

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado Académico de Doctora en  
Ciencias Biológicas

SISTEMAS DE BIOPURIFICACIÓN PARA EL  
TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS CON  
PLAGUICIDAS. INCORPORACIÓN DE LA ACCIÓN DE  
OLIGOQUETOS TERRESTRES

Lic. Aldana Carolina Clebot

Directora de Tesis: Dra. Cristina Susana Zalazar

Co-directora de Tesis: Dra. Maria Emilia Fernandez

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la  
Industria Química, INTEC (UNL – CONICET)

## **Agradecimientos**

En primer lugar, valoro y agradezco al Estado Argentino por la posibilidad de acceder a una Educación Pública de calidad y por el apoyo, tanto nacional como provincial, al desarrollo de la Ciencia y la Tecnología. Sin este compromiso sostenido, hubiera sido imposible llevar adelante este proyecto de investigación durante seis años.

A la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Escuela Superior de Sanidad, les agradezco por haberme brindado siempre un espacio para desarrollarme académica y científicamente desde mi formación de grado.

Extiendo también mi sincero reconocimiento a CONICET por haber considerado mi merecimiento de una beca doctoral que hizo posible mi formación, estudio e investigación.

Agradezco al INTEC, por ofrecerme un ámbito propicio para el trabajo científico y por recibirme dentro de sus grupos de investigación.

A Cristina y Emilia, mis directoras, por su disposición constante, guiándome y acompañándome en este camino, orientándome en cada uno de los pasos que debía dar, con dedicación y confianza.

A los integrantes del Grupo de Ingeniería de Fotorreactores y Tecnologías Ambientales del instituto, en particular a Carolina y Alejandra, por su colaboración y acompañamiento constante. Extiendo también mi agradecimiento al personal de apoyo y a colegas de otros grupos del INTEC, quienes, aun sin pertenecer directamente a mi equipo, me brindaron su ayuda, su tiempo y numerosos momentos compartidos que hicieron más llevadera y enriquecedora esta etapa.

A los miembros del Jurado, les agradezco profundamente por su interés y el esmero dedicados a la evaluación de esta Tesis.

Finalmente, a mi familia: a mis padres y a mi hermano, por ser siempre un refugio seguro al que volver; por creer en mí incluso en los momentos en que a mí me costaba hacerlo. A Joaquín, mi compañero, por su paciencia y su presencia constante. Y a mis amigas y amigos —los de toda la vida y los que este doctorado me regaló, especialmente la Oficina 22— gracias por sostenerme, por escucharme y acompañarme en cada desafío. Su apoyo fue especialmente valioso durante este último año, que resultó particularmente difícil, y en el que, sus palabras y sus gestos hicieron posible que pudiera seguir adelante. A todas y todos ustedes, gracias por ser mi red, mi contención y mi fuerza.

## Aportes Científicos-Tecnológicos

- Fernandez, Maria Emilia; Morel, María del Rosario; **Clebot, Aldana Carolina**; Zalazar, Cristina Susana; Ballari, María de los Milagros. "Effectiveness of a simple biomixture for the adsorption and elimination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide and its metabolite, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), for a biobed system". *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10: 1 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106877>.
- **Aldana Carolina Clebot**, Maria Emilia Fernandez, Florencia Valentina Magni, María Rosa Repetti, Cristina Susana Zalazar. "Bio-transformation of poultry litter and activated sewage sludge to produce biomixtures for the remediation of water polluted with pesticides". *Chemosphere*, 365 (2024)143264. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143264>.
- **Aldana Carolina Clebot**, Florencia Valentina Magni, María Rosa Repetti, Cristina Susana Zalazar, Maria Emilia Fernandez. "Adsorption, Degradation, and Synergistic Effects of Pesticides in Biomixtures Containing Vermicompost from Agricultural and Urban Waste". *Journal of Water Process Engineering*, 77(2025) 108384. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.108384>.

<b>Índice</b>	
Agradecimientos .....	2
Aportes Científicos-Tecnológicos .....	3
Índice.....	4
Abreviaturas y símbolos.....	8
Resumen.....	12
Abstract .....	14
Introducción general.....	16
I.1. Uso e impacto ambiental de los plaguicidas .....	16
I.2. Mitigación de la contaminación puntual por plaguicidas.SBP. ....	18
I.3. Vermicompost en biomezclas. Ventajas estructurales y funcionales .....	20
I.4. Residuos agroindustriales y urbanos locales como insumo para biomezclas .....	22
I.5. Adsorción de plaguicidas en las biomezclas: su importancia en los SBP .....	25
I.6. Vermirremediación. Incorporación de la acción de las lombrices para potenciar la capacidad degradativa de las biomezclas .....	26
I.7. Selección y características de los plaguicidas evaluados .....	27
I.8. Aporte del trabajo de Tesis a los Sistemas de Biopurificación .....	28
Objetivos del trabajo .....	30
1. Diseño de las biomezclas basadas en vermicompost.....	31
1.1. Introducción.....	31
1.2. Objetivo .....	32
1.3. Materiales y métodos.....	32
1.3.1. Obtención y biotransformación de los residuos .....	32
1.3.2. Caracterización fisicoquímica y biológica de los sustratos .....	33
1.3.3. Monitoreo biológico de las lombrices .....	36
1.3.4. Diseño y elaboración de las biomezclas .....	37

---

1.3.5.	Caracterización de las biomezclas.....	39
1.4.	Análisis estadístico .....	40
1.5.	Resultados y discusión .....	40
1.5.1.	Características de los residuos originales .....	40
1.5.2.	Caracterización fisicoquímica y biológica de los sustratos biotransformados .....	41
1.5.2.1.	<i>Variación de la hidrólisis de la FDA durante ambos procesos.....</i>	48
1.5.3.	Monitoreo biológico de las lombrices .....	50
1.5.4.	Caracterización de las biomezclas.....	51
1.6.	Conclusión.....	55
2.	Estudios de degradación de los plaguicidas en las biomezclas .....	56
2.1.	Introducción.....	56
2.2.	Objetivos .....	57
2.3.	Materiales y métodos.....	57
2.3.1.	Diseño experimental.....	57
2.3.2.	Preparación de soluciones con plaguicidas y fumigación .....	58
2.3.3.	Cuantificación de los plaguicidas.....	60
2.3.4.	Estudio de la cinética de degradación de los plaguicidas .....	61
2.3.5.	Seguimiento de parámetros fisicoquímicos y respuestas biológicas .....	62
2.3.5.1.	<i>Índice de germinación.....</i>	62
2.3.5.2.	<i>Exposición aguda de lombrices.....</i>	63
2.4.	Análisis estadístico .....	63
2.5.	Resultados y discusión .....	63
2.5.1.	Disipación de los plaguicidas y modelado cinético.....	63
2.5.2.	Actividad microbiológica de las biomezclas y del suelo durante la degradación de los plaguicidas .....	74
2.5.2.1.	<i>Seguimiento de la hidrólisis de la FDA.....</i>	74
2.5.2.2.	<i>Seguimiento de la actividad de las Fenoloxidasas.....</i>	76

---

2.5.3.	Ensayos biológicos para corroborar el grado de descontaminación .....	77
2.5.3.1.	<i>Ensayo de germinación</i> .....	78
2.5.3.2.	<i>Exposición aguda de lombrices</i> .....	79
2.6.	Conclusión.....	80
3.	Estudios de adsorción de los plaguicidas en las biomezclas .....	82
3.1.	Introducción.....	82
3.2.	Objetivos .....	83
3.3.	Materiales y métodos.....	83
3.3.1.	Cuantificación de los plaguicidas en solución.....	83
3.3.2.	Estudios de adsorción monosoluto .....	84
3.3.2.1.	<i>Ensayos preliminares</i> .....	84
3.3.2.2.	<i>Obtención de las isotermas</i> .....	85
3.3.2.3.	<i>Modelado</i> .....	86
3.3.3.	Estudios de adsorción multisoluto.....	87
3.4.	Análisis estadístico .....	87
3.5.	Resultados y discusión .....	88
3.5.1.	Ensayos de adsorción preliminares.....	88
3.5.2.	Estudios de adsorción monosoluto .....	89
3.5.3.	Estudios de adsorción multisoluto.....	96
3.5.4.	Correlación entre la adsorción y degradación de los plaguicidas.....	98
3.6.	Conclusión.....	101
4.	Incorporación de oligoquetos terrestres en las camas biológicas .....	103
4.1.	Introducción.....	103
4.2.	Objetivos .....	104
4.3.	Materiales y métodos.....	104
4.3.1.	Diseño experimental.....	104
4.3.2.	Incorporación de las lombrices en biomezclas .....	105

---

4.3.3. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y biológicos de las biomezclas.....	105
4.3.3.1. Actividad de la fosfatasa alcalina .....	106
4.3.4. Selección de los biomarcadores monitoreados en lombrices .....	106
4.3.5. Monitoreo de los biomarcadores en las lombrices .....	107
4.3.5.1. Obtención del homogenato.....	107
4.3.5.2. Determinación de Proteínas Totales .....	107
4.3.5.3. Determinación de actividad Acetilcolinesterasa.....	108
4.3.5.4. Determinación de la actividad Catalasa .....	108
4.3.5.5. Registro de la Biomasa.....	108
4.3.5.6. Determinación del índice de lesión .....	108
4.4. Análisis estadístico .....	109
4.5. Resultados y discusión .....	109
4.5.1. Incorporación de las lombrices en biomezclas .....	109
4.5.2. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y biológicos de las biomezclas.....	112
4.5.3. Monitoreo enzimático y físico de las lombrices.....	116
4.5.3.1. Biomasa y biomarcadores enzimáticos .....	116
4.5.3.2. Índice de lesión.....	120
4.6. Conclusión.....	121
Conclusiones generales .....	123
Anexo I: Cuantificación de plaguicidas en matrices sólidas .....	126
Anexo II: Curvas de calibrado en matriz líquida de los plaguicidas seleccionados.....	131
Anexo III: Clasificación de las isotermas de adsorción .....	133
Anexo IV: Análisis estadístico: ANOVA- Modelo lineal general- Comparaciones por parejas “ad hoc” .....	135
Bibliografía .....	143

## Abreviaturas y símbolos

- Organizaciones y entidades:

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

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

FICH: Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas

FIQ: Facultad de Ingeniería Química

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

INTEC: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

IRAM: Instituto Argentino de Normalización y Certificación

ISO: Organización Internacional de Normalización

MINCyT: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Argentina

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PPDB: Base de Datos de Propiedades de Agroquímicos

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

SAyDS: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Argentina

SCyMA: Secretaría de Control y Monitoreo Ambiental de Argentina

SECEGRIN: Servicio Centralizado de Grandes Instrumento

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina

UNL: Universidad Nacional del Litoral

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

- Equipamiento analítico:

GC-ECD: Cromatografía Gaseosa con Detector de Captura de Electrones

HPLC-UV: Cromatografía Líquida de Alta Performance con Detector Ultravioleta

UHPLC-MS/MS: Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectroscopía de Masas

- Mediciones y parámetros fisicoquímicos y biológicos:

ANOVA: Análisis de la Varianza

C/N: Relación Carbono-Nitrógeno

C/P: Relación Carbono-Fósforo

C: Carbono Total

CE: Conductividad Eléctrica

CHN: Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno Totales

CL<sub>50</sub>: concentración letal media

K: Potasio Total

LOD: Límite de Detección

LOQ: Límite de Cuantificación

MO: Materia Orgánica

N: Nitrógeno Total

ND: No Detectado

NMP: Número Más Probable

N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Nitrógeno Amoniacal

P: Fósforo Total

P<sub>AS</sub>: Fósforo Asimilable

pH<sub>cc</sub>: pH en el Punto de Carga Cero

QueEChERS: Acrónimo en inglés de "*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*"

SD: Desviación Estándar

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

- Reactivos y sustancias:

2,4-D: Ácido 2,4-iclorofenoxiacético

ACE: Acetoclor

ACN: Acetonitrilo

AMPA: Ácido aminometilfosfónico

CIP: Cipermetrina

DIM: Dimetoato

DMAB: Ácido 3,3-dimetiloaminobenzoico

DTNB: Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico)

IMI: Imidacloprid

MBTH: Hidrazona de 3-metilo-2-benzotiazolinona

pNP: p-nitrofenol

pNPP: p-nitrofenil fosfato de sodio

- Variables, constantes y parámetros relacionados a las isotermas de adsorción y los modelos aplicados:

$1/nF$ : coeficiente inherente a la intensidad de interacción o heterogeneidad del modelo de Freundlich

$aR$ : parámetro del modelo de Redlich-Peterson asociado a la afinidad del adsorbato por el adsorbente

$C_e$ : Concentración de equilibrio de plaguicida en la solución (mg L<sup>-1</sup>)

$C_o$ : Concentración inicial de plaguicida en la solución (mg L<sup>-1</sup>)

$K_d$ : Constante de disociación por sitio de adsorción ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$K_D$ : Constante de Hill ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$K_F$ : Constante de Freundlich ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) ( $\text{L mg}^{-1})^{1/n_F}$ )

$K_L$ : Constante de Langmuir ( $\text{L mg}^{-1}$ )

$K_R$ : Constante de Redlich-Peterson ( $\text{L kg}^{-1}$ )

$m$ : Masa de biomezcla (kg)

$n_H$ : Coeficiente de interacción cooperativa de Hill

$n_R$ : Coeficiente del modelo de Redlich-Peterson

$q_e$ : Cantidad de plaguicida adsorbida por kilogramo de las biomezclas en equilibrio ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$Q_H$ : Capacidad máxima de adsorción del modelo de Hill ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$Q_L$ : Capacidad máxima de adsorción del modelo de Langmuir ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$R_L$ : Factor de separación adimensional de Langmuir

$V$ : Volumen de solución (L)

- Variables, constantes y parámetros relacionados a los modelos cinéticos de degradación

$DT_{50}$ : Tiempo de Vida Media

$k$ : Constante de Velocidad de Reacción

SFO: Modelo de Primer Orden Simple

$\alpha$ : Parámetro del Modelo Gustafson-Holden

$\beta$ : Parámetro del Modelo Gustafson-Holden

- Nomenclatura específica del trabajo experimental

AS: Aserrín de eucaliptus

BS: Biomasa en base húmeda (lombrices)

C1: Mezcla de residuos conteniendo 3 partes de AS y 4 de CP

C2: Mezcla de residuos conteniendo 3 partes de AS, 4 de CP y 4 de LA

CP: Cama de pollo

LA: Lodos activados cloacales

R: Rastrojo de trigo

S/F: Sin Fumigar

S: Suelo agrícola

SBP: Sistemas de Biopurificación

SR: Suelo: Rastrojo (biomezcla de referencia)

SRV: Suelo: Rastrojo: Vermicompost

SRV-C1: Biomezcla constituida con el vermicompost V-C1: S: R

SRV-C2: Biomezcla constituida con el vermicompost V-C2: S: R

V: Vermicompost

V-C1: Vermicompost obtenido a partir de C1

V-C2: Vermicompost obtenido a partir de C2

- Biomarcadores:

AChE: Acetilcolinesterasa

CAT: Catalasa

FA: Fosfatasa Alcalina

FDA: Fluoresceína Diacetato

FOX: Fenoloxidasas

G: Germinación

IG: Índice de Germinación

IL: Índice de Lesión

PT: Proteínas Totales

## Resumen

El uso intensivo de plaguicidas en sistemas productivos impacta negativamente sobre los ecosistemas. Estos últimos se ven también afectados por la gestión inadecuada de residuos de distintos orígenes. Los Sistemas de Biopurificación (SBP) ofrecen una solución eficaz y económica, en la que se aprovechan materiales orgánicos residuales en una biomezcla biológicamente activa para adsorber y disipar plaguicidas *in situ*. No obstante, se debe considerar que en su diseño original se emplean materiales no renovables, como la turba.

En esta Tesis se formularon nuevas biomezclas con la capacidad de disipar plaguicidas de uso global. Para ello, se logró una estabilización eficaz de tres residuos disponibles en la provincia de Santa Fe: cama de pollo, aserrín de eucalipto y lodos cloacales activados, mediante vermicompostaje, con el empleo de la lombriz epigea, *Eisenia fetida*. Se prepararon dos mezclas diferentes combinando los residuos con y sin la adición de lodos activados cloacales, y se monitoreó el proceso mediante su caracterización fisicoquímica y microbiológica. En ambos casos, se obtuvieron sustratos ricos en materia orgánica, estables y no patógenos.

Los sustratos vermicompostados resultantes se utilizaron para producir dos biomezclas diferentes con rastrojo de trigo y suelo, y se aplicaron para la remediación de una solución de cinco plaguicidas (2,4-D, cipermetrina, imidacloprid, acetoclor y dimetoato). Se realizaron comparaciones con una biomezcla de referencia y un control de suelo solo. Se estudió la cinética de degradación de estos plaguicidas y los modelos cinéticos aplicados a los datos experimentales proporcionaron una buena descripción de dicha degradación. Las dos biomezclas que contenían vermicompost actuaron más rápido que la de referencia y que el suelo; siendo este último el sustrato que más remanente de plaguicidas presentó al finalizar el ensayo. La mayor actividad biológica total en las dos biomezclas que contenían vermicompost se relacionó con su mejor rendimiento en la degradación de plaguicidas. Se integraron ensayos biológicos (índice de germinación y exposición aguda de lombrices) para evaluar la reducción de toxicidad en las biomezclas usadas. Este estudio confirma que el vermicompost mejora el éxito de las biomezclas, no solo en términos de eliminación de plaguicidas, sino también en la obtención de biomezclas agotadas no tóxicas.

Estudiar la relación entre la adsorción de plaguicidas en las biomezclas y su degradación puede ayudar a desarrollar herramientas para predecir y optimizar el desempeño de los SBP. Por ello, se evaluó la adsorción de los cinco plaguicidas sobre las biomezclas con vermicompost, en soluciones mono y multisoluto, mediante ensayos batch. Se obtuvieron las isotermas de adsorción de los plaguicidas, muchas de las cuales mostraron curvas sigmoideas, revelando un efecto dual cooperativo e inhibitorio, marcadamente influenciado por la polaridad y solubilidad de cada plaguicida. Las

---

isotermas se describieron y ajustaron aplicando cuatro modelos matemáticos (Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson y Hill), lo que permitió obtener parámetros característicos y encontrar una correlación entre ambos fenómenos.

Por último, se evaluó la factibilidad de aplicar la vermirremediación a dos biomezclas fumigadas (vermicompost con lodos y de referencia), incorporando *E. fetida*. La supervivencia y actividad de las lombrices solo fue posible en la biomezcla con vermicompost, donde la menor concentración residual de plaguicidas, junto con la mayor disponibilidad de materia orgánica favorecieron su ingreso. *E. fetida* pudo sobrevivir y mantenerse activa, aun cuando los biomarcadores enzimáticos (AChE y CAT) reflejaron estrés subletal transitorio. En contraste, la biomezcla de referencia mantuvo concentraciones de imidacloprid cercanas a niveles letales, lo que explicó el rechazo y el daño observado en los organismos. En conjunto, los resultados indican que la vermirremediación, en este caso, no resulta aplicable inmediatamente tras la aplicación de plaguicidas, pero puede integrarse como una etapa final complementaria para sostener la calidad biológica de biomezclas ya utilizadas, especialmente en las enriquecidas con fracciones orgánicas.

Este trabajo de Tesis aportó nuevos conocimientos para la gestión de un desafío ambiental de alcance global mediante soluciones locales sostenibles. Las biomezclas diseñadas con vermicompost demostraron ser efectivas en la adsorción y degradación de una mezcla compleja de plaguicidas, lo que evidencia que la integración de vermicompost en los SBP constituye una estrategia innovadora, replicable y ambientalmente responsable. Asimismo, el modelado y la comparación de los procesos de adsorción y degradación permitieron generar información valiosa que puede orientar el diseño de SBP más eficaces. Los resultados confirman el potencial de los SBP con vermicompost como una herramienta sostenible para enfrentar la contaminación puntual por plaguicidas y promover la valorización de residuos orgánicos.

## Abstract

The intensive use of pesticides in production systems has a negative impact on ecosystems. The latter are also affected by the inadequate management of waste from different sources. Biopurification Systems (BPS) offer an effective and cheap solution, in which residual organic materials are used in a biologically active biomixture to adsorb and dissipate pesticides in situ. However, it should be considered that non-renewable materials, such as peat, are used in their original design.

