da como producto fluoresceína, dando un color amarillento/verdoso intenso en la muestra).
8. Se llevan los tubos a centrifugación, 2 veces a 2000 rpm durante 5 minutos.
9. Con pipeta automática (de 1000-5000 µl) colocar parte del sobrenadante de cada muestra en cubeta de cuarzo (previo filtrado si fuese necesario) y medir la absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm. Medir contra un blanco de agua destilada todas las muestras.
10. La concentración de fluoresceína liberada se calcula a partir de la curva de calibrado realizada con las soluciones estándares de fluoresceína teniendo en cuenta además los volúmenes de buffer y acetona empleados y el peso (determinado en 1) de las biomezclas ensayadas.

Observaciones:

- Las muestras que dan un valor de absorbancia mayor a 0,9 se diluyen previamente a su lectura; ésta dilución debe tenerse en cuenta en el cálculo de la concentración final.
- Deben prepararse blancos sin la adición de FDA para cada sustrato ensayado y medirlos como una muestra más. Para esto seguir los pasos indicados anteriormente del 1 al 9 con la diferencia de agregar 6, 1 mL de Buffer y no agregar 100 µL de FDA. La Absorbancia real de cada muestra será entonces Abs Muestra-Abs Blanco para todos los casos.

La concentración final del Fluoresceína se informa como µg* g⁻¹ h⁻¹ ya que es la fluoresceína liberada en 1 hora de incubación.

$$Conc. Fluoresceína \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{Abs \text{ real muestra} + A}{B}$$

$$Conc. Fluoresceína \left[\frac{\mu g}{g \text{ muestra}} \right] = \left[\frac{Conc.F \left[\frac{\mu g}{mL} \right] * Volumen total (12 mL)}{g \text{ muestra}} \right]$$

Siendo A la ordenada al origen y B la pendiente de los datos graficados.