In this Thesis, new biomixtures with the ability to dissipate pesticides of global use were formulated. To this end, an effective stabilization of three wastes available in the province of Santa Fe was achieved: poultry litter, eucalyptus sawdust and activated sewage sludge, through vermicomposting, with the use of the epigeal earthworm *Eisenia fetida*. Two different mixtures were prepared combining the waste with and without the addition of sewage sludge, and the process was monitored through its physicochemical and microbiological characterization. In both cases, substrates rich in organic matter, stable and non-pathogenic were obtained.

The resulting vermicomposted substrates were used to produce two different biomixtures with wheat stubble and soil and were applied for the remediation of a solution of five pesticides (2,4-D, cypermethrin, imidacloprid, acetochlor and dimethoate). Comparisons were made with a reference biomixture and soil-only control. The degradation kinetics of these pesticides were studied and the kinetic models applied to the experimental data provided a good description of this degradation. The two biomixtures containing vermicompost proceeded faster than the reference one and the soil; the latter being the substrate that presented the most pesticide residue at the end of the assay. The higher total biological activity in the two vermicompost-containing biomixtures was related to their better performance in pesticide degradation. Biological assays (germination index and acute exposure of earthworms) were integrated to evaluate the reduction of toxicity in the biomixtures used. This study confirms that vermicompost improves the success of biomixtures, not only in terms of pesticide removal, but also in obtaining non-toxic depleted biomixtures.

Studying the relationship between pesticide adsorption in biomixtures and their degradation can help develop tools to predict and optimize the performance of BPSs. Therefore, the adsorption of the five pesticides on the biomixtures with vermicompost, in mono and multi-solute solutions, was evaluated by batch assays. Adsorption isotherms of pesticides were obtained, many of which showed sigmoidal curves, revealing a dual cooperative and inhibitory effect, markedly influenced by the polarity and solubility of each pesticide. The isotherms were described and adjusted by applying four

mathematical models (Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson and Hill), which allowed to obtain characteristic parameters and find a correlation between both phenomena.

Finally, the feasibility of applying vermiremediation to two fumigated biomixtures (vermicompost with sludge and reference one) was evaluated, incorporating *E. fetida*. The survival and activity of the worms was only possible in the biomixture with vermicompost, where the lower residual concentration of pesticides, together with the greater availability of organic matter, favored their entry. *E. fetida* was able to survive and remain active, even though enzyme biomarkers (AChE and CAT) reflected temporary sublethal stress, in contrast, the reference biomixture maintained imidacloprid concentrations close to lethal levels, which explained the rejection and damage observed in the organisms. Overall, the results indicate that vermiremediation, in this case, is not applicable immediately after pesticide application, but can be integrated as a complementary final step to sustain the biological quality of biomixtures already used, especially those enriched with organic fractions.

This Thesis work provided new knowledge for the management of an environmental challenge of global scope through sustainable local solutions. Biomixtures designed with vermicompost proved to be effective in the adsorption and degradation of a complex mixture of pesticides, which shows that the integration of vermicompost into BPSs is an innovative, replicable and environmentally responsible strategy. In addition, the modeling and comparison of adsorption and degradation processes generated valuable information that can guide the design of more effective BPS. The results confirm the potential of BPS with vermicompost as a sustainable tool to address spot contamination by pesticides and promote the recovery of organic waste.

## **Introducción general**

### **I.1 Uso e impacto ambiental de los plaguicidas**

Cada año se utilizan alrededor de tres millones de toneladas de plaguicidas con fines agrícolas en todo el mundo. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los diez principales países consumidores de plaguicidas en el mundo en 2020 fueron Estados Unidos, Brasil, China, Argentina, Rusia, Canadá, Francia, Australia, India e Italia (Leskovac & Petrović, 2023). Otro estudio mundial, sobre la distribución geográfica de 92 de los plaguicidas agrícolas más utilizados, reveló que cerca de 70 mil toneladas se filtran en los acuíferos cada año, lo que afecta negativamente a los ecosistemas, principalmente los recursos hídricos (Maggi et al., 2023a).

Para el 2022, se reportaban en Argentina 58 millones de hectáreas cultivadas, con una demanda del 87 % de herbicidas, del total de plaguicidas empleados (Luzzi et al., 2024). Asimismo, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Montoya et al., 2023) menciona que, para 36 millones de hectáreas cultivadas en el país, se utilizan aproximadamente 580 millones de litros de diferentes tipos de plaguicidas. Al estudiar la presencia de residuos de plaguicidas en diferentes muestras de suelos argentinos, Sabzevari & Hofman (2022) encontraron concentraciones elevadas de glifosato, su metabolito AMPA, atrazina, ametrina, clorpirifós, dimetoato, imidacloprid, entre otros. Muchos de éstos, incluso, son plaguicidas cuyo uso se encuentra restringido o prohibido en el país.

Jyoti et al. (2025) menciona que el uso de plaguicidas en la actualidad tiene un rol fundamental en el manejo de las plagas, considerándose una de las formas más eficientes de lograr un aumento en el rendimiento de los cultivos, y que es una necesidad vital en paralelo con el crecimiento demográfico. Se estima que el mundo entero ha sufrido una pérdida de entre el 50% y más del 80% de los cultivos debido a las plagas. En tales circunstancias, la utilización de plaguicidas y otros agroquímicos es un fenómeno inevitable en la era actual, además de haberse convertido en uno de los mercados más rentables del mundo. Sin embargo, la aplicación sin control tiene efectos perjudiciales sobre los ecosistemas y la salud humana, ampliamente documentados y discutidos por la comunidad científica.

La contaminación ambiental debida a los plaguicidas a nivel agrícola puede clasificarse como difusa o puntual. Después de ser rociado sobre los cultivos, una fracción del ingrediente activo del plaguicida no alcanza el objetivo previsto y se producen pérdidas difusas por procesos como la volatilización, el transporte superficial y la lixiviación a través del suelo. Aunque la contaminación difusa es una consecuencia inherente de las prácticas de aplicación de plaguicidas y, como tal, es difícil de evitar, puede minimizarse con estrategias como la aplicación de buenas prácticas agrícolas

y tecnologías apropiadas. Por el contrario, la puntual se ha considerado el proceso más crítico en términos de contaminación y exposición de los ecosistemas a los plaguicidas. Las operaciones asociadas a la contaminación puntual por plaguicidas se encuentran relacionadas con la preparación de formulaciones de plaguicidas antes de su aplicación, el llenado y lavado de equipos y maquinaria de aspersión, las soluciones de fumigación residuales y los derrames accidentales (Rodríguez-Rodríguez & Rodríguez-Saravia, 2023). En tales situaciones, los plaguicidas pueden lixiviarse a las aguas superficiales y subterráneas (Papazlatani et al., 2019). Se sabe que la contaminación puntual constituye la principal contribución, estimada en un 40-90%, a la contaminación por plaguicidas en las aguas superficiales (Beltrán-Flores et al., 2024).

En cuanto a la exposición de los humanos a los plaguicidas (ya sea exposición directa, por consumo de agua o alimentos contaminados) ésta puede tener efectos agudos o crónicos, pudiendo provocar desde erupciones cutáneas, diarrea, mareos, hasta la aparición de cáncer, desórdenes neurológicos, endócrinos, reproductivos y efectos genotóxicos. Estos efectos no difieren en gran medida de los que pueden observarse sobre otros organismos vivos, ya sean plagas o especies no objetivo (Khan et al., 2020). Sin embargo, existen aún lagunas de conocimiento sobre el destino ambiental y los efectos no intencionales de los plaguicidas utilizados actualmente, obstaculizando la comprensión y la mitigación de sus impactos globales en los procesos ecológicos.

La autora Fernanda Sáñez, en su libro “La Argentina Fumigada” (Sáñez, 2016) menciona que la presencia de plaguicidas en distintas matrices ambientales provoca un agotamiento de los ecosistemas de su capacidad buffer, es decir, de funcionar como un reactor químico, físico y biológico. Por eso la contaminación por plaguicidas está provocando un impacto en recursos vitales (agua, aire y suelo). Del mismo modo, la autora remarca que, por ejemplo, el 2,4-D se sigue utilizando frecuentemente y que los trabajadores expuestos a este herbicida tienen hasta 600 veces más chances de desarrollar cáncer linfático. En Argentina, el 2,4-D se usa para el cultivo de trigo, cebada, centeno, arroz, sorgo, papa, maíz, caña de azúcar, lenteja. Sin embargo, en casi 60 municipios de Quebec en Canadá está prohibido para mantenimiento de césped y en Estados Unidos solo pueden adquirirlo aplicadores de plaguicidas profesionales y certificados. No obstante, es uno de los herbicidas más utilizados en nuestro país, junto con la atrazina y el glifosato (Luzzi et al., 2024).

En este contexto y de acuerdo con Terrile et al. (2024), en los últimos años, la protección de suelos sanos ha aumentado en la agenda de las instituciones nacionales y supranacionales (como la Unión Europea y la Organización de las Naciones Unidas, dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible para 2030). Por ello, resulta de interés adoptar estrategias de gestión sostenible, cuyos objetivos apunten a promover la reducción de plaguicidas en aplicaciones de campo, así como

implementar sistemas de tratamiento de aguas residuales contaminadas con plaguicidas y monitorear su preparación, uso y descarte.

## **I.2 Mitigación de la contaminación puntual por plaguicidas. Sistemas de Biopurificación**

Frente a esta problemática y para minimizar el riesgo, es que surgen las camas biológicas, también conocidas como biolechos, lechos biológicos o Sistemas de Biopurificación (SBP). Son sistemas *in situ* diseñados para proporcionar una forma segura y sostenible de gestionar y degradar los residuos de plaguicidas de las actividades agrícolas. La idea básica detrás de un SBP es crear un entorno controlado, en una excavación impermeabilizada en el suelo o un recipiente relleno de una biomezcla de diferentes materiales, donde los microorganismos naturales, como bacterias y hongos, pueden descomponer y degradar los residuos de plaguicidas que allí se dispongan (Mussali-Galante et al., 2023). Los SBP fueron diseñados para biodegradar soluciones acuosas con concentraciones elevadas de uno o más plaguicidas, que surgen principalmente, como se mencionó en la Sección 1.1, de la manipulación y preparación de las mezclas de los formulados y del lavado de los equipos de fumigación en el campo (Acosta-Sánchez et al., 2020a).

Originalmente, la tecnología de SBP se desarrolló en Suecia y la biomezcla típica estaba compuesta por paja de trigo, turba y suelo. En el modelo sueco, el pozo contaba con 60 cm de profundidad en el suelo, con una base de 10 cm de arcilla como barrera impermeable del entorno circundante, luego 50 cm de biomezcla, que brindaba soporte físico y biológico y una capa de césped en la superficie para regular la humedad y mejorar la actividad microbiológica (Castillo & Torstensson, 2007), como se puede ver ilustrado en la Figura 1. Dentro de la composición de la biomezcla, la paja es un material lignocelulósico y proporciona actividad microbiana degradante, especialmente hongos degradadores de lignina, que producen enzimas lignolíticas extracelulares. El suelo suministra capacidad de sorción y microorganismos degradadores de plaguicidas, particularmente bacterias, mientras que la turba es un compuesto húmico poroso que proporciona una alta capacidad de sorción, materia orgánica y mejora la retención de agua y la aireación de la biomezcla (Dias et al., 2020). Originalmente las proporciones de la biomezcla eran 50:25:25 (%v/v) de paja, turba y suelo, respectivamente. No obstante, no siempre es factible aplicar como tal este diseño y composición de SBP, por ello ha sufrido variaciones en composición y forma a lo largo del tiempo y del estudio de las mismas.

La biomezcla es el componente más importante de todos, ya que allí se alojan los microorganismos, que son esenciales para la degradación de los plaguicidas, a la vez que éstos se retienen y adsorben en los materiales que la componen. Es decir, cuando los plaguicidas en solución se desplazan a través del SBP, sus moléculas son capturadas y adsorbidas en la biomezcla, a la vez que los microorganismos presentes, aprovechan algunas de las moléculas de los plaguicidas,

contribuyendo a su degradación o transformación (Mukherjee, 2016; Odukkathil & Vasudevan, 2020).

La adopción y adaptación de estos sistemas en diferentes partes del mundo es vital para promover prácticas agrícolas sostenibles y la protección del medio ambiente a nivel global. Su eficacia depende de varios factores, entre los que se pueden incluir la composición de la biomezcla, que las comunidades microbianas se establezcan y se adapten en ella, el clima, la adaptación a las capacidades y prácticas locales y la disponibilidad económica y de materiales (Chin-pampillo et al., 2015).

Resulta de interés mencionar que existe una norma nacional publicada por el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM) de Calidad Ambiental, la “Guía para la construcción y el manejo de camas biológicas” (IRAM 29.561/2020), creada para aportar a técnicos y productores, requisitos y recomendaciones para la planificación, construcción, operación y mantenimiento de los SBP.



**Figura 1.** Representación de la composición de un Sistema de Biopurificación de plaguicidas. La flecha indica el sentido de movimiento de los plaguicidas.

En relación con la composición original de la biomezcla, particularmente el uso de uno de sus componentes, la turba, se está desalentando su práctica en varios países por motivos ecológicos y económicos, como es el caso del gobierno de Reino Unido que en 2011 estableció objetivos

específicos para eliminar gradualmente la turba del mercado hortícola (Agarwal et al., 2023). Algunos estudios han reportado el uso de diferentes sustratos alternativos para reemplazar la turba en la biomezcla, siendo el compost el sustituto más empleado en América Latina y en la zona mediterránea (Beltrán-Flores et al., 2024). La composición de la biomezcla es modificada de diferentes modos en cada región de acuerdo con la cantidad y tipos de plaguicidas tratados, condiciones ambientales, geográficas y disponibilidad de residuos, para poder conservar su eficiencia, bajo costo y sustentabilidad (Briceño et al., 2014a). Por ejemplo, en Italia Vischetti et al. (2008) emplearon para degradar clorpirifós y metalaxil, una biomezcla constituida por residuos típicos de la zona: suelo, ramas de vid como material lignocelulósico y compost de residuos de jardín, en reemplazo de la turba. En Canadá, Cessna et al. (2017) utilizaron residuos propios de su producción, reemplazando la turba por estiércol compostado y paja de avena. Asimismo, en India, Kumari et al. (2021) utilizó un 40% de un compost comercial de un mercado local para la composición de la biomezcla. En Costa Rica, Masís-Mora et al. (2019) aprovecharon fibra de coco, compost y suelo agrícola en proporciones 2:1:1 respectivamente para degradar una mezcla de diferentes plaguicidas, al igual que Chin-pampillo et al. (2015) que emplearon compost de jardín en reemplazo de la turba, y también aprovecharon la fibra de coco y cascarilla de arroz en la constitución de la biomezcla. En Argentina, por la gran disponibilidad de materiales agropecuarios y ubicación geográfica, la composición de las biomezclas se centró en suelo agrícola, paja de trigo, alfalfa y/o resaca de río en diferentes proporciones, para la degradación de glifosato o 2,4-D (Fernandez et al., 2022; Lescano et al., 2022; Masin et al., 2018). También existen estudios que emplearon diferentes subproductos de la caña de azúcar como sustratos lignocelulósicos alternativos para la formulación de biomezclas eficientes para la disipación de compuestos como lindano y atrazina (Saez et al., 2018, 2022a). Otro material alternativo en reemplazo de la turba, como material orgánico, es el vermicompost; sin embargo, son escasos los autores que lo han incorporado y estudiado para reemplazar la turba en las camas biológicas. En la Sección siguiente, 1.3, se detalla específicamente el proceso de vermicompostaje y sus aplicaciones.

### **I.3 Vermicompost en biomezclas. Ventajas estructurales y funcionales**

El vermicompostaje se define como un proceso biológico que implica la bio-oxidación de materiales orgánicos por la acción cooperativa de lombrices de tierra y microorganismos, modificando y optimizando las propiedades físicas y bioquímicas de los materiales, convirtiéndolo en un sustrato orgánico estabilizado. Este producto es conocido como vermicompost o humus de lombriz (“*worm casts*”) (Belmeskine et al., 2020; Gupta & Garg, 2011), y puede ser aplicado como parte de los SBP.

Los sustratos y las lombrices se encuentran estrechamente vinculados: mientras el sustrato o suelo adyacente provee alojamiento y sostén, la actividad constante de excavación, ingestión,

digestión y defecación de las lombrices recíprocamente mejora la estructura, fragmentación, permeabilidad, distribución del aire, estimula la acción microbiana y participa en la transformación de los nutrientes del sustrato. Estas capacidades se encuentran asociadas a la secreción de enzimas extracelulares por parte de las lombrices, capaces de romper estructuras de celulosa, hemicelulosa, lignina, polipéptidos, compuestos fenólicos, entre otros, ya que poseen en su sistema digestivo una gran cantidad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas que hacen que su intestino funcione como un microambiente que modifica favorablemente todo lo que ingieren (Enebe & Erasmus, 2023; Sanchez-Hernandez et al., 2014; Sun et al., 2020).

Dentro de las especies de lombrices más utilizadas para el vermicompostaje se encuentran *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei*. Son elegidas por su elevada adaptabilidad a diferentes sustratos y tolerancia a diferentes condiciones de humedad, temperatura, capacidad de reproducción y otras condiciones fisicoquímicas. El ciclo de vida de la lombriz *E. fetida* puede observarse en la ilustración de la Figura 2. La lombriz adulta (caracterizada por la presencia de un anillo epidérmico denominado clitelo), posee tanto aparato reproductor femenino como masculino, deposita sus huevos denominados cocones que luego de incubarse 3-4 semanas, pueden dar lugar a de 2 a 4 nuevas lombrices (crías) que crecerán alimentándose de los materiales orgánicos disponibles en el sustrato, pasando luego por su estadio juvenil, hasta ser adultas y capaces de reproducirse nuevamente en un tiempo de 5-9 semanas aproximadamente, dependiendo de las condiciones (Gupta & Garg, 2011; Kaur, 2020).



**Figura 2.** Estadios del ciclo de vida de la lombriz de tierra *Eisenia fetida*, desde el huevo (cocón) hasta su madurez sexual (adulto).

Luego del proceso de vermicompostaje, se obtiene el vermicompost, de propiedades similares a la turba. Este material posee baja relación Carbono/ Nitrógeno (C/N), alto contenido de sustancias húmicas, alta capacidad de retención de humedad y alta porosidad (Sánchez-Hernández et al., 2019), características que lo hacen un excelente candidato como sustituto de la turba en los SBP. A diferencia del compost convencional, el vermicompost suele tener una estructura más fina y una mayor superficie que proporciona una fuerte capacidad de adsorción y retención de nutrientes, agua e incluso contaminantes (Poornima et al., 2024; Wang et al., 2023). Asimismo, se considera más beneficioso que la turba debido también a su mayor contenido de nutrientes, mayor actividad microbiana y por tratarse de un recurso renovable obtenido de materiales orgánicos locales (Yeganeh et al., 2024; Ma et al., 2022).

Como se mencionó en la Sección 1.2, algunos materiales compostados pueden ser funcionales en reemplazo de la turba dentro de la composición de las biomezclas de los SBP. Sin embargo, las características del vermicompost también lo hacen apto como material que aporta materia orgánica, retención de agua y porosidad. No obstante, los trabajos que utilizan biomezclas preparadas con vermicompost, son limitados y no existen en Argentina estudios donde se usen este tipo de biomezclas aplicadas a la degradación de mezclas de plaguicidas.

Algunos autores han reportado resultados exitosos en la incorporación de vermicompost a los SBP. Delgado-Moreno et al. (2017), en España, aprovecharon la alta disponibilidad de subproductos del olivo (orujo de aceituna húmedo y residuo de la poda de los olivos). De manera similar, Mansee et al. (2024) recientemente trabajaron en Egipto con la misma estrategia, empleando 25% de un vermicompost comercial en su biomezcla para tratar altas dosis de clorpirifós. Romero et al. (2019) emplearon residuos de olivo previamente vermicompostados para la disipación de metalaxil e imidacloprid, obteniendo mejores resultados en comparación con la biomezcla tradicional a base de paja y turba. En Brasil, Dias et al. (2021) evaluaron hojarasca de pino y vermicompost derivados de estiércol y cáscara de coco como sustitutos de la turba en biomezclas para tratar fosmet, demostrando que ambos materiales resultaron tan eficaces como la turba en la degradación del plaguicida.

Si bien estos trabajos hacen una valiosa contribución al proponer los residuos vermicompostados como sustitutos eficientes de la turba en las camas biológicas, se limitan a los residuos específicos disponibles en algunas regiones o países.

#### **I.4 Residuos agroindustriales y urbanos locales como insumo para biomezclas**

Tal como se menciona en la Sección 1.3, la incorporación de vermicompost como parte de las biomezclas resulta una alternativa viable que tiene complementariamente la ventaja de aprovechar residuos orgánicos. La transformación de residuos sólidos en vermicompost es de doble interés: un

residuo se convierte en producto de valor agregado y a su vez se controla un potencial contaminante que es consecuencia del aumento de la población, la urbanización y la agricultura intensiva. Estos residuos si son tratados correctamente para su estabilización tienen una gran potencialidad por su actividad biológica y contenido de nutrientes (Gupta & Garg, 2011; Kaur, 2020).

Tanto en Argentina como en la provincia de Santa Fe en particular, se cuenta con gran disponibilidad de residuos sólidos orgánicos aprovechables. Derivados de la industria regional, está la cama de pollo (CP), proveniente de la producción avícola, o los subproductos de la industria de aserrado, mientras que también pueden incluirse otros residuos semisólidos orgánicos como los lodos activados (LA), provenientes del tratamiento de las aguas residuales cloacales. Especialmente estos residuos son los considerados para esta Tesis.

A nivel nacional, al 2022 se registraron al menos 700 millones de aves faenadas por año, generando grandes cantidades de CP como principal residuo de la actividad (Gange et al., 2024). La CP, tal como menciona Saleem et al., (2018), está generalmente compuesta por cáscaras de arroz, paja, plumas, virutas de madera u otros materiales de cama con la excreción fecal y urinaria de los pollos y se utiliza para mantener las condiciones higiénicas de las aves y protegerlas del exceso de humedad y amoníaco; sin embargo, cuando se dispone sin tratamiento previo, puede contaminar el agua subterránea ya que puede incorporar un exceso de fósforo y microorganismos patógenos (Kharel et al., 2025). En Argentina, el uso de CP (rica en nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo) es una práctica común económicamente viable para fertilizar cultivos hortícolas (Pizarro et al., 2019). Los problemas ambientales asociados con el uso de CP cruda pueden mitigarse estabilizando su contenido de nutrientes y materia orgánica a través del compostaje o vermicompostaje (Cáceres et al., 2015; Pizarro et al., 2019).

Dentro de los subproductos de los aserraderos, se registró en un informe del 2020 que el aserrín (AS), principalmente de pino o eucaliptus, representó un aproximado del 23% en la producción (Dirección Nacional de Desarrollo Foresto Industrial, 2020). El aserrín es un material que posee una alta tasa de C/N respecto a otros residuos orgánicos, ya que está compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina, que son polímeros carbonosos que permiten su reutilización como sustrato, material de relleno o combustible. Es importante evitar la acumulación de este material, ya que puede provocar riesgos de incendio o constituir un reservorio y foco de propagación de hongos que favorecen la pudrición de la madera próxima a ser utilizada dentro de la industria del aserrado (Akpan, 2016). El uso del aserrín ha sido utilizado exitosamente ya en otros estudios como agente aglutinante para compostar residuos semisólidos, ya que ayuda a absorber la humedad y a mejorar la estructura de la mezcla (Nayak & Kalamdhad, 2014).

En cuanto a los residuos semisólidos, el nivel de generación total de agua residual cloacal se estimó en torno a los 3200 millones de metros cúbicos por año, considerando la población total del Censo 2022, de los cuales solo el 17,3% llega a plantas de tratamiento con infraestructura adecuada. El crecimiento de la población urbana ha incrementado el volumen de residuos orgánicos semisólidos cloacales, como es el caso de los LA en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Dubova et al., (2020) hace mención a que la eliminación de LA es problemática y costosa, y puede requerir hasta el 60 % de los costos operativos totales de las plantas de tratamiento de aguas residuales. El LA tiene una gran diversidad microbiana, que puede variar según el origen de las aguas residuales y su tratamiento. La actividad microbiana, los subproductos de la transformación y los residuos de los LA también pueden afectar la calidad del suelo si se utilizan como fertilizante de forma directa. Asimismo, Dubova et al. (2020), menciona que el uso de LA es económicamente viable como fertilizante por su contenido de materia orgánica y nutrientes, aunque existen varias limitaciones para este uso, ya que algunos de sus componentes potencialmente nocivos requieren un tratamiento adicional (metales, microorganismos patógenos, etc.), siendo los biológicos, asistidos por organismos vivos, los menos costosos económica y energéticamente (Liew et al., 2022).

Todos estos residuos mencionados previamente pueden revalorizarse convirtiéndolos en vermicompost, como demuestran los resultados obtenidos por diversos autores. Por ejemplo, Georgi et al. (2022) utilizó *E. fetida* para vermicompostar lodos cloacales en una mezcla con estiércol vacuno; Biabani et al. (2018) informaron haber vermicompostado 75% rastrojo de trigo con 25% de cama de pollo; Vicentin et al. (2021) estudiaron un vermicompost a partir de diferentes proporciones de cascarilla de arroz y cama de pollo. Más recientemente, Masin et al. (2025) lograron estabilizar una mezcla de estiércol de paloma en una mezcla con aserrín de eucaliptus y restos chipeados de poda de jardín mediante vermicompostaje, también con *E. fetida*.

Entonces, podemos afirmar que el aprovechamiento de estos residuos está al servicio de los objetivos de la economía circular. Esta se basa en priorizar la minimización, reutilización y transformación de los residuos, para que vuelvan a ser recursos. Aunque abundan las normas e iniciativas para la aplicación de ésta, como el reciclaje o el compostaje, no existe una visión global acordada actualmente sobre cómo proceder (ISO 2020- *Connecting the dots in a circular economy: a new ISO technical committee just formed*) (Aguado et al., 2025). La crisis socio-ecológica es global, no solo en Argentina, y tiene sus raíces principalmente en el modelo de consumo económico lineal que consiste en la extracción, uso y eliminación de los recursos, contradiciendo la naturaleza de los sistemas ecológicos. Las circunstancias y características únicas de los países de cada región requieren el desarrollo de metodologías específicas que tengan en cuenta la heterogeneidad socioambiental y política a la que se enfrentan. Frente a esta situación, la economía circular ofrece una alternativa

prometedora al modelo económico lineal vigente, y su verdadero desafío es adaptar los conceptos a las diversas realidades.

### **I.5 Adsorción de plaguicidas en las biomezclas: su importancia en los SBP**

En las biomezclas de los SBP no solo ocurre la degradación de los plaguicidas, sino que también existe el fenómeno de adsorción de las moléculas de los plaguicidas en los materiales presentes. La adsorción es un fenómeno de superficie que implica un proceso de separación en el cual una o varias moléculas de distintos orígenes, denominadas adsorbato, presentes en un fluido, líquido o gas, se unen a las superficies de un material sólido, denominado adsorbente. Este puede ser también de origen mineral, orgánico (tal es el caso de las biomezclas) o biológico. La separación se basa en la adsorción selectiva de las moléculas al adsorbente, debido a interacciones y/o atracciones específicas entre la superficie del material adsorbente y las moléculas del adsorbato. Los mecanismos de unión pueden ser variables o múltiples cuando el adsorbente es un material biológico, desde fisisorción (es decir, interacciones físicas débiles electrostáticas, fuerzas de Van der Waals) hasta quimisorción (es decir, enlaces más fuertes químicos, iónicos y covalentes) (Crini et al., 2018).

Por su parte, las moléculas de adsorbato también pueden tener diferentes orígenes. En particular los plaguicidas son de origen orgánico, y están sujetos a dos procesos clave que gobiernan su comportamiento en el ambiente: la adsorción y la degradación. Una vez aplicados los plaguicidas al suelo o a un sustrato, la mayoría son adsorbidos por los sólidos presentes o sufren degradación por microorganismos o procesos químicos. El comportamiento de los plaguicidas en el suelo y el ambiente a su vez también depende principalmente de dos factores: las propiedades de los plaguicidas y las propiedades del sustrato. Las características moleculares de los plaguicidas como la solubilidad, la ionización, la hidrofiliidad o la lipofiliidad son de particular importancia (Rasool et al., 2022).

En particular, se ha encontrado que la materia orgánica presente en los adsorbentes de origen biológico juega un papel central en la adsorción (Rasool et al., 2022), debido a la mayor afinidad química de los plaguicidas a las moléculas de este origen, favoreciendo la adsorción. Este fenómeno es especialmente importante en las biomezclas utilizadas en los SBP. Los procesos de adsorción y desorción condicionan la biodisponibilidad de los plaguicidas presentes. La adsorción no solo limita la movilidad del contaminante, sino que también influye directamente en su degradación, ya que algunos autores sostienen que solo la fracción no adsorbida está disponible para ser transformada por microorganismos (Rasool et al., 2022). Dado que la presencia de materia orgánica y la adsorción en la biomezcla regulan el transporte y la lixiviación de los plaguicidas, su biodisponibilidad y, por consiguiente, su degradación (Delgado-Moreno et al., 2019), la caracterización de la capacidad de adsorción de los plaguicidas (adsorbato) en las biomezclas (adsorbente) resulta valiosa para luego

lograr diseñar un SBP eficiente, ya que es un fenómeno muy importante a la hora de estudiar la remoción de contaminantes (Amrutha et al., 2023; Hu et al., 2023).

Cuando hay más de un adsorbato en la misma solución (multisoluto), se puede poner en juego una adsorción competitiva. Las características físicas y químicas de los adsorbentes y adsorbatos desempeñan un papel importante también en este tipo de adsorción (Amrutha et al., 2023). Si bien la adsorción mono-soluto de plaguicidas ha sido el objeto de gran cantidad de investigaciones empleando muy diversos adsorbentes (Ighalo et al., 2021), la mayoría de las aplicaciones reales involucra sistemas con múltiples componentes. Cuando existe más de un contaminante, en este caso los plaguicidas, el estudio del comportamiento en conjunto es necesaria, ya que además de las interacciones adsorbato-adsorbente pueden presentarse interacciones entre las mismas moléculas de los plaguicidas que favorezcan la adsorción (sinergismo) o perjudique la misma (antagonismo). También puede ocurrir que no exista interacción y el comportamiento del plaguicida sea el mismo solo o en presencia de otros en solución a la hora de ser adsorbidos (Amrutha et al., 2023).

Se sabe que la composición y el tipo de material orgánico presentes en las camas biológicas son cruciales para la retención de los plaguicidas, es decir, la partición de los plaguicidas entre la fase sólida (biomezcla) y la fase líquida (solución de plaguicidas). Asimismo, estas características son importantes para la actividad de los microorganismos responsables de la degradación de los plaguicidas, para que la biomezcla sea una matriz biológicamente activa (De Wilde, 2009).

#### **I.6 Vermirremediación. Incorporación de la acción de las lombrices para potenciar la capacidad degradativa de las biomezclas**

Cuando la concentración de plaguicidas alcanzada en las biomezclas es menos perjudicial para el ecosistema que al inicio, puede ser factible incorporar la acción de lombrices de tierra para que mejoren o finalicen dicho proceso. La vermirremediación es definida como una tecnología de biorremediación que se basa en aprovechar el ciclo de vida de la lombriz (alimentación, excavación, metabolismo, secreción) y su interacción con otros factores abióticos y bióticos para acumular, extraer, transformar o degradar contaminantes de su entorno (Grasserová et al., 2020).

Específicamente, se ha reportado el incremento de la actividad de enzimas detoxificantes en las lombrices, como el grupo de enzimas citocromo P450 y la glutatión-S-transferasa cuando ingieren diferentes tipos de compuestos nocivos, lo que indica que son capaces de transformarlos o degradarlos (Grasserová et al., 2020). Asimismo, son utilizadas para remediar sustratos contaminados porque contribuyen a la dispersión de microorganismos y nutrientes, e inducen comunidades microbianas que producen exoenzimas detoxificantes como lacasas, tirosinasas, peroxidasas y carboxilesterasas (Sánchez-Hernández et al., 2021). El vermicompost que se forma con la acción de las lombrices también ayuda a reducir la movilidad de los plaguicidas debido a su alto contenido de materia

orgánica y así también reducir su escorrentía y lixiviación (Morillo & Villaverde, 2017; Sanchez-Hernandez et al., 2019).

Existen diversas investigaciones realizadas en base a la vermirremediación de plaguicidas en suelo como, por ejemplo, recientemente Tagliabue et al. (2025) estudiaron la incorporación de *E. fetida* en suelos contaminados con clorpirifós, Lin et al. (2019) estudiaron la influencia de dos especies diferentes de lombriz de tierra, observando una aceleración en la degradación de la atrazina en 28 días de vermicompostaje en suelo. Asimismo, otros autores como Njoku et al. (2018) estudiaron la vermirremediación aplicada al plaguicida diclorvós y Owagboriaye et al. (2020) que observaron una reducción de las concentraciones de glifosato en suelo al utilizar tres especies de lombrices diferentes luego de ocho semanas de exposición.

No obstante la vermirremediación sobre biomezclas contaminadas con plaguicidas no ha sido tan estudiada como en suelos, donde una de las investigaciones más destacadas corresponde a Lescano et al. (2020), quienes informan haber utilizado una dosis inicial elevada de glifosato (1000 mg kg<sup>-1</sup> biomezcla) a la que expusieron lombrices de la especie *E. fetida*, alcanzando un 90% de degradación del glifosato a los 30 días en comparación con la biomezcla sin lombrices, que alcanzaron el 15% aproximadamente al mismo tiempo. La biomezcla estaba formada por partes iguales en volumen de rastrojo de trigo y suelo. Se puede concluir de este trabajo que el uso de *E. fetida* dentro de los SBP fue una satisfactoria combinación para mejorar tanto la eliminación de glifosato como la de su metabolito AMPA. Otro trabajo que reporta la acción de las lombrices sobre biomezclas contaminadas con diurón, imidacloprid, tebuconazol, oxifluorfen y dimetoato fue el de Delgado-Moreno et al. (2020), aunque informaron que la presencia de *E. fetida* en las biomezclas contaminadas tuvo un efecto limitado en la disipación de residuos de plaguicidas, debido a la baja supervivencia de las mismas.

Debido a la limitada información sobre el trabajo de las lombrices en biomezclas, resulta interesante profundizar en el estudio de su incorporación a los SBP, para complementar, mejorar o finalizar la transformación de los contaminantes en las biomezclas. Luego de la acción de las lombrices, las biomezclas podrían ser utilizadas para otros fines, como enmiendas orgánicas o como material reciclado para nuevos tratamientos en SBP (Masin et al., 2018).

## I. 7 Selección y características de los plaguicidas evaluados

En este trabajo de Tesis se escogió trabajar en SBP con cinco plaguicidas que son comúnmente utilizados en la región y en el mundo (Aparicio et al., 2015; Casadinho, 2018). Ellos son: acetoclor (ACE), 2,4-D, cipermetrina (CIP), dimetoato (DIM) e imidacloprid (IMI). Sus estructuras moleculares y propiedades individuales se presentarán en los subsiguientes Capítulos. El ACE es un

herbicida cloroacetanilida, no persistente en el suelo y con baja capacidad de lixiviación. El 2,4-D, un herbicida de tipo fenoxi, es altamente soluble con una vida media corta (Pesticide Properties Data Base, 2025). La CIP es un insecticida de tipo piretroide, con una molécula no polar y una solubilidad en agua extremadamente baja, mientras que el DIM, un insecticida organofosforado, es altamente soluble en agua y, por lo tanto, propenso a la lixiviación. Por último, el IMI, un insecticida neonicotinoide, tiene una solubilidad moderada en agua, baja adsorción al suelo y alta capacidad de lixiviación (*Pesticide Properties Data Base*). Estos insecticidas son altamente tóxicos para las aves y las abejas melíferas y pueden tener graves implicaciones para la salud de los seres humanos y la vida acuática (Mantzós et al., 2016; Nugnes et al., 2023).

### **I.8 Aporte del trabajo de Tesis a los Sistemas de Biopurificación**

En Latinoamérica, las principales actividades socioeconómicas son la agricultura y la ganadería, íntimamente ligadas tanto al uso intensivo de plaguicidas como a la generación de residuos agropecuarios y agroindustriales.

Por un lado, los procesos asociados al manejo de agroquímicos son siempre riesgosos, ya que comprometen el ambiente y la salud humana. En particular, los residuos del lavado de tanques y maquinarias empleados en su aplicación suelen ser dispuestos de forma inadecuada en suelos cercanos a cuerpos de agua superficiales y subterráneos. Frente a esta problemática, los SBP se consolidan como una estrategia eficaz y de bajo costo para la gestión de plaguicidas, con ventajas en su instalación, mantenimiento y adaptabilidad a condiciones y materiales locales.

Por otro lado, la gestión inadecuada de residuos orgánicos agroindustriales representa un desaprovechamiento de recursos con potencial de valorización. El vermicompostaje permite transformar estos desechos en sustratos estables y funcionales, con propiedades similares a la turba, pero renovables y de menor costo ambiental y económico.

En este contexto, el presente trabajo propone ensayar la incorporación de sustratos vermicompostados obtenidos a partir de desechos locales de alto impacto ambiental —como la cama de pollo y los lodos activados— en reemplazo de la turba. Esta estrategia, además de favorecer la circularidad de los recursos, podría mejorar la capacidad de adsorción, la actividad enzimática y la diversidad microbiana de las biomezclas, aumentando así la eficiencia de los sistemas en la degradación de plaguicidas de uso regional.

Asimismo, la incorporación de *E. fetida* en los SBP (vermirremediación) enriquece y complementa el abordaje al potenciar la acción microbiana mediante la actividad de las lombrices. La combinación de SBP con residuos locales vermicompostados y la vermirremediación constituye,

por lo tanto, una propuesta innovadora para avanzar hacia tecnologías de biorremediación sostenibles, accesibles y adaptadas a la realidad productiva regional.

De esta manera, el aporte central de esta Tesis se orienta a generar conocimiento y herramientas aplicables para la mitigación de la contaminación puntual por plaguicidas, al tiempo que promueve la valorización de residuos orgánicos en el marco de la economía circular. Con base en estos lineamientos, se plantean a continuación los objetivos del trabajo.

## **Objetivos del trabajo**

- Objetivo general

Aplicación de procesos de biorremediación basados en el uso de camas biológicas que incorporan vermicompost como sustrato y la vermirremediación para el tratamiento de efluentes con plaguicidas.

- Objetivos Específicos

- ✓ Diseñar biomezclas conteniendo vermicompost obtenido a partir del reciclado de residuos agropecuarios.
- ✓ Caracterizar los procesos de adsorción de plaguicidas en las biomezclas con vermicompost.
- ✓ Estudiar el proceso de degradación de plaguicidas en las biomezclas con vermicompost.
- ✓ Evaluar la efectividad del proceso de vermirremediación incorporando lombrices de tierra a las camas biológicas diseñadas para el tratamiento de efluentes con plaguicida.

## 1. Diseño de las biomezclas basadas en vermicompost

### 1.1. Introducción

De acuerdo con el *Informe Productivo Provincial* presentado en noviembre del Ministerio de Economía Argentina (2023), la provincia de Santa Fe se posiciona entre las más productivas de Argentina, tanto por sus condiciones edáficas y climáticas favorables como por su marcada diversificación productiva. La provincia presenta un destacado desarrollo agroindustrial, en el cual los cultivos de cereales y oleaginosas representan aproximadamente el 83,4% del área total implantada, además de constituirse como la segunda provincia ganadera del país.

La alta actividad agropecuaria genera una considerable cantidad de residuos orgánicos, los cuales poseen potencial para ser estabilizados y valorizados mediante distintos procesos (Terrile et al., 2024). Entre los residuos agroindustriales orgánicos locales con potencial de aprovechamiento se destacan la cama de pollo, el aserrín, la cascarilla de arroz. Por otra parte, el aumento de la población urbana ha incrementado la cantidad de lodos activados (LA) generados en las plantas de depuración, cuyo manejo representa un desafío técnico y económico. Estos lodos contienen una comunidad microbiana variada y su uso directo en suelos puede generar efectos no deseados sobre su calidad. Todos estos materiales pueden ser estabilizados a través del proceso de vermicompostaje —mediado por la acción de la lombriz *E. fetida*— y posteriormente utilizados como componente de las biomezclas que conforman los Sistemas de Biopurificación (SBP).

Durante el proceso de biotransformación de los residuos, resulta imprescindible evaluar parámetros fisicoquímicos y biológicos que permitan determinar su grado de estabilización, su actividad biológica y otras propiedades que orienten su uso adecuado. De igual modo, es fundamental analizar el desempeño de las lombrices mediante su monitoreo en los diferentes sustratos, dado que posteriormente serán utilizadas asistiendo en etapas específicas de biorremediación (Lim et al., 2012).

El vermicompost obtenido constituye un recurso promisorio como sustituto de materiales no renovables, tales como la turba, en la formulación de SBP. Este producto se caracteriza por un menor contenido de carbono, mayores concentraciones de macronutrientes (N, P, K) y un pH neutro a ligeramente alcalino, condiciones que favorecen el mantenimiento de comunidades microbianas metabólicamente activas. Asimismo, el uso de materiales lignocelulósicos de distinto origen en las biomezclas adquiere relevancia por su capacidad de promover la actividad de hongos implicados en los procesos de degradación de contaminantes (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018).

## **1.2. Objetivo**

El objetivo de este primer Capítulo fue diseñar biomezclas cuya composición esté basada en sustratos previamente vermicompostados a partir de residuos locales, que aporten materia orgánica, capacidad de adsorción, mayor actividad biológica y sean adecuadas para la degradación de los plaguicidas seleccionados. Asimismo, se buscó estudiar el desempeño de las lombrices durante la etapa de vermicompostaje y posteriormente caracterizar tanto el sustrato vermicompostado obtenido, así como las biomezclas formuladas.

## **1.3. Materiales y métodos**

### **1.3.1. Obtención y biotransformación de los residuos**

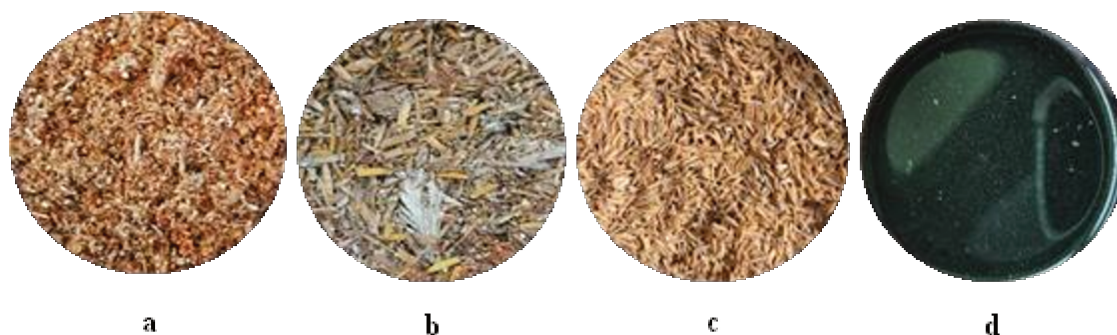
En esta primera etapa del trabajo se utilizaron residuos agropecuarios locales provistos por diferentes sectores productivos de la provincia de Santa Fe: aserrín de eucaliptus (AS), de un aserradero de Helvecia, cama de pollo (CP), de una granja de cría de pollos de Arroyo Leyes y cascarilla de arroz (CA), de una arrocera de Franck (Fig.3- a, b, c). La cama de pollo, específicamente, contenía una composición que combinaba de cascarilla de arroz con heces de la cría aviar y también restos de plumas.

Se realizaron ensayos preliminares de mezclas con diferentes proporciones volumétricas de los componentes. Se mantuvo la humedad al 70% por aspersión manual, empleando agua corriente. Se registró periódicamente la temperatura, comparándola con la temperatura ambiente para analizar si era factible una estabilización inicial de las mezclas. Sin embargo, no se logró la temperatura adecuada para obtener una etapa termófila sanitizante. Los factores causales posiblemente fueron la composición elevada en materiales lignocelulósicos, la dificultad en la degradación de la cascarilla de arroz, una escasa cantidad de materiales ricos en nitrógeno y un volumen de materiales tal que dificulta la conservación de la temperatura.

En base a estos resultados, se procedió a diseñar una mezcla (C1), conteniendo 3 partes de AS y 4 de CP, para obtener una buena relación C/N. La mezcla se ubicó en un recipiente plástico de 45 L, al exterior de la planta piloto de INTEC (31° 38' 23,2" S, 60° 39' 59,8" O), al resguardo de la lluvia y con protección con malla metálica para evitar el ingreso de insectos. Se mantuvo la humedad como se mencionó previamente. Además, se estudió la posibilidad de incorporar otros residuos que pudieran mejorar el proceso de estabilización. Se optó por emplear lodos cloacales activados (LA), provenientes de la planta depuradora de líquidos cloacales de la ciudad de Rafaela (Fig. 3-d), con los cuales se diseñó una segunda mezcla (C2) de similar composición que C1 (3:4:4, AS:CP:LA, respectivamente), con la diferencia que la humedad inicial se alcanzó aprovechando el agua presente

en la composición propia de los lodos. Los LA están permitidos para su utilización como materia prima para la producción de enmiendas según la norma IRAM 29.559 (2017).

Se llevó a cabo una etapa de estabilización de C1 y C2 que duró 110 días. Este tiempo fue necesario debido a las características recalcitrantes de la cascarilla y se basó, además, en experiencias anteriores del grupo de investigación de nuestro instituto.



**Figura 3.** Residuos orgánicos utilizados. a) Aserrín de eucaliptus; b) Cama de pollo; c) Cascarilla de arroz y d) Lodos activados cloacales.

Una vez estabilizadas las mezclas, se procedió a vermicompostar ambas para continuar con la biotransformación y así, obtener el vermicompost de cada una de las mezclas: V-C1 (para C1) y V-C2 (para C2).

El vermicompostaje se llevó a cabo en cajas de vidrio de 30 x 20 x 10 cm (por triplicado) en las que se agregaron lombrices cliteladas adultas de la especie *Eisenia fetida* (20 individuos  $\text{kg}^{-1}$  sustrato) criadas en nuestro propio bioterio de oligoquetos terrestres, bajo condiciones estandarizadas. Las mezclas fueron transformadas por la actividad de las lombrices durante 75 días a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), humedad controlada (50%) y luz artificial constante.

### 1.3.2. Caracterización fisicoquímica y biológica de los sustratos

Se midieron y monitorearon diferentes parámetros fisicoquímicos y biológicos para evaluar y caracterizar las mezclas en los diferentes momentos de la estabilización y el vermicompostaje (Tabla 1). Para las determinaciones, las muestras fueron siempre tomadas a partir de un pool de cinco puntos de diferentes zonas de cada unidad experimental.

- Parámetros fisicoquímicos: las determinaciones fisicoquímicas consistieron en medición de materia orgánica (MO), pH, conductividad eléctrica (CE), nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ),

carbono, hidrógeno y nitrógeno totales (CHN), fósforo total (P) y asimilable ( $P_{As}$ ), y cuantificación de metales de intercambio catiónico.

Por un lado, el contenido de MO se determinó mediante el método de pérdida de masa por ignición, a partir de la calcinación de las muestras en mufla a 550 °C, obteniendo el contenido de MO en base seca por diferencia gravimétrica entre el peso seco original y las cenizas generadas (Zagal & Sadzawka, 2007). El pH y la CE se midieron en un extracto de sustrato fresco y agua destilada 1:10 (p:v) empleando un medidor multiparamétrico (HACH®HQd) (Roselli, P. Satti & Crego, 2017). La concentración de  $N-NH_4^+$  se midió sobre el mismo extracto de pH y CE y se obtuvo a partir del método de Azul de Indofenol (Laos et al., 2002), empleando un kit comercial (WienerLab® para uremia) y un colorímetro portátil (HACH®DR900) con el que se realizaron las mediciones a 610 nm. Las concentraciones de CHN se midieron a partir del servicio de análisis elemental de CHONS (LECO CHN628) perteneciente a la FIQ-UNL, a partir de muestras secas y molidas de los sustratos. Se determinó, además, sobre cada uno de los extractos correspondientes de las muestras y mediante la medición de la absorbancia a 880 nm (Espectrofotómetro Perkin Elmer®), la concentración de  $P_{As}$  a partir de la extracción con  $NaHCO_3$  0,5 M y fósforo total (P), acorde a la norma USEPA 200.2, mediante la digestión ácida de las muestras empleando  $HNO_3$  y  $HCl$ , y luego aplicando el método de Azul de Molibdeno (Murphy & Riley, 1962). Luego, una alícuota del digerido de P se utilizó para determinar el contenido de metales de intercambio catiónico:  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , que fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica mediante la tercerización del servicio a la Cámara Arbitral de Cereales (Bolsa de Comercio de Santa Fe) acorde al método USEPA 200.9 (USEPA, 1994).

- Parámetros biológicos: cuantificación de la hidrólisis de la FDA y cuantificación de microorganismos patógenos.

Por otro lado, se cuantificó la hidrólisis de la FDA, según la técnica de Adam & Duncan (2001) con algunas modificaciones (Masin et al., 2020b). Medir y monitorear en el tiempo la FDA es de gran relevancia debido a que las enzimas responsables de la hidrólisis de ésta no son específicas, sino que incluye hidrolasas como esterasas, proteasas y lipasas que participan durante el ciclado de los nutrientes y la descomposición de los materiales, siendo así una medida indirecta de la actividad de un amplio espectro de microorganismos durante ambos procesos (INTA, 2018). El procedimiento consistió en colocar 1g de muestra fresca en contacto con 6 ml de solución buffer de fosfato potasio 60 mM y 100  $\mu$ l de solución de fluoresceína diacetato (1000  $\mu$ g FDA/ml) por una hora a 25°C. Luego, se añadieron 6 ml de acetona para finalizar la reacción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3200 rpm por 5 min. Finalmente, la absorbancia del sobrenadante se midió puntualmente a 490 nm empleando un espectrofotómetro UV-vis (Perkin Elmer®). Las determinaciones se realizaron por

triplicado, incluyendo un blanco de reactivo. La concentración de fluoresceína liberada se calculó en referencia a la curva de calibración realizada con soluciones estándar de fluoresceína. Los resultados se corrigieron con los valores de humedad de la masa de las muestras empleadas y luego fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de fluoresceína liberada por gramo de sustrato en una hora ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

Todos estos parámetros mencionados fueron medidos al iniciar y finalizar tanto la etapa de estabilización como de vermicompostaje en ambas mezclas, excepto MO, cenizas, pH, CE y FDA que, además, se monitorearon cada 15 días durante la etapa de vermicompostaje.

Por último, al finalizar la estabilización y el vermicompostaje se cuantificaron microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y coliformes totales y fecales). Este servicio fue realizado por SECEGRIN, CONICET.

**Tabla 1.** Cronograma de las determinaciones mencionadas a lo largo del Capítulo.

Determinación / Tiempo (días)	ESTABILIZACIÓN		VERMICOMPOSTAJE					
	0	110	110/0	15	30	45	60	75
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X
MO y cenizas	X	X	X	X	X	X	X	X
pH y CE	X	X	X	X	X	X	X	X
CHN	X	X	X					X
P y P <sub>AS</sub>		X	X					X
Metales (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Mg <sup>+2</sup> , Ca <sup>+2</sup> )		X	X					X
Microorganismos patógenos		X						X
Evaluación de huida		X						
FDA	X	X	X	X	X	X	X	X
Recuento lombrices			X	X	X	X	X	X
BS lombrices adultas			X	X	X	X	X	X

La decisión de escoger, medir y monitorear los parámetros fisicoquímicos y biológicos mencionados anteriormente se basó en que cada uno de ellos juega un papel importante en el proceso de transformación de los residuos originales, aportando información valiosa que permite corroborar la evolución positiva durante su seguimiento. Sin embargo, todos estos procesos están constantemente ligados e interrelacionados entre sí. El N es generalmente el nutriente limitante de casi todos los

ecosistemas, seguido por el P. La MO presente es aquella que regresó al suelo tras un proceso de descomposición de los distintos materiales y su presencia es dinámica, por ello es uno de los componentes más importantes del suelo, a la vez que posee un rol importante en la alteración de la capacidad de intercambio catiónico y la capacidad de sorción del sustrato (Aihemaiti et al., 2018). La importancia de la cuantificación y seguimiento del  $N-NH_4^+$  radica en que por arriba de un determinado límite resulta fitotóxico (tóxico para el desarrollo y crecimiento de las plantas). N, P y K son macronutrientes primarios y Mg y Ca son secundarios, y deben ambos estar presentes en cantidades adecuadas, para obtener un sustrato que pueda ser utilizado como futura enmienda o fertilizante orgánico (Román et al., 2013). La variación del pH afecta a la actividad microbiana y también la solubilización y adsorción de diferentes sustancias. El C es el elemento más importante por su rol en la nutrición de los microorganismos y representa al menos la mitad de la masa seca de una célula. Los microorganismos son capaces de emplear las formas más oxidadas ( $CO_2$ ), los complejos polímeros de alto peso molecular, y hasta incluso compuestos que pueden ser tóxicos (INTA, 2018) a lo largo de la transformación de los materiales orgánicos.

A lo largo de este Capítulo los conceptos mencionados se continuarán discutiendo con mayor detalle, acorde a cada una de las etapas experimentales siguientes.

### **1.3.3. Monitoreo biológico de las lombrices**

Para llevar a cabo la etapa de vermicompostaje, las lombrices fueron obtenidas de nuestro propio bioterio adherido al Sistema Nacional de Bioterios del ex MINCyT, tal como se mencionó con anterioridad.

Antes de comenzar el vermicompostaje, se comprobó la aceptación de los sustratos por parte de las lombrices (*E. fetida*), mediante una prueba de huida (Hund-Rinke & Wiechering, 2001; OECD, 1984a; Owojori & Reinecke, 2009). Esta prueba consistió en colocar en una caja mitad suelo control (del bioterio) y mitad sustrato a evaluar (300 g por sección), y en la división se colocaron 10 individuos adultos durante 72 h. Al finalizar el período se contabilizó la cantidad de individuos presentes en cada lado, calculando así, la evitación (positiva si la mayor parte de las lombrices se desplazaron hacia el control, y negativa si fueron hacia el sustrato que está siendo evaluado).

Antes de ser colocadas en los sustratos, se registró la biomasa promedio de las lombrices (día 0) y luego ésta se registró cada 15 días (solo en individuos adultos), al igual que los parámetros mencionados anteriormente. Además, en cada registro se contabilizó número de individuos adultos y de juveniles (nuevos individuos) presentes en cada réplica (cajas de vidrio).

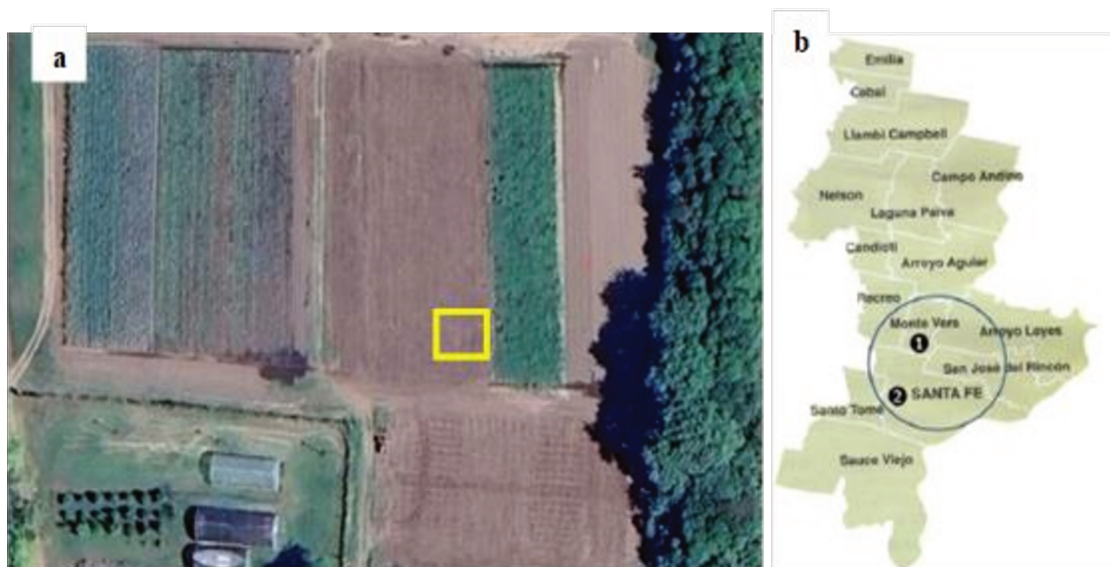
### 1.3.4. Diseño y elaboración de las biomezclas

Las biomezclas se diseñaron y prepararon, teniendo en cuenta trabajos anteriores del propio grupo (Fernandez et al., 2022; Lescano et al., 2018) y bibliografía vinculada a las camas biológicas que contienen sustratos orgánicos alternativos que reemplazan la turba (Acosta-Sánchez et al., 2020; Dias et al., 2021; Karanasios et al., 2010). En este caso, la turba fue reemplazada por la adición del vermicompost como sustrato humificante en las biomezclas.

Las biomezclas se realizaron mezclando los siguientes materiales: rastrojo de trigo (R), como sustrato lignocelulósico; suelo agrícola (S), como sustrato con microorganismos posiblemente adaptados a la presencia de plaguicidas, y los sustratos vermicompostados obtenidos previamente (V-C1 y V-C2), como materiales que aporten materia orgánica y capacidad biológica de degradación (Fig. 4). En la Figura 5 se puede observar la localización de procedencia de ambos sustratos. El rastrojo se obtuvo de una parcela de campo ubicada en Monte Vera (Santa Fe) y el suelo, de un campo experimental localizado en Ángel Gallardo (Santa Fe). En ambos casos, se escogió el período post cosecha para recolectar estos materiales, ya que implica que estos componentes estuvieron expuestos a plaguicidas, y que probablemente, como se menciona en el caso del suelo, se haya desarrollado una comunidad microbiológica adaptada a estas condiciones. Cabe mencionar que todos los componentes de las biomezclas se secaron al aire antes de ser mezclados. El suelo se tamizó con una malla de apertura de 3 mm y R fue triturado en porciones de 3 cm aproximadamente.



**Figura 4.** Componentes empleados. a) Suelo agrícola; b) Rastrojo de trigo y c) vermicompost obtenido.



**Figura 5.** a) Localización de la parcela de la cual se obtuvo el suelo agrícola (Fig. 4a), en el Centro Experimental del INTA en Ángel Gallardo, Santa Fe (-31.55 S, -60.674 W); b) Localización en Monte Vera, Santa Fe, sitio del cual se extrajo el rastrojo de trigo empleado (Fig. 4b).

Estas biomezclas se aplicarán a los ensayos de degradación de plaguicidas que son presentados en el siguiente Capítulo 2. En base a estos materiales, se diseñaron tres biomezclas diferentes (Fig. 6), dos con los vermicompost obtenidos, una con composición convencional con S y R (biomezcla de referencia), y un cuarto sustrato compuesto de solo S, como control. La composición de las mismas se detalla a continuación, en proporciones volumétricas (v/v):

- S +R +V–C1 (1:2:1) (definida con el acrónimo, SRV-C1).
- S +R +V–C2 (1:2:1) (definida con el acrónimo, SRV-C2).
- S +R (1:1 v/v) (definida con el acrónimo, SR).

Las biomezclas y el suelo se dispusieron por triplicado en recipientes de vidrio de 20×10×12 cm (Fig. 6) y se maduraron durante 30 días, a temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C), con humedad controlada al 70% mantenida con agua corriente. La maduración previa de las biomezclas es un punto crucial para que los materiales se integren adecuadamente y los componentes separados comiencen a funcionar de manera integral. De esa manera se aumenta la cantidad de microorganismos, junto a sus enzimas, que luego serán necesarios para cumplir su objetivo principal, degradar los plaguicidas (Dias et al., 2020).



**Figura 6.** Biomezclas preparadas durante su maduración en recipientes de vidrio. De Izq. a Der.: biomezcla SR (suelo: rastrojo); SRV-C1(suelo: rastrojo: vermicompost 1); SRV-C2 (suelo: rastrojo: vermicompost 2).

### 1.3.5. Caracterización de las biomezclas

Luego de los 30 días de maduración, se procedieron a caracterizar fisicoquímica y biológicamente las biomezclas y el suelo.

- Parámetros fisicoquímicos: pH, CE, MO, cenizas y pH en el punto de carga cero ( $pH_{cc}$ ).
- Parámetros biológicos: hidrólisis de la FDA y actividad de enzimas fenoloxidasas (FOX).

El  $pH_{cc}$  permite conocer la posible afinidad de un adsorbente por un adsorbato específico. Se define como el valor del pH en el cual la carga neta de las partículas sobre la superficie del material adsorbente (en este caso la biomezcla) es neutra, es decir, el número de sitios positivos y negativos se equilibran (Villa Amaringo & Hormaza Anaguano, 2013). Se determinó el  $pH_{cc}$  según el método de (Dastgheib et al., 2004). Se prepararon soluciones con agua destilada previamente hervida y enfriada, ajustando el pH entre 2 y 10 unidades, adicionando las cantidades necesarias de HCl y NaOH (0,1; 0,5 y 1 M) hasta obtener el pH deseado. A 20 mL de estas soluciones se le añadieron 0,1 g de la biomezcla correspondiente, y se dejaron en agitación por 48 h. Finalmente se volvió a medir el pH de las mismas soluciones. Posteriormente se graficaron ambas curvas, la del pH inicial y la del pH final. El punto en el cual ambas curvas se interceptaron fue el  $pH_{cc}$ .

En cuanto a las determinaciones biológicas, como se mencionó en la Sección 1.3.2, por un lado, la FDA mide de manera indirecta principalmente la actividad de las enzimas hidrolíticas (lipasas y esterases) producidas por microorganismos dentro de las biomezclas. Por otro lado, FOX mide la presencia de peroxidasas de manganeso y lacasa. Estas enzimas son clave en la biotransformación de muchos plaguicidas. Los microorganismos gracias a su actividad enzimática tienen el potencial de degradar los plaguicidas, aprovechándolos como nutrientes y energía (Bose et al., 2021).

La técnica de FOX se realizó de acuerdo con Castillo et al. (1994) y Tortella et al. (2012) y consistió en contactar 10 g de muestra secada al aire con 25 mL de solución buffer de ácido succínico/láctico 100 mM (5,9 g de ácido succínico disuelto en agua destilada junto con ácido láctico 85-90%, y el pH se reguló con NaOH 1N hasta 4,5 llevando a un volumen final de 500 mL). Una vez contactada la muestra, los tubos se agitaron durante 2 horas en un agitador orbital. Finalmente, las muestras se centrifugaron por 20 min. a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y se llevó al espectrofotómetro. Para iniciar la reacción, se añadieron en la cubeta 3,12 mL de sobrenadante filtrado, 600  $\mu\text{L}$  de ácido 3,3-dimetilaminobenzoico (DMAB), 200  $\mu\text{L}$  de hidrazona de 3-metilo-2-benzotiazolinona (MBTH), 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  y 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los reactivos se homogeneizaron y se midió la absorbancia a 590 nm por 10 min. Luego, se graficaron estas absorbancias respecto al tiempo y se realizó una regresión lineal para obtener la pendiente ( $\Delta \text{Abs min}^{-1}$ ). El coeficiente de extinción molar utilizado fue de 53000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Castillo et al., 1994) y una longitud de paso de la cubeta de 1 cm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{moles kg biomezcla}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

El resto de las técnicas analíticas empleadas en esta Sección se pueden encontrar descriptas con detalle en la Sección 1.3.2 de este Capítulo.

#### **1.4. Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como los valores promedio de al menos tres mediciones a las que se les calcularon e informaron sus desviaciones estándar (SD). Para comparar la respuesta entre los grupos de mediciones, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post hoc de Tukey con un nivel de significancia establecido en  $p < 0,05$ . En el caso de comparación de mediciones puntuales, se utilizó la prueba t-Student, considerando un nivel de confianza del 95 %. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando Minitab, versión 19.

#### **1.5. Resultados y discusión**

##### **1.5.1. Características de los residuos originales**

En la Tabla 2 se presentan las principales características de los residuos individuales. Dos de ellos (CP y AS) fueron previamente caracterizados por el grupo de investigación en Masin et al. (2020). La Tabla muestra que solo CP presentó un pH alcalino, y el mayor contenido de N, propio de su composición, por la presencia de heces provenientes de la cría aviar. El pH y CE más bajos fueron determinados en AS, mientras que en CP se observó la CE más alta, seguida por LA. El aporte mayoritario de MO y C provino del AS y CP. Debido al tipo de residuo, LA contenía un grado elevado de humedad, esta característica fue la que permitió preparar la mezcla C2, sin la adición de agua

corriente. La naturaleza rica en MO de AS y la mayor relación C/N, lo hicieron adecuado para poder ser mezclado con residuos ricos en N, como CP. La concentración de N de CP estuvo dentro lo registrado para otras camas de pollo de la región (2,81 %) (Gange, 2016). Del mismo modo, autores tales como Leconte et al. (2009) han mencionado una relación C/N similar a la presente para AS, de 106, así como también los valores de CE para la cama de pollo que reportan (4,3 mS cm<sup>-1</sup>) coinciden con los de este trabajo; los valores de pH también son concordantes, encontraron que AS tiende a ser el componente más ácido (6,7) y CP el más alcalino (8). Posteriormente, estos residuos individuales, tal como se mencionó en la metodología, fueron combinados para dar lugar a las mezclas C1 (sin lodos) y C2 (con lodos) a estabilizar.

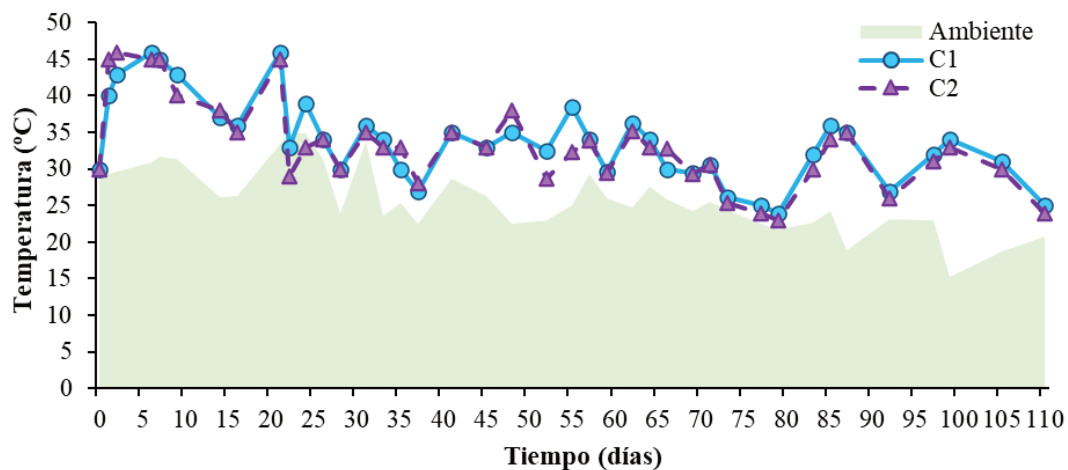
**Tabla 2.** Principales características fisicoquímicas de los residuos originales <sup>a</sup>(Masin et al., 2020).

	CP <sup>a</sup>	AS <sup>a</sup>	LA
pH	8,96	5,21	6,89
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	5,71	0,09	4,93
MO (%)	81,29	99,31	56,84
Cenizas (%)	18,71	0,69	43,16
C (%)	34,10	35,60	16,20
N (%)	2,33	0,27	1,40
C/N	14,63	131,85	11,57
Humedad (%)	18,46	41,01	94,71
Densidad (g L <sup>-1</sup> )	345,00	175,00	108,00

### 1.5.2. Caracterización fisicoquímica y biológica de los sustratos biotransformados

A lo largo de la estabilización se midió regularmente la temperatura de ambas mezclas para analizar si se podía producir un compostaje estricto. En la Figura 7 se puede ver plasmado el perfil de temperaturas de las mezclas, en comparación con la temperatura ambiente. Durante la primera etapa, se alcanzó un máximo de 46 °C, tanto en C1 como en C2. La etapa termófila registrada consistió en pocos días, después de la cual la temperatura de las mezclas disminuyó por debajo de los 40 °C, y tanto C1 como C2 permanecieron en una etapa mesófila prolongada. Algunos autores, tales como Semitela et al. (2019), han observado una inhibición en la etapa termófila del compostaje por acción de microorganismos mesófilos adaptados. Asimismo, se han reportado casos de compostaje a baja temperatura durante largos períodos, logrando una reducción parcial de patógenos (Manga et al.,

2021; Pandey et al., 2016). Otros autores como Lepesteur (2022), han observado también que la higienización del sustrato no solo depende de los ciclos de temperatura, sino que también factores como el pH, la volatilización del amonio y ácidos, o incluso la producción de subproductos metabólicos propios del proceso pueden hacer que se inactiven microorganismos patógenos que pudiesen estar presentes en los residuos originales. Se concluye entonces que esta etapa no alcanzó las temperaturas requeridas para considerarlo un compostaje estricto; sin embargo, el objetivo de estabilizar, integrar y disminuir la dureza de los materiales originales para que luego puedan continuar siendo transformados por las lombrices, fue alcanzado.



**Figura 7.** Perfil de temperaturas durante 110 días de las mezclas C1 ● y C2 ▲ (líneas) respecto de la temperatura ambiente (sombreado verde) provista por el Centro de Informaciones Meteorológicas de la FICH (UNL).

Ambos sustratos estabilizados obtenidos se caracterizaron fisicoquímica y biológicamente, tal como se puede observar en la Tabla 3. Al comienzo de la estabilización, la concentración de  $N-NH_4^+$ , en coherencia con la composición, fue elevado en las dos mezclas (mayor a  $6100 \text{ mg } N-NH_4^+ \text{ kg}^{-1}$ ), observándose una disminución del 99% al finalizar ( $p_{C1}=0,001$ ;  $p_{C2}=0,003$ ). Estos valores cumplieron con las concentraciones máximas recomendadas por SENASA (2019), en la Resolución N° 1/2019, para este tipo de sustrato ( $< 400 \text{ mg } N-NH_4^+ \text{ kg}^{-1}$ ). Esta pérdida pudo ocurrir posiblemente a causa de la evaporación como amoníaco o por la nitrificación durante la descomposición de la MO (Şevik et al., 2018). Masin et al. (2020a) informaron valores de nitrógeno amoniacal iniciales mucho más bajos para mezclas que contenían CP ( $997-1663 \text{ mg } N-NH_4^+ \text{ kg}^{-1}$ ), pero recién luego del vermicompostaje arribaron a valores similares a los aquí ya obtenidos solo tras pasar la etapa de estabilización. Las pérdidas de N varían con el balance del C disponible y los niveles de oxigenación del sustrato, y como

se menciona antes, la pérdida en formas gaseosas durante el proceso de degradación. CP, el componente que mayor aporte de N tenía en las mezclas, se compone generalmente de un 60% de N de origen orgánico que queda sujeto a posterior mineralización, mientras que la fracción inorgánica de N, principalmente como  $\text{NH}_3$  gaseoso, es la que se pierde por volatilización (Gange, 2016).

La disminución del porcentaje de C se encuentra relacionada en gran parte con la bio-oxidación de éste, pasando de C orgánico a  $\text{CO}_2$  (Tiquia et al., 2002). Durante la estabilización, el porcentaje de C disminuyó aproximadamente 1,5 veces en ambas mezclas. La MO disminuyó ( $p_{C1}= 0,002$ ;  $p_{C2}= 0,001$ ) manteniéndose  $\geq 20$  %, y conservando la relación C/N menor a 30 al finalizar, tal como se exige en la misma norma de SENASA (2019). Por otro lado, la CE se redujo en un 80 % durante ese período ( $p_{C1}= 0,001$ ;  $p_{C2}< 0,001$ ). El pH de ambas mezclas se mantuvo alcalino durante todo el proceso.

Durante la estabilización, parte de las hemicelulosas pueden haberse degradado, suministrando nutrientes para la proliferación de microorganismos (Yu et al., 2019). Esto se puede ver reflejado en el aumento de la actividad microbiana total, la cual se describe en mayor detalle en la subsiguiente Sección 1.5.2.1. La celulosa es más difícil de degradar y generalmente solo queda parcialmente modificada en otras sustancias, también por acción de microorganismos. En cambio, la lignina, presente en materiales como CA, casi no es biodegradable y solo puede ser transformada parcialmente (Yu et al., 2019). Muchas de las sustancias y componentes que quedaron en el sustrato estabilizado continuaron su transformación con la acción de la posterior adición de las lombrices, que aprovecharon principalmente los fragmentos de menor tamaño como alimento.

**Tabla 3.** Parámetros característicos al comienzo y al final del proceso de estabilización.

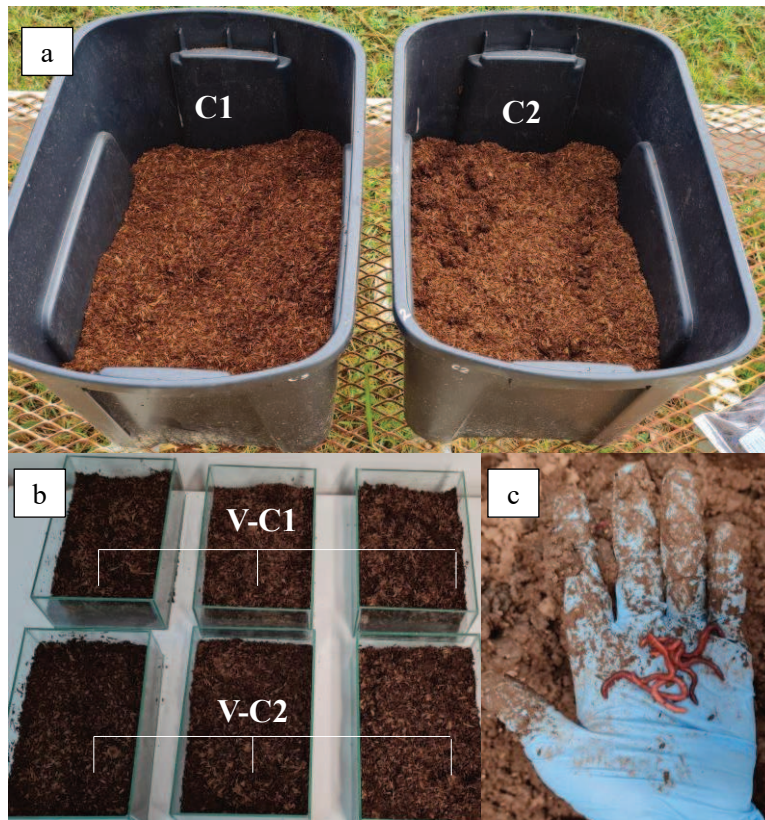
Parámetro	Día 0		Día 110	
	C1	C2	C1	C2
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> (mg kg <sup>-1</sup> )	6173 ± 369	5351 ± 526	26 ± 4	19 ± 3
<b>MO</b> (%)	86,1 ± 0,7	83,31 ± 0,03	73,2 ± 0,7	67 ± 1
<b>Cenizas</b> (%)	13,9 ± 0,7	16,69 ± 0,03	26,8 ± 0,6	33 ± 1
<b>pH</b>	8,6 ± 0,1	8,3 ± 0,3	9,2 ± 0,1	8,8 ± 0,1
<b>CE</b> (mS cm <sup>-1</sup> )	1,70 ± 0,08	1,38 ± 0,07	0,37 ± 0,03	0,24 ± 0,04
<b>C</b> (%)	33,2 ± 0,7	18,1 ± 0,2	19,1 ± 0,1	11,1 ± 0,6
<b>N</b> (%)	1,8 ± 0,3	1,1 ± 0	0,8 ± 0,06	0,63 ± 0,04
<b>H</b> (%)	5,8 ± 0,2	8,4 ± 0,2	7,6 ± 0,7	9,3 ± 0,1
<b>C/N</b>	18,4	16,5	24	17,6

Si bien todos estos valores estuvieron dentro de un rango aceptable para el crecimiento de *E. fetida* (Samal et al., 2017), se realizó una prueba de huida para cerciorar de que realmente las lombrices pudiesen ingresar. La prueba de huida se realizó al final de esta etapa de estabilización. Se contrastó contra el suelo control utilizado con normalidad en el bioterio. Tal como se observa en la Tabla 4, se obtuvo en promedio una evitación de -0,9 y -0,7 para C1 y C2, respectivamente, por lo que el mayor porcentaje de lombrices migraron a mezclas estabilizadas, mostrando mayor preferencia por estos sustratos. No se observó mortalidad (tasa de supervivencia del 100 %). Esto confirma que *E. fetida* no evitó ninguno de los dos sustratos estabilizados, asegurando que el vermicompostaje podía comenzar.

**Tabla 4.** Test de huida para *E. fetida* en los sustratos estabilizados. El rango de valores de huida varía entre -1 (0% de huida) y 1 (100% de huida).

Tratamiento	Réplica	Individuos en suelo	Individuos en C1 o C2	Huida
Suelo / C1	A	0	10	-1
	B	0	10	-1
	C	2	8	-0,6
Suelo /C2	A	0	10	-1
	B	2	8	-0,6
	C	2	8	-0,6

La Figura 8 muestra la diferencia de los sustratos en los procesos de estabilización (8-a) y de vermicompostaje (8-b) empleando los individuos *E. fetida* (8-c). Si bien los microorganismos son los principales responsables de la degradación bioquímica de la materia orgánica, las lombrices de tierra fueron los impulsores cruciales del proceso al fragmentar y acondicionar el sustrato, así como aumentar la superficie para propiciar la actividad microbiológica (Teferedegn & Ayele, 2024).



**Figura 8.** a) De izq. a der. mezclas C1 y C2 durante el proceso de estabilización; b) disposición por triplicado de las mezclas para el vermicompostaje (V-C1 y V-C2) y c) lombrices adultas *Eisenia fetida* del bioterio.

La combinación de biotransformación asistida por microorganismos y lombrices permitió obtener sustratos ricos en materia orgánica y no patógenos, para que luego sean funcionales para las biomezclas. Las características resultantes de los vermicompost obtenidos cumplen con muchas de las recomendaciones del marco estándar en lo que respecta a la madurez y la estabilidad de un sustrato ( $< 400 \text{ mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ ;  $\text{MO} > 20\text{-}30 \%$ ;  $\text{pH} < 5 > 8,5$ ;  $\text{CE} < 4$ ;  $\text{C/N} \leq 20 \text{ y } 30$ ), algunos de estos parámetros ya alcanzados desde la estabilización (SCyMA y SENASA, 2019; USEPA, 1993).

La Tabla 5 muestra las características iniciales y finales del proceso de vermicompostaje para la obtención de V-C1 y V-C2. La disminución de la relación C/N respecto a la etapa de estabilización, según Sharma & Garg, (2019), puede atribuirse a la continua respiración microbiana y a la degradación de hemicelulosa, celulosa y otros compuestos orgánicos y a la asimilación del carbono por parte de las lombrices. Según Biabani et al. (2018), el incremento en N durante la vermicompostaje está relacionado con la pérdida de C y la mineralización de la MO, aunque este incremento solo fue significativo en V-C2 ( $p_{V-C1} = 0,11$ ;  $p_{V-C2} = 0,03$ ). En el día 0, el contenido de C fue significativamente diferente entre C1 y C2 ( $p = 0,021$ ) pero, después de 75 días de vermicompostaje, los valores fueron similares y no se observó diferencia estadística entre ellos

( $p=0,11$ ). Las relaciones C/N resultantes, como se mencionó previamente fueron óptimas (20/1 o menos) para la asimilación del N por las plantas (Biabani et al., 2018).

El pH se encontró dentro de un rango aceptable para *E. fetida* (Singh et al., 2018), se observó una disminución en V-C1 ( $p=0,013$ ) y V-C2 ( $p=0,148$ ) después de 75 días, probablemente causada por la degradación de la materia orgánica y la formación de ácidos húmicos y orgánicos (Samal et al., 2017). La CE aumentó ( $p_{V-C1}=0,035$ ;  $p_{V-C2}=0,022$ ) y se estabilizó en  $0,8 \text{ mS cm}^{-1}$  respecto al día 0, por debajo del límite máximo recomendado para el crecimiento de plantas sensibles ( $1-2 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (Gondek et al., 2020), lo que también hace que los sustratos sean seguros y puedan ser empleados como enmiendas ricas en materia orgánica para componer una biomezcla en la que se puedan degradar los plaguicidas y a su vez no sean fitotóxicos. Este aumento en la CE pudo deberse a la liberación de iones inorgánicos y sales minerales, a través de la solubilización de la materia orgánica que continuaba en descomposición debido al proceso de vermicompostaje (Fu et al., 2015; Sharma & Garg, 2019), lo cual se produce en concordancia con la disminución del pH registrada.

Aunque el P aumentó significativamente en V-C2, siendo dos veces mayor que el de V-C1, la relación C/P se mantuvo similar durante el vermicompostaje tanto de C1 como de C2. Hubo un ligero aumento después de 75 días para ambos sustratos; aunque no fue estadísticamente significativo ( $p_{V-C1}=0,29$ ;  $p_{V-C2}=0,091$ ). Este aumento fue consistente también con el cambio de pH. Después del vermicompostaje, el contenido de  $P_{AS}$  en V-C2 fue significativamente mayor que en V-C1 ( $p=0,020$ ). Se registró además un leve aumento en  $K^+$  y  $Na^+$ , de acuerdo con el incremento en la CE de ambos sustratos vermicompostados. Otros autores han observado aumentos de  $P_{AS}$ ,  $K^+$  y N en el caso del vermicompostaje, como se informa en Singh et al. (2018). El  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  aumentaron en V-C1, pero disminuyeron en V-C2; el pequeño aumento en  $P_{AS}$  y la reducción de  $Ca^{2+}$  en V-C2 puede sugerir cierta solubilización de los fosfatos cálcicos con la reducción del pH. Estos nutrientes son necesarios para el metabolismo microbiano, y su disponibilidad en el sustrato final es un indicio de buena calidad, principalmente para la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (Nayak & Kalamdhad, 2014). Estos autores también reportan que el P puede aumentar gradualmente por la pérdida de masa seca neta del sustrato, y por pérdidas de CHON durante el proceso.

Respecto a la cantidad de coliformes fecales y totales registrada en el sustrato final, en ambos casos fue mucho menor a  $1000 \text{ NMP-g}^{-1}$ . Además, en ninguna de las mezclas compostadas se detectó presencia de *Salmonella* sp. Todos los valores obtenidos para patógenos se hallaron dentro de lo reglamentado en la Res. de SENASA N.º 1/2019 y en la Res. N.º 410/2018. Lepesteur (2022) reporta en su trabajo que diferentes autores no han registrado presencia de *Salmonella* sp. luego del compostaje y que la inactivación de *E.coli* a temperaturas cercanas a los  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  es posible, como en

este caso de estudio. Realizar estas determinaciones al finalizar ambos procesos permitió asegurar la obtención de un sustrato higiénico y seguro.

**Tabla 5.** Parámetros característicos al comienzo y al final del proceso vermicompostaje.

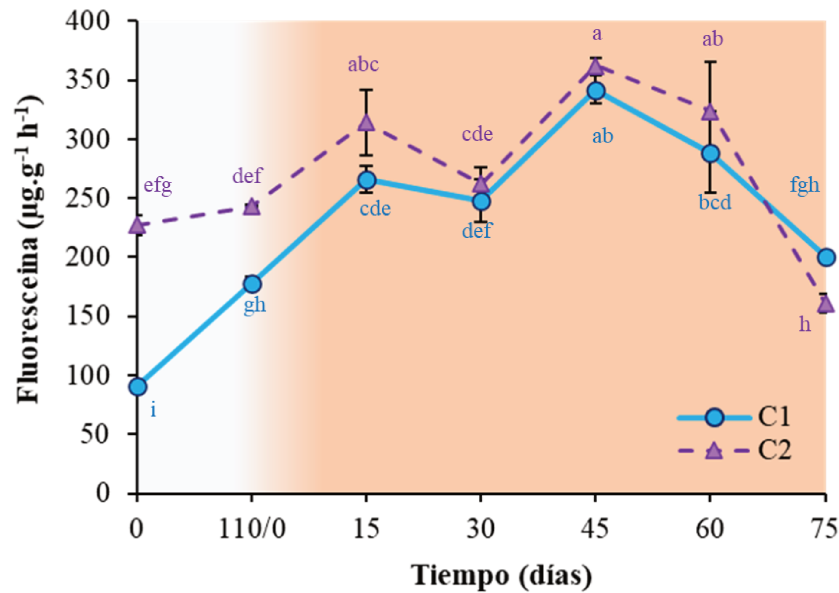
Parámetro	Día 0		Día 75	
	C1	C2	V-C1	V-C2
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> (mg kg <sup>-1</sup> )	26 ± 4	19 ± 3	13 ± 2	13 ± 1
<b>MO</b> (%)	73,2 ± 0,7	67 ± 1	64,5 ± 0,5	57 ± 3
<b>Cenizas</b> (%)	26,8 ± 0,6	33 ± 1	35,5 ± 0,5	43 ± 3
<b>pH</b>	9,2 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,18 ± 0,03
<b>CE</b> (mS cm <sup>-1</sup> )	0,37 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<b>C</b> (%)	19,1 ± 0,1	11,1 ± 0,6	17 ± 0,9	13 ± 0,3
<b>N</b> (%)	0,8 ± 0,06	0,63 ± 0,04	0,83 ± 0,08	0,9 ± 0,1
<b>H</b> (%)	7,6 ± 0,7	9,3 ± 0,1	7,75 ± 0,08	8,6 ± 0,2
<b>P<sub>As.</sub></b> (g kg <sup>-1</sup> )	2 ± 0,1	2,34 ± 0,06	2,2 ± 0,02	2,63 ± 0,01
<b>P</b> (g kg <sup>-1</sup> )	8,8	9,6	8,4	15,2
<b>C/P</b>	2,2	1,2	2,02	0,9
<b>C/N</b>	24	17,6	20,5	14,4
<b>K<sup>+</sup></b> (g kg <sup>-1</sup> )	7,06	4,90	8,00	6,18
<b>Na<sup>+</sup></b> (g kg <sup>-1</sup> )	3,30	3,57	4,73	5,80
<b>Mg<sup>2+</sup></b> (g kg <sup>-1</sup> )	5,41	10,88	6,72	8,83
<b>Ca<sup>2+</sup></b> (g kg <sup>-1</sup> )	30,69	37,16	42,53	32,79
<b>Col. totales</b> (NMP g <sup>-1</sup> )	-	-	210	210
<b>Col. fecales</b> (NMP g <sup>-1</sup> )	-	-	120	75
<b>Salmonella sp.</b>	-	-	ND	ND
<b>E. coli</b> (UFC g <sup>-1</sup> )	-	-	110	68

### 1.5.2.1. Variación de la hidrólisis de la FDA durante ambos procesos

La hidrólisis de la FDA en ambos procesos se puede observar en la Fig. 9. Durante la estabilización, la actividad microbiológica del sustrato C1 aumentó ( $91 \pm 1$  a  $178 \pm 5 \mu\text{g FDA g}^{-1}$  sustrato  $\text{h}^{-1}$ ) significativamente. En cambio, en C2 este incremento ( $227 \pm 8$  a  $243 \pm 1 \mu\text{g FDA g}^{-1}$  sustrato  $\text{h}^{-1}$ ) no fue estadísticamente considerable, posiblemente porque los valores de partida de la actividad microbiana de C2 fueron 2,3 veces más altos que el de C1 al iniciar la estabilización. Este suceso puede deberse a la incorporación de LA en dicha mezcla, ya que la adición de diferentes materiales ricos en carbono junto al LA puede resultar en cambios en la estructura de las comunidades

microbiológicas de la mezcla, aumentando la actividad microbiológica total, reflejado en los niveles de FDA, tal como menciona Dubova et al. (2020). Los valores de la actividad microbiana mediante la FDA obtenidos en este trabajo son consistentes con los registrados por Nikaeen et al. (2015). Aunque la mezcla con LA tenía mayor actividad microbiológica inicial, la hidrólisis de FDA aumentó en ambas mezclas. Esto sugiere el aumento de la actividad de los microorganismos mesófilos. Como la fase termofílica fue muy corta y no hubo temperaturas extremas, los microorganismos mesófilos probablemente se mantuvieron vivos y no murieron debido al aumento de los valores de temperatura; por lo tanto, los cambios en las comunidades microbianas podrían no haber sido abruptos, y la recolonización fue rápida y sostenida a lo largo del tiempo (Aguilar-Paredes et al., 2023).

La hidrólisis de la FDA registrada durante el vermicompostaje aumentó significativamente a los 45 días, 4 veces en V-C1 y se duplicó en V-C2 respecto a los valores registrados previos al proceso de estabilización (día 0). A los 30 días de actividad de las lombrices comenzaron a surgir los primeros individuos juveniles, motivo por el cual podría reflejarse la baja en la actividad microbiana (por mayor consumo repentino de alimento). Del día 45 (máxima actividad registrada) al día 75 del vermicompostaje ambas mezclas mostraron una disminución significativa de la actividad microbiológica. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las mezclas a este tiempo. Finalmente, la actividad microbiológica total al día 75 fue semejante a los valores de partida del vermicompost. Este fenómeno se condice con un gran aumento de la población inicial de lombrices y una menor disponibilidad de MO para los microorganismos. Los resultados obtenidos del desempeño en la reproducción de las lombrices durante el vermicompostaje se indican en detalle en la siguiente Sección (1.5.3). Tal como menciona Huang et al. (2013) en su investigación, las lombrices son capaces de promover los procesos de estabilización de la materia orgánica y la actividad microbiológica durante el vermicompostaje. Los resultados estadísticos se encuentran detallados en el Anexo IV: “Análisis estadístico: ANOVA- Modelo lineal general- Comparaciones por parejas “ad hoc”.

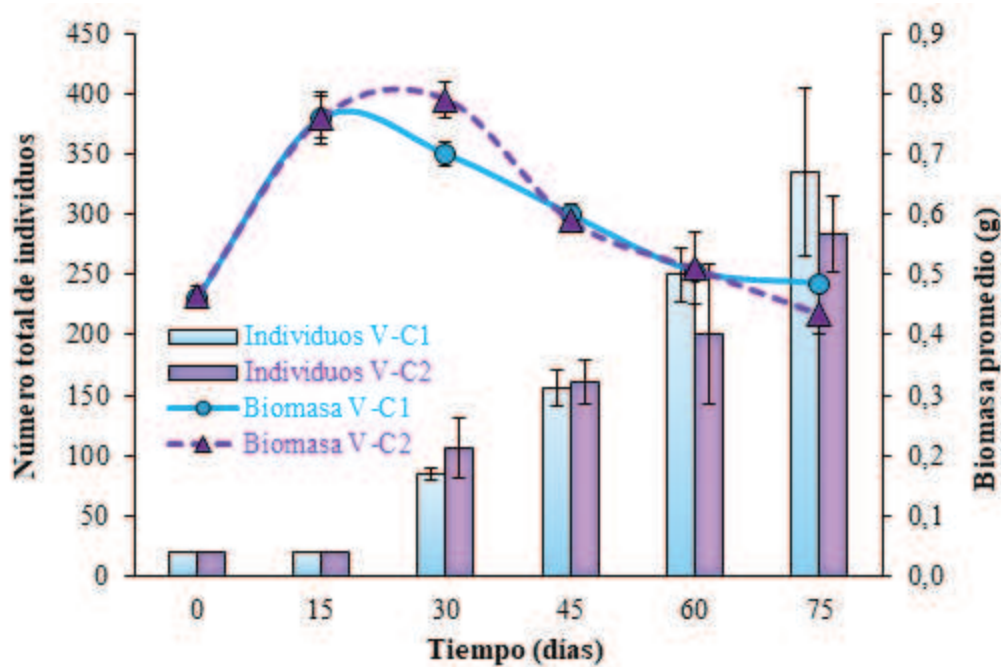


**Figura 9.** Variación de la hidrólisis de la FDA como medida indirecta de la actividad microbológica durante el período de estabilización (sombreado blanco, días 0-110/0) y vermicompostaje (sombreado anaranjado, días 110/0-75). V-C1 se representa en ● color celeste y V-C2 en ▲ violetas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### 1.5.3. Monitoreo biológico de las lombrices

A lo largo de los primeros 30 días de vermicompostaje (Fig. 10) se registró un aumento significativo de la biomasa promedio de *E. fetida* de  $52 \pm 7\%$  ( $p_{V-C1} = 0,005$ ) y  $71 \pm 9\%$  ( $p_{V-C2} = 0,003$ ) respecto del inicial; sin embargo, luego se observó una disminución progresiva de la misma hasta finalizar a los 75 días con un valor estadísticamente similar al de partida ( $p_{V-C1} = 0,926$ ;  $P_{V-C2} = 0,094$ ), debido a la alta tasa de reproducción, con surgimiento de nuevos individuos y la disminución de la cantidad de alimento disponible. Este fenómeno también ha sido observado por (Zhao et al., 2018) y (Sadia et al., 2020). En el presente estudio, la reproducción fue masiva; los 20 adultos iniciales dieron lugar, en tan solo los primeros 30 días, a  $65 \pm 5$  juveniles en V-C1 y  $86 \pm 25$  en V-C2, incrementándose hasta  $335 \pm 70$  en V-C1 y  $284 \pm 31$  en V-C2 al finalizar la etapa de vermicompostaje. Esto indica que los mecanismos fisiológicos de las lombrices estaban enfocados en la reproducción y que ambos sustratos eran benéficos para ellas. Se ha observado un patrón relacionado de pérdida de biomasa, cuando las lombrices alcanzan la madurez sexual, ya que utilizan la energía para fines reproductivos como la cópula, la formación de capullos y la puesta de huevos (Sadia et al., 2020). Durante el período de vermicompostaje no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de biomasa y número de individuos entre ambos sustratos.

El buen desempeño obtenido en la biomasa y la producción de juveniles se acompañó con una transformación en la apariencia del sustrato, lográndose productos más homogéneos y de una granulometría menor.



**Figura 10.** Variación del número de individuos de *E. fetida* y su biomasa promedio a lo largo del vermicompostaje. En barras se presenta la contabilización de los individuos y en líneas la variación de la biomasa (V-C1 ●; V-C2 ▲). Los valores se encuentran presentados como los promedios de las mediciones y las barras de error indican la desviación estándar.

#### 1.5.4. Caracterización de las biomezclas

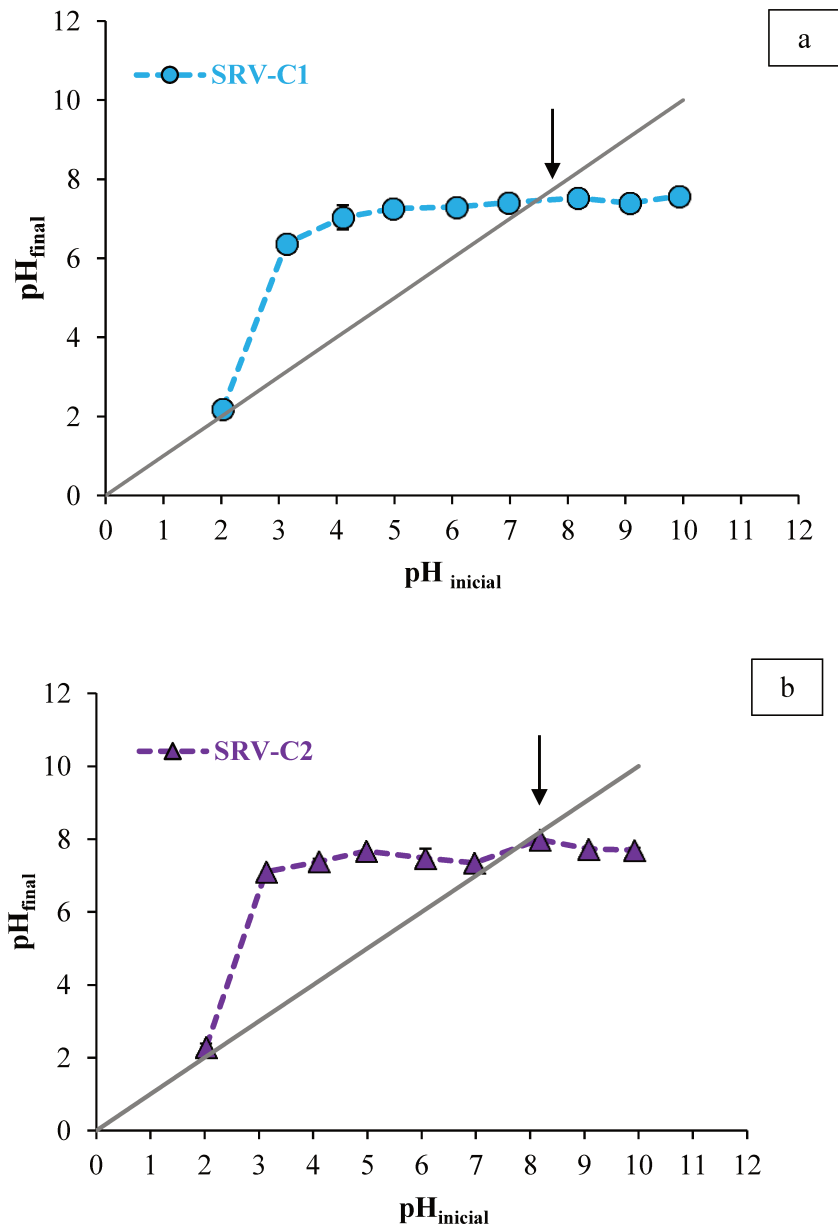
En la Tabla 6 se muestran las características más relevantes de cada una de las tres biomezclas. Asimismo, se agregó comparativamente el suelo S, dado que estos cuatro sustratos se aplicarán a los ensayos de degradación que son presentados en el siguiente Capítulo 2. Las biomezclas que contenían vermicompost, presentaron características similares. La CE ( $p=0,134$ ) y la MO ( $p=0,403$ ) resultaron estadísticamente equivalentes para las biomezclas con vermicompost. La adición de lodos activados no cambió significativamente sus principales características fisicoquímicas. El pH de S fue significativamente menor que el de ambas biomezclas con vermicompost ( $p < 0,001$ ), y que el de SR ( $p=0,025$ ). A la vez, la biomezcla SR de referencia también mostró un pH menor que las biomezclas con vermicompost ( $p_{SRV-C1}=0,022$ ;  $p_{SRV-C2}=0,021$ ). En términos generales, el menor pH se observó en S y los pH más alcalinos en las biomezclas con vermicompost, que también fueron las que

mostraron mayores CE respecto a SR ( $p_{SRV-C1}= 0,012$ ;  $p_{SRV-C2}= 0,020$ ) y al S ( $p_{SRV-C1}= 0,021$ ;  $p_{SRV-C2}= 0,006$ ). También en las biomezclas con vermicompost se observaron valores de MO más elevados que en S y SR. El contenido de la MO fue aportado principalmente por el agregado de vermicompost a la biomezcla clásica, y en menor medida del rastrojo, seguido por el suelo, tal como se puede observar en la Tabla 6. Todas estas diferencias de contenido de MO mostraron valores estadísticos de  $p < 0,05$ .

Los  $pH_{cc}$  de SRV-C1 ( $7,5 \pm 0,1$ ) y SRV-C2 ( $7,7 \pm 0,1$ ) fueron ligeramente alcalinos ( $p= 0,117$ ) (Fig. 11); en consecuencia, los sólidos tendrán una carga negativa superficial neta cuando el pH de la solución es superior a estos valores o una carga positiva cuando el pH es inferior. Este parámetro será de utilidad para las discusiones en el próximo Capítulo 3 a la hora de estudiar la adsorción de los plaguicidas en las biomezclas.

**Tabla 6.** Valores de los parámetros fisicoquímicos en las biomezclas y en suelo

<b>Parámetro</b>	<b>SRV-C1</b>	<b>SRV-C2</b>	<b>SR</b>	<b>S</b>
<b>pH</b>	$8,8 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,1$
<b>CE (<math>\mu S\ cm^{-1}</math>)</b>	$487 \pm 56$	$398 \pm 28$	$270 \pm 40$	$245 \pm 26$
<b>MO (%)</b>	$25 \pm 4$	$21,2 \pm 0,3$	$10,4 \pm 0,9$	$5,5 \pm 0,1$
<b>Cenizas (%)</b>	$75 \pm 4$	$78,8 \pm 0,3$	$89,6 \pm 0,9$	$94,5 \pm 0,1$



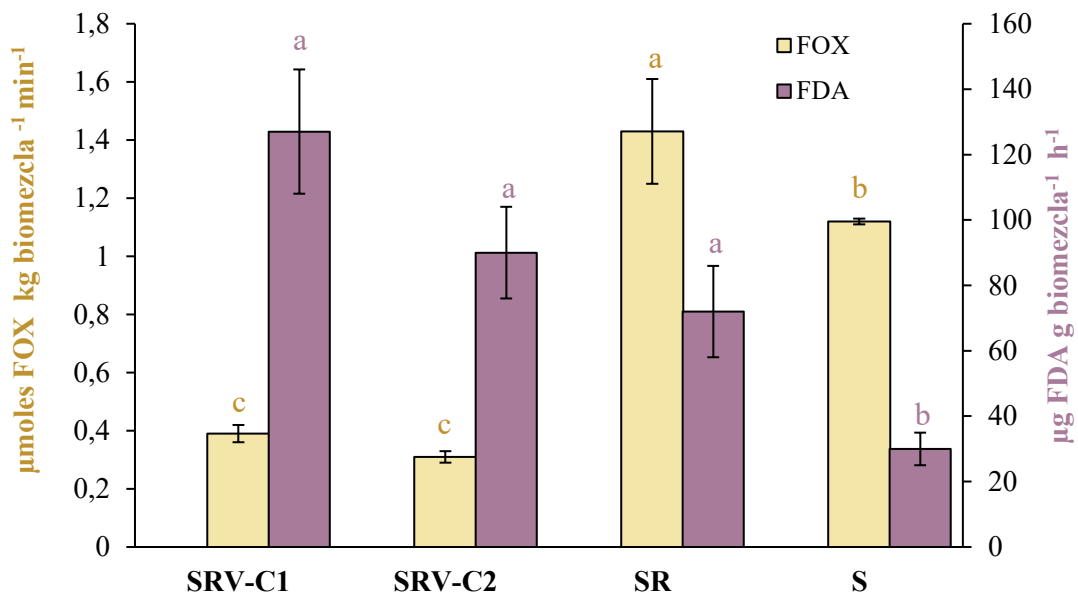
**Figura 11.** pH final en función del pH inicial de las biomezclas SRV-C1 ●; y SRV-C2 ▲, para la determinación del  $pH_{cc}$ .

La Figura 12, muestra la actividad de diferentes grupos de enzimas excretadas por los microorganismos para cada sustrato. Como se puede observar, la actividad FDA fue mucho más elevada en las mezclas que contaban con vermicompost en su composición, seguido por la biomezcla que contenía suelo y rastrojo, siendo S el que menor actividad total de la hidrólisis de la FDA registró.

El suelo mostró una baja actividad microbiológica total, expresada por la actividad de la FDA, significativamente menor que el resto de las biomezclas. También se observó que SR tuvo una actividad de la FDA menor a SRV-C1, pero no se diferenció estadísticamente de SRV-C2. Asimismo,

entre las biomezclas con vermicompost no se hallaron diferencias estadísticas en este parámetro. Jyoti et al. (2025) obtuvo valores de FDA en biomezcla con rastrojo de arroz, vermicompost y suelo, mucho más bajos ( $40\text{-}45 \text{ g biomezcla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) que los aquí reportados, muy similares a los obtenidos para S. Los resultados además son concordantes con Karanasios et al. (2010), en donde las biomezclas tuvieron valores de actividad microbiológica expresada como FDA significativamente más altas que las registradas para el suelo, lo cual también coincide con lo informado por Gao et al. (2015).

En lo que respecta a FOX, las biomezclas SRV mostraron bajos valores de actividad FOX frente a SR y frente a S. Los valores de la actividad de FOX en S fueron significativamente más bajos que los de SR. Algunos autores reportan que el pH ácido promueve el desarrollo fúngico (Gao et al., 2015), y precisamente ambas biomezclas con vermicompost presentaron valores de pH alcalino, lo que podría haber inhibido los hongos degradadores de lignina y, en consecuencia, la presencia de las enzimas peroxidadas durante todo el proceso podría haber disminuido. Otros autores también han afirmado que, aunque la presencia de hongos es intrínseca a las biomezclas, otros microorganismos podrían ser más cruciales para la degradación de los plaguicidas (Saez et al., 2022b). Los datos estadísticos para ambas enzimas se encuentran detallados en el Anexo IV.



**Figura 12.** Actividad fenoloxidasas (FOX) en el eje izq. con barras color violeta e hidrólisis de la fluoresceína (FDA) en el eje der. con barras color amarillo, para cada sustrato (tres biomezclas y suelo) antes de ser fumigados. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## 1.6. Conclusión

Como conclusión parcial de este primer Capítulo, se destaca que, en primer lugar, se lograron estabilizar diversos residuos agropecuarios y urbanos. En ambas mezclas el contenido de nitrógeno amoniacal disminuyó un 99 %, la CE se redujo un 80 % y el pH se mantuvo alcalino, acorde a los estándares para sustratos estabilizados. Luego, se finalizó el proceso mediante vermicompostaje, empleando lombrices *E. fetida* como herramienta biotecnológica. Éstas mostraron un muy buen desempeño en las mezclas estabilizadas, principalmente porque favorecieron su reproducción. La gran actividad de las lombrices hizo que homogeneizaran los sustratos, a la vez que mejoraron sus propiedades fisicoquímicas, y mantuvieron activos los consorcios microbianos presentes por dos meses más, luego de ser incorporadas. Las características fisicoquímicas y biológicas de los vermicompost obtenidos fueron similares, y se hallaron libres de patógenos y con olor típico de humus. En segundo lugar, estos sustratos generados fueron incorporados con éxito como parte de las biomezclas nuevas, ya que los resultados revelaron que el contenido de MO ( $\geq 20\%$ ) y la actividad microbiológica eran mejores respecto a la biomezcla de referencia y al suelo. Estas biomezclas son novedosas en el sentido de que reemplazan la turba como material orgánico, siguiendo la lógica de la economía circular y el uso de recursos renovables. Asimismo, en los próximos Capítulos se continuarán analizando las propiedades fisicoquímicas y biológicas de cada biomezcla en vínculo con la degradación y adsorción a los plaguicidas que fueron escogidos para esta Tesis.

## 2. Estudios de degradación de los plaguicidas en las biomezclas

### 2.1. Introducción

En este segundo Capítulo se estudió la degradación de los plaguicidas seleccionados, en los Sistemas de Biopurificación, empleando las biomezclas diseñadas en el Capítulo 1. Cada biomezcla constituyó un sustrato distinto. Las formulaciones estuvieron compuestas por suelo, rastrojo de trigo y vermicompost 1 (sin lodos cloacales) -SRV-C1-; suelo, rastrojo de trigo y vermicompost 2 (con lodos cloacales)- SRV-C2- y la biomezcla de referencia, constituida por suelo y rastrojo de trigo -SR-. La incorporación de vermicompost en las biomezclas tuvo como finalidad aportar materia orgánica y capacidad biológica de degradación, reemplazando la turba (recurso no renovable) empleada originalmente con ese propósito (Sánchez-Hernández et al., 2019). Asimismo, se incluyó un sustrato constituido únicamente por suelo -S-.

Los insecticidas y herbicidas (cipermetrina -CIP-, dimetoato -DIM-, imidacloprid -IMI-, 2,4-D y acetoclor -ACE) fueron elegidos en función de su uso frecuente tanto en la región como a nivel mundial (Aparicio et al., 2015; Casadinho, 2018). Estos compuestos presentan estructuras químicas diversas y, por lo tanto, propiedades diferentes que determinan su comportamiento y degradación en los Sistemas de Biopurificación.

La CIP es un éster carboxílico, es la mezcla de dos isómeros cis y trans, en una proporción 1:1. Se clasifica como un insecticida piretroide sintético, con baja presión de vapor, por lo que no tiende a volatilizarse en solución acuosa y posee una persistencia relativamente baja en el suelo. Además, al ser no polar es muy poco soluble en agua. La degradación microbiana constituye la principal vía de transformación de la CIP, aunque su persistencia aumenta en suelos con elevado contenido de materia orgánica o arcillas, baja actividad biológica y condiciones anaeróbica (Jones, 1995). El DIM es otro insecticida, organofosforado, y el único de los cinco que no contiene anillos aromáticos en su estructura. Posee alta solubilidad en agua y baja afinidad por las partículas del suelo. Es susceptible a la hidrólisis en condiciones ácidas, moderadamente estable frente a la degradación microbiana y poco volátil debido a su baja presión de vapor. Se ha observado que los microorganismos presentes en lodos cloacales o aguas residuales pueden emplear plaguicidas como el DIM como fuente de carbono (Van Scoy et al., 2016). El tercer y último insecticida empleado en la mezcla es el IMI, un insecticida sistémico neonicotinoide, poco volátil por su baja presión de vapor. Su elevada solubilidad en agua y bajo coeficiente de adsorción al carbono orgánico (Koc) indican una escasa tendencia a unirse a las partículas del suelo. Su persistencia depende de múltiples factores, y solo un número limitado de microorganismos tiene capacidad de mineralizarlo (Castillo Diaz et al., 2017; Fossen, 2006). Por otro lado, el ACE es un herbicida que pertenece a la familia de las cloroacetamidas. Es un

herbicida no volátil y con alta movilidad en el suelo, lo que le permite alcanzar cuerpos de agua superficiales y subterráneos, donde suele encontrarse principalmente en forma disuelta. En el suelo, su degradación ocurre principalmente por acción microbiana, ya que su adsorción es débil y se produce principalmente sobre la materia orgánica (Lengyel & Földényi, 2003; Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Argentina, 2021). Finalmente, el 2,4-D pertenece al grupo de los compuestos fenoxi. Es un herbicida susceptible a la degradación microbiana, aunque altamente propenso a la lixiviación debido a su baja masa molecular, limitada volatilización y alta solubilidad. Es el único de los plaguicidas estudiados capaz de disociarse, con un pKa de 3,40 a 25°C (Boivin et al., 2005; Peterson et al., 2016).

La degradación de estos compuestos en las biomezclas y en el suelo depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas mencionadas. Para determinar los patrones de degradación en cada caso, se obtuvieron datos experimentales que permitieron modelizar las cinéticas de degradación, complementadas con determinaciones biológicas -como el índice de germinación y la exposición aguda de lombrices-, a fin de evaluar el grado de descontaminación alcanzado en cada sustrato.

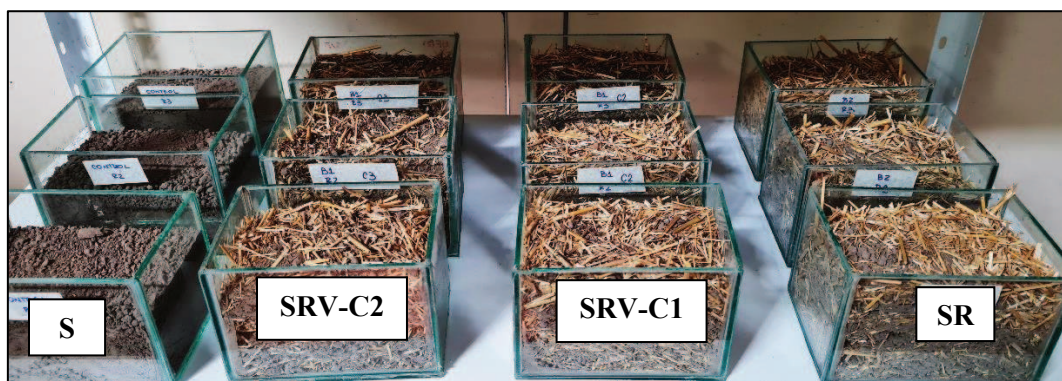
## **2.2. Objetivos**

El objetivo de este segundo Capítulo fue estudiar el proceso de degradación de los plaguicidas seleccionados en las biomezclas diseñadas con vermicompost. Además, modelar las cinéticas de degradación y monitorear las respuestas biológicas, a fin de comparar la eficiencia de dichas biomezclas respecto a la biomezcla de referencia y al suelo agrícola solo.

## **2.3. Materiales y métodos**

### **2.3.1. Diseño experimental**

Para poder evaluar la biorremediación general de cada sustrato y la disipación en particular de cada uno de los plaguicidas seleccionados a lo largo del tiempo, primeramente, se dispusieron las tres biomezclas y el suelo, ya madurados, en cajas de vidrio de 20×10×12 cm, por triplicado (Fig. 13). El ensayo de degradación se llevó a cabo durante 119 días. Se mantuvo un contenido de humedad del 70% y una temperatura ambiente de  $24 \pm 2$  °C durante todo el ensayo.



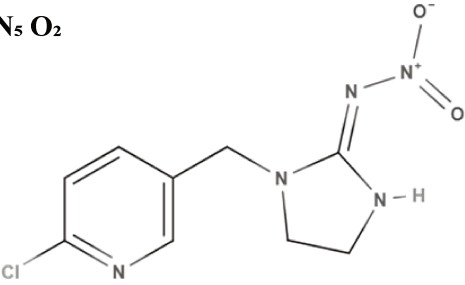
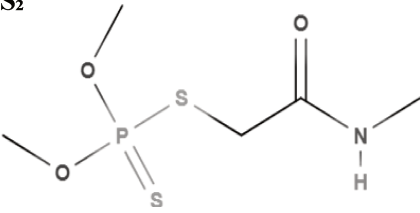
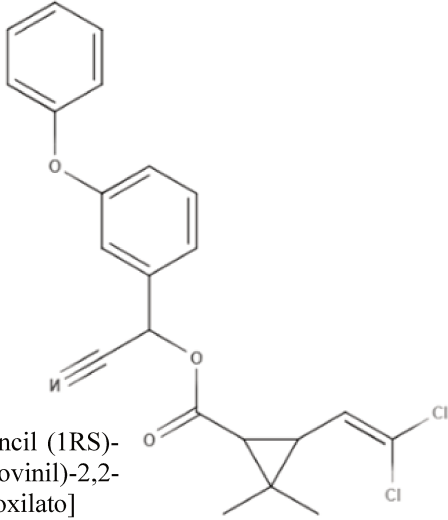
**Figura 13.** Sustratos del ensayo de degradación. De der. a izq. se presenta SR (biomezcla de referencia, suelo y rastrojo), SRV-C1 (suelo, rastrojo y vermicompost 1, sin lodos), SRV-C2 (suelo, rastrojo y vermicompost 2, con lodos) y S (suelo). Cada caja es considerada una unidad experimental.

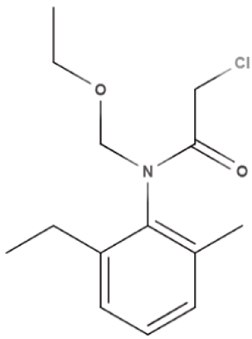
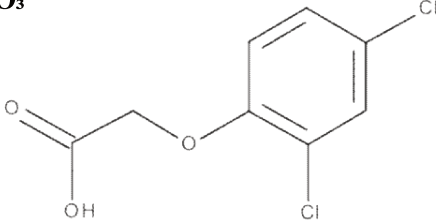
### 2.3.2. Preparación de soluciones con plaguicidas y fumigación

Cada uno de los sustratos fue rociado con una solución acuosa contaminada, que contenía en su preparación la mezcla total de los plaguicidas previamente seleccionados: imidacloprid (IMI), dimetoato (DIM), cipermetrina (CIP), acetoclor (ACE) y 2,4-D. La concentración total en cada unidad experimental fue de  $390 \text{ mg kg}^{-1}$ . La fórmula molecular, la estructura y el nombre químico de cada uno de ellos son presentados en la Tabla 7. La humedad de cada unidad experimental del 70% se alcanzó en principio con la propia de la solución de fumigación y luego se mantuvo el resto de los días de ensayo con agua corriente.

Las concentraciones iniciales, seleccionadas sobre la base de la bibliografía y las prácticas agrícolas (Aparicio et al., 2015; Casadinho, 2018; Maggi et al., 2023b; Sharma & Garg, 2018), fueron de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  para 2,4-D, CIP y DIM,  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  para IMI y  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  para ACE. Para preparar la solución acuosa se emplearon las formulaciones comerciales de cada uno de ellos: 2,4-D (30 % p/v DEDALO elite); CIP (Microactive 25 % p/v); IMI (Record 30 % p/v) y ACE (Acetoclor 90 % p/v), facilitados por Surcos S.A. El DIM fue adquirido en una tienda local (GlacoXAN D-Sist 7,5 %).

**Tabla 7.** Nombre, fórmula molecular y estructura química de las moléculas de los plaguicidas elegidos.

Plaguicida	Estructura química
<p><b>Imidacloprid</b></p>	<p><b>C<sub>9</sub> H<sub>10</sub> Cl N<sub>5</sub> O<sub>2</sub></b></p>  <p>[1-[(6-cloropiridina-3-il) metil]-N-nitro-4, 5-dihidroimidazol-2-amina]</p>
<p><b>Dimetoato</b></p>	<p><b>C<sub>5</sub> H<sub>12</sub> NO<sub>3</sub> PS<sub>2</sub></b></p>  <p>[O, O-Dimetil-S-[2-(metilamino)-2-oxoetil]fosforoditioato]</p>
<p><b>Cipermetrina</b></p>	<p><b>C<sub>22</sub> H<sub>19</sub> Cl<sub>2</sub> NO<sub>3</sub></b></p>  <p>[(+)-α-ciano-3- fenoxibencil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato]</p>

<p><b>Acetoclor</b></p>	<p><b>C<sub>14</sub> H<sub>20</sub> Cl NO<sub>2</sub></b></p>  <p>2-cloro-N-(etoximetil)-N-(2-etil-6-metilfenil) acetamida</p>
<p><b>2,4-D</b></p>	<p><b>C<sub>8</sub> H<sub>6</sub> Cl<sub>2</sub> O<sub>3</sub></b></p>  <p>Ácido 2,4-diclorofenoxiacético</p>

### 2.3.3. Cuantificación de los plaguicidas

Para poder realizar la cuantificación de los plaguicidas sobre las matrices sólidas, se tomaron muestras a partir de un pool conformado por cinco puntos de diferentes zonas de cada sustrato (unidad experimental). El muestreo se realizó en los días 0, 7, 14, 28, 56, 84 y 119.

La cuantificación de los plaguicidas en los sustratos fue realizada por investigadoras del PRINARC-FIQ-UNL. Para ello, el herbicida 2,4-D se extrajo dos veces con diclorometano, mientras que ACE, CIP, DIM e IMI se extrajeron con acetonitrilo, y los extractos se limpiaron mediante extracción dispersiva en fase sólida siguiendo el método de preparación de muestras basado en QuEChERS (Anastassiades & Lehotay, 2003). Los plaguicidas se cuantificaron en un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución con una fuente de ionización por electro-spray (en modo positivo y negativo) y acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (UHPLC-ESI-MS/MS, Waters Acquity UPLC® y Waters TQD) y en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con ionización por impacto electrónico (GC-EI-MS/MS, Agilent 7890B y 7000C triple cuadrupolo). En todos los casos, el laboratorio validó las metodologías completas según lo recomendado por el documento de orientación de la Comisión Europea sobre el control de calidad analítico y el procedimiento de validación de métodos para residuos de plaguicidas, SANTE/2021/11312 (SANTE, 2021). El LOQ se estableció en 0,1 mg kg<sup>-1</sup> para cada compuesto;

luego, los LOQ se verificaron experimentalmente analizando muestras en blanco enriquecidas para corroborar que los iones de diagnóstico cumplen con las condiciones de abundancia relativa y los criterios del método para la veracidad y precisión. Los métodos y condiciones analíticas empleadas se describen en más detalle en el Anexo I: “Cuantificación de plaguicidas en matrices sólidas”.

#### 2.3.4. Estudio de la cinética de degradación de los plaguicidas

Se aplicaron modelos cinéticos (FOCUS et al., 2006; Hernández-Soriano et al., 2009) a las curvas de degradación experimentales obtenidas, para describir la cinética de degradación de los plaguicidas en los distintos sustratos. La Ec. (2.1) representa el modelo de Primer Orden (SFO), mientras que la Ec. (2.2) corresponde al modelo bifásico Gustafson-Holden. Las ecuaciones de cada modelo se presentan a continuación:

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (2.1)$$

$$C_t = \frac{C_0}{\left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^\alpha} \quad (2.2)$$

Donde,  $C_t$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) es la concentración a tiempo  $t$  (días),  $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) es la concentración inicial y  $k$  ( $\text{día}^{-1}$ ) la constante de velocidad de reacción. En la Ec. (2.2),  $\alpha$  es el parámetro de forma determinado por el coeficiente de variación de  $k$  y  $\beta$  el parámetros de locación. forma y ubicación.

El modelo SFO aplicado posee dos parámetros y supone que la velocidad de cambio en la concentración de plaguicidas es directamente proporcional a la concentración restante en cualquier momento. Además, asume que el número de moléculas de plaguicidas es bajo en relación con el número de microorganismos degradadores y sus enzimas. Este modelo es independiente de la concentración inicial de los plaguicidas. En cambio, los modelos cinéticos bifásicos, como Gustafson-Holden, describen una disminución inicial rápida de las concentraciones de plaguicidas seguida de un descenso más lento; este modelo define sub-compartimentos en el sólido heterogéneo, cada uno con una velocidad de degradación de Primer Orden diferente (FOCUS et al., 2006).

Los modelos también permitieron obtener los tiempos de vida media ( $DT_{50}$ ) para cada plaguicida en cada sustrato (es decir, tiempo necesario para degradar la mitad de la concentración inicial del plaguicida). La Ec. (2.3) corresponde a la fórmula para el cálculo del  $DT_{50}$  para el modelo SFO y la Ec. (2.4) para el modelo de Gustafson-Holden.

$$DT_{50} = \ln 2 / k \quad (2.3)$$

$$DT_{50} = \beta \left( 2^{\left(\frac{1}{\alpha}\right)} - 1 \right) \quad (2.4)$$

### 2.3.5. Seguimiento de parámetros fisicoquímicos y respuestas biológicas

Para cada sustrato, se monitorearon, tanto al inicio (sin fumigar) como en los días 0, 14, 56 y 119, la actividad microbiana total (FDA) y la actividad fenoloxidasas (FOX), ya descritas en el Capítulo anterior en las Secciones 1.3.2 y 1.3.5.

Además, en esta Sección se realizaron ensayos de toxicidad para evaluar el grado de desintoxicación de las biomezclas y del suelo. Las lombrices de la especie *Eisenia fetida* y las semillas de lechuga *Lactuca sativa*, se utilizaron como especies modelo para ensayos agudos de exposición y obtención del índice de germinación (IG), respectivamente. Estos ensayos se realizaron debido a su alta sensibilidad frente a diversos contaminantes y su facilidad de experimentación. Las técnicas de estos ensayos se describen a continuación.

#### 2.3.5.1. Índice de germinación

Como se mencionó previamente, otra respuesta biológica evaluada fue el IG, que permitió conocer el estado de fitotoxicidad de cada uno de los sustratos. Consiste en un bioensayo que contempla tanto la germinación como la elongación radicular de semillas de la especie *Lactuca sativa* (lechuga), que es considerada un organismo bioindicador que evalúa la toxicidad de muchos contaminantes ambientales (Vieira et al., 2024) siguiendo el protocolo correspondiente (U.S. EPA, 1996). Para esta prueba se colocaron 15 g de muestra de biomezcla o suelo en una placa de Petri con humedad al 50% con agua corriente junto a 20 semillas de *L. sativa*. Luego, las placas se incubaron por 5 días en estufa con circulación forzada a  $22 \pm 2$  °C en la oscuridad. Al finalizar este período, se contabilizó el número de semillas germinadas y se midió la longitud de la radícula de éstas, empleando el software *IC Measure* 2.0.0. 286. De este modo, se obtuvo el IG (%), de acuerdo con la Ec. (2.5), que se describe a continuación:

$$IG (\%) = \left[ \left( \frac{G_s}{G_c} \right) \left( \frac{LR}{LRC} \right) \right] \times 100 \quad (2.5)$$

Donde,  $G_s$  y  $G_c$  corresponden al número de semillas germinadas en la muestra y en el control, respectivamente, y  $LR$  y  $LRC$ , la longitud media de las raíces también en la muestra y en el control.

Este índice se midió al finalizar el ensayo de degradación para estimar el grado de descontaminación de las biomezclas agotadas y de los sustratos evaluados, desde el aspecto fitotóxico.

### 2.3.5.2. Exposición aguda de lombrices

Se realizó un ensayo de exposición aguda de lombrices para complementar el ensayo de fitotoxicidad, contemplando que los residuos de plaguicidas también afectan la fauna si se hallasen presentes. Las lombrices *E. fetida* al finalizar el ensayo, se sometieron a una prueba de contacto, para evaluar la tolerancia al sustrato y su capacidad de supervivencia (OECD, 1984b) como medida indirecta también de descontaminación de cada sustrato. En este caso, se añadieron 12 individuos adultos por caja de vidrio que contenían 615 g de cada biomezcla o suelo, y se mantuvieron a temperatura ambiente, con una humedad del 60%. Se evaluó la supervivencia de los individuos después de 96 h de exposición. Se consideró como individuo muerto a aquel que no respondía a un toque suave mecánico en la sección delantera del individuo (Lammertyn et al., 2021).

## 2.4. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como valores promedio de tres mediciones a los que se les calcularon e informaron sus desviaciones estándar (SD). La diferencia significativa entre las medias de los grupos se analizó aplicando la prueba t-Student para muestras independientes o pareadas, con un nivel de significancia del 5%, utilizando el software Minitab, versión 19. Además, Para estimar todos los parámetros de los modelos se utilizó el análisis de regresión no lineal, con la minimización de la suma de las diferencias cuadráticas entre los valores experimentales y los estimados.

## 2.5. Resultados y discusión

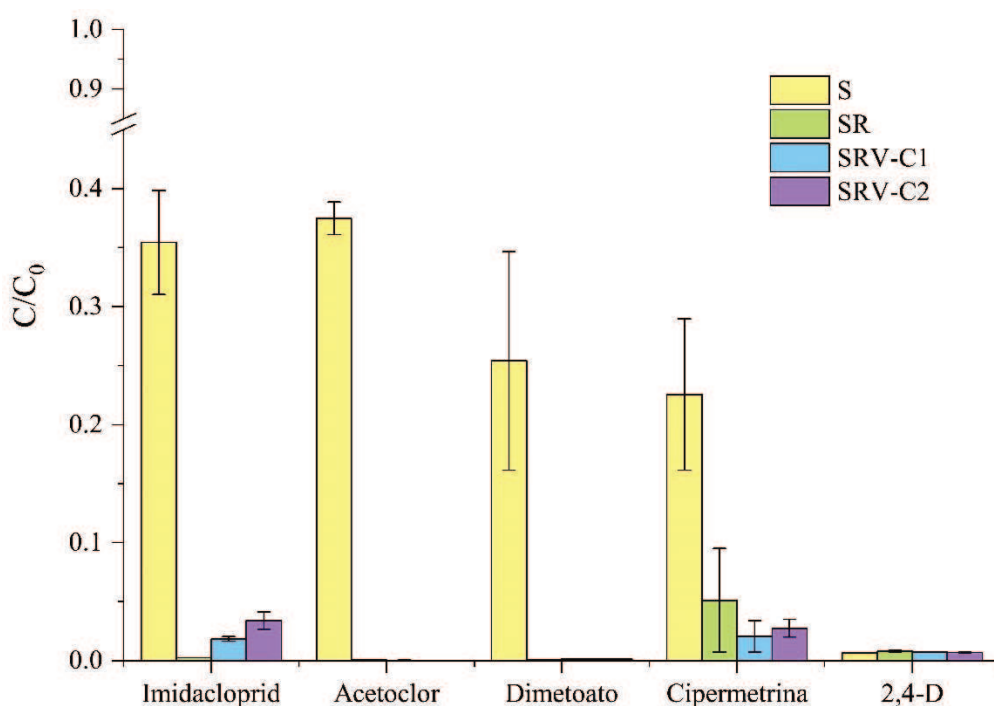
### 2.5.1. Disipación de los plaguicidas y modelado cinético

A partir de la cuantificación de los plaguicidas en las matrices sólidas, de acuerdo con la Sección 1.3.3, se calcularon las concentraciones relativas remanentes de cada plaguicida al finalizar los 119 días de ensayo. Se puede observar en la Fig. 14 que las tres biomezclas tuvieron más éxito en la eliminación de los plaguicidas que el S.

Las tres biomezclas degradaron más del 99% de la concentración inicial de ACE y DIM. En el caso de la CIP, la remoción fue del 94% en SR, mientras que en SRV-C1 y SRV-C2 fue de 98 y 97,3%, respectivamente. La biomezcla de referencia removió un 99,7% del IMI, mientras que en SRV-C1 y SRV-C2 la remoción fue del 98,5% y 96,6%, respectivamente. En el caso del 2,4-D este se disipó más del 99% en todos los sustratos. El S fue capaz de remover solo un 62,5% del ACE; 77,4% de la CIP; 74,6% del DIM y 64,7% de IMI, es decir, después de cuatro meses, el suelo seguía contaminado con cuatro de los cinco plaguicidas. La biomezcla SR mostró una capacidad de remoción

muy alta de la mayoría de los plaguicidas, no obstante, los porcentajes de remoción de la CIP fueron más elevados en las biomezclas con vermicompost.

Posiblemente, la incorporación de materiales lignocelulósicos u orgánicos al suelo agrícola (ya sea rastrojo o vermicompost) en la composición de las biomezclas incrementó la capacidad de degradar los plaguicidas. En comparación con S, la degradación de ACE mejoró 57%, la de la CIP 25%, la del DIM 32% y la de IMI un 52%. Además, entre los plaguicidas seleccionados, la CIP es el más apolar, mientras que el 2,4-D presenta la mayor polaridad (orden de polaridad creciente: CIP < ACE < DIM < IMI < 2,4-D), lo cual pudo haber influido también en la eficiencia de su degradación.



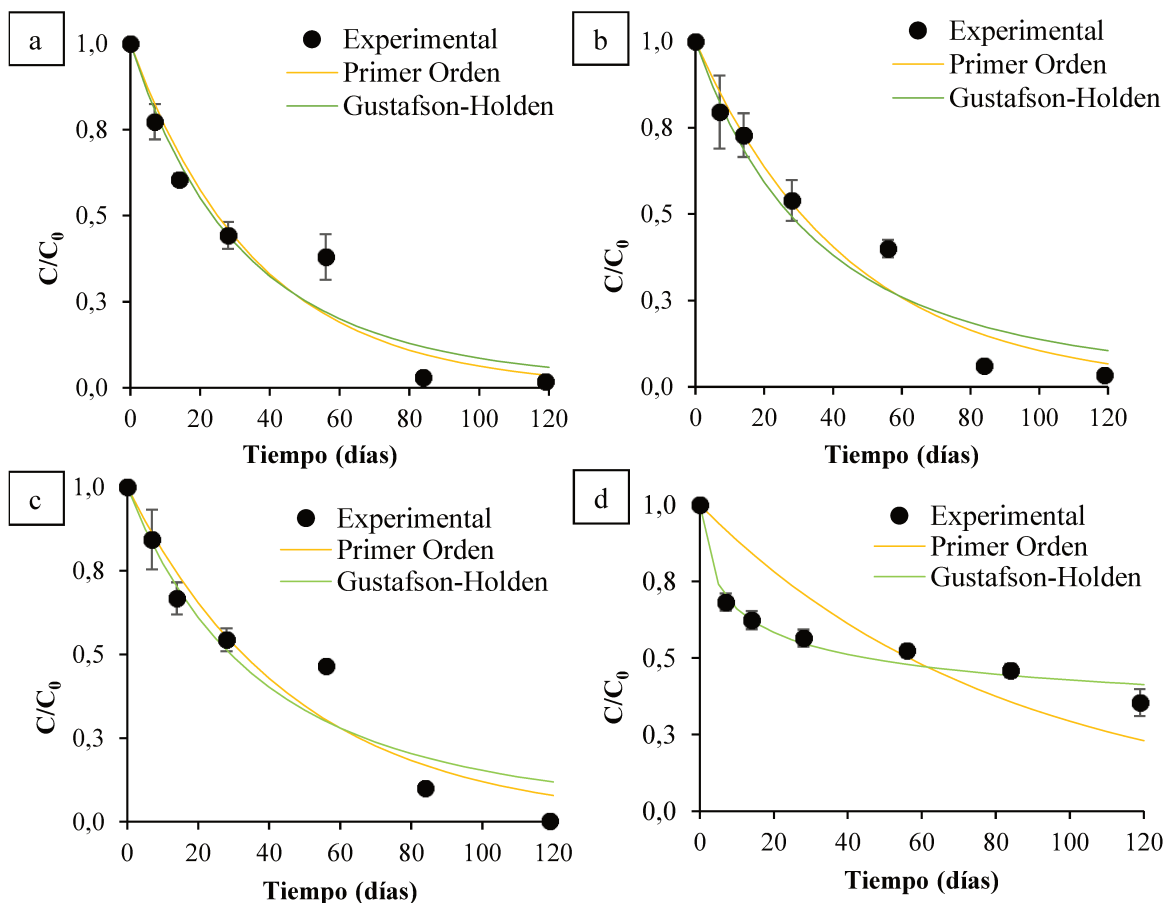
**Figura 14.** Comparación de concentraciones relativas remanentes de cada plaguicida en suelo (S), en la biomezcla de suelo y rastrojo (SR) y en ambas biomezclas con vermicompost (SRV-C1 y SRV-C2) al finalizar el ensayo de degradación.

Como se mencionó, los modelos aplicados describieron las curvas experimentales de la cinética de degradación de cada plaguicida, obtenidos a lo largo del ensayo. Los resultados pueden observarse graficados en las Figuras 15 a 19 dispuestas a continuación en este Capítulo. Asimismo, en la Tabla 8 se presentan los valores de los parámetros obtenidos de los modelos cinéticos de SFO y Gustafson- Holden (bifásico), así como las vidas medias de disipación para cada plaguicida en cada sustrato. Los

valores de los parámetros de los modelos aplicados permitieron conocer la velocidad de degradación de cada uno de los plaguicidas en los sustratos.

Se realizó una comparación de la eficiencia de las biomezclas obtenidas en esta Tesis con otras empleadas para tratar estos plaguicidas. En cuanto a la eliminación del IMI (Fig. 15), en todas las biomezclas evaluadas se obtuvo para este plaguicida un  $DT_{50}$  entre 24 y 33 días, dependiendo del modelo aplicado. Delgado-Moreno et al. (2017) hallaron que una biomezcla constituida por suelo, vermicompost de orujo húmedo de aceituna y restos de poda de olivo mostró mejores capacidades de disipación del IMI (80%) respecto a una biomezcla tradicional (suelo, turba y rastrojo). La  $k$  informada para el modelo de SFO en dicho trabajo fue de  $0,0086 \text{ d}^{-1}$  (un orden de magnitud más bajo que el obtenido en este estudio), y acorde al modelo de Gustafson-Holden, un tiempo de vida media similar al aquí obtenido (27 días), con una  $k$  de  $0,0037 \text{ d}^{-1}$ . Estos autores, además, encontraron un metabolito no tóxico, imidacloprid-urea, que fue metabolizado posteriormente por los microorganismos de su biomezcla. Asimismo, en otro de sus trabajos Delgado-Moreno et al. (2017b), compararon las mismas biomezclas, en la que contenía vermicompost, pero además agregando estiércol, y obtuvieron con el modelo SFO una constante de velocidad de degradación de  $0,0044 \text{ d}^{-1}$  para la tradicional y el doble para la que contenía vermicompost. Los tiempos de vida media para IMI que calcularon estos autores a partir de este modelo fueron muy diferentes a los presentados en este trabajo, siendo 84 días en la biomezcla con vermicompost y 224 días para la tradicional. Mientras que el máximo para IMI aquí informado para, por ejemplo, la biomezcla SRV-C2 que contenía lodos, fue de 31 días aplicando el modelo SFO y 27 días con el bifásico.

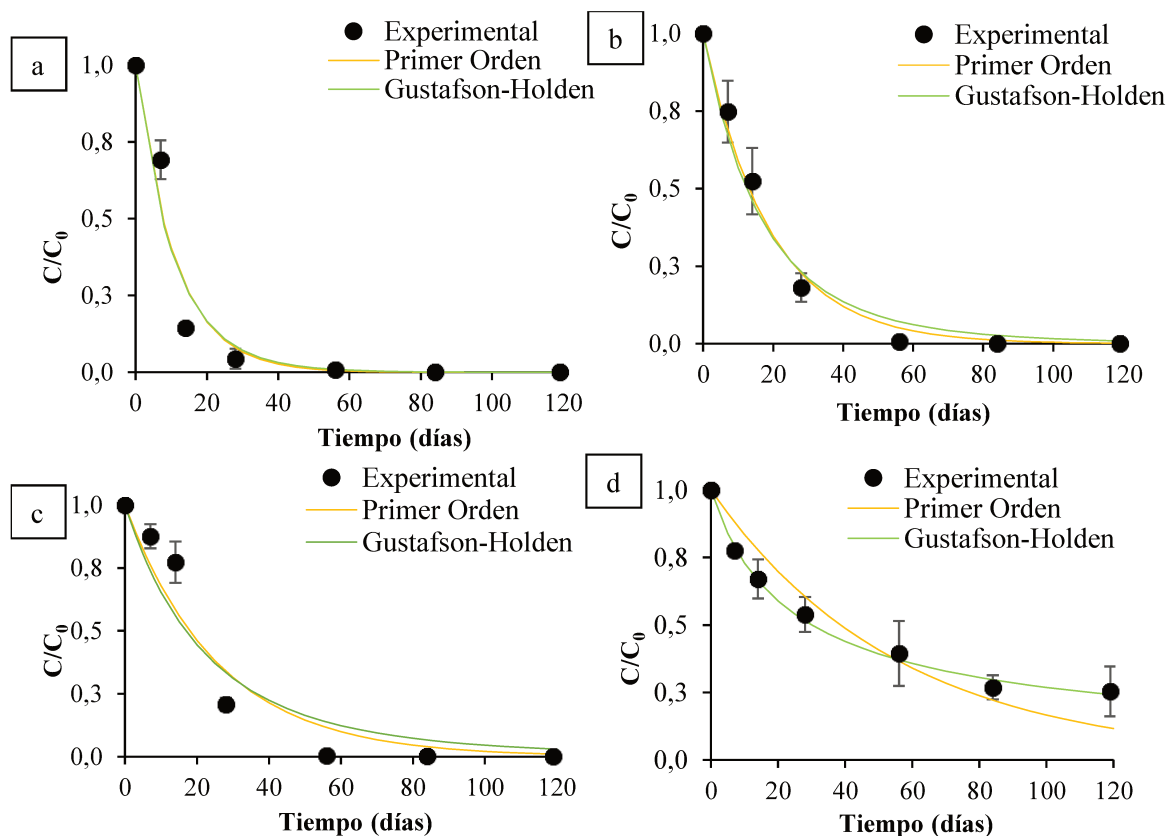
Por otro lado, Oviedo-Matamoros et al. (2024), empleando una biomezcla comercial de compost-suelo-fibra de coco, observaron a los 30 días una remoción de solo el 33% del IMI inicial ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de una mezcla de plaguicidas. Kumari et al., (2023) informaron la aplicación conjunta de IMI con azoxistrobina a una biomezcla a base de compost comercial y mostró una eliminación completa en 45 días, pero se habían empleado concentraciones iniciales más bajas ( $\sim 10 \text{ mg kg}^{-1}$  para cada plaguicida). En otra investigación previa, estos autores informaron una vida media similar a la de este trabajo (22-35 días) en una mezcla también con azoxistrobina en biomezclas compuestas de paja de arroz/mazorca de maíz y turba a base de compost a dosis de 20-100  $\text{mg kg}^{-1}$  (Kumari, Mandal, et al., 2019). Delgado-Moreno et al., (2017b) y Lescano et al. (2022) en cambio, informaron valores de  $DT_{50}$  más altos de los aquí obtenidos, de 84 y 83 días, respectivamente. Estos valores más altos se obtuvieron con biomezclas basadas en vermicompost con poda y orujo de oliva, y con rastrojo de moha y suelo, para eliminar IMI ( $\sim 100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en una mezcla con diurón, tebuconazol y oxifluorfen (Delgado-Moreno et al., 2017b); y IMI ( $9 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en una mezcla con glifosato, atrazina, prometrina y carbendazim (Lescano et al., 2022). Las constantes cinéticas estimadas fueron un orden de magnitud menor ( $k=0,0083 \text{ d}^{-1}$  y  $k=0,005 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente) que las obtenidas en este trabajo ( $k = 0,021 \text{ d}^{-1}$ ).



**Figura 15.** Cinética de degradación modelada para IMI en cada uno de los sustratos a) Biomezcla SRV-C1; b) Biomezcla SRV-C2; c) Biomezcla SR y d) Suelo solo. Los modelos se indican en líneas amarillas (Primer Orden) y verdes (Gustafson-Holden), mientras que los datos experimentales ● y sus respectivas barras de error se indican en color negro.

La eliminación del DIM se muestra en la Fig. 16. La constante de velocidad de degradación fue mayor para SRV-C1 con un 85% de degradación después de solo 14 días y una remoción completa para el día 56. En SR y SRV-C2, la remoción también se completó al día 56; sin embargo, las constantes de velocidad fueron inferiores al de SRV-C1. En S, se observaron valores de la constante  $k$  más bajos que en el resto de las biomezclas y un porcentaje de degradación mucho menor para este plaguicida, alcanzando un total del 75% al final del ensayo, con un  $DT_{50}$  de 30 días. Masís-Mora et al. (2019a), en comparación a los valores aquí presentados, obtuvieron una vida media muy alta (173 días) para el DIM, a partir de una mezcla de varios plaguicidas en bajas concentraciones iniciales ( $4-8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en una biomezcla a base de compost, mientras que Karanasios et al. (2010a) estudiaron biomezclas con suelo y compost de sustrato de hongos para eliminar el DIM con otros seis plaguicidas, y reportaron valores de vida media entre 5 y 15 días. En este estudio, se pueden calcular una vida media para DIM de 8 días a partir del comportamiento de la biomezcla con mejor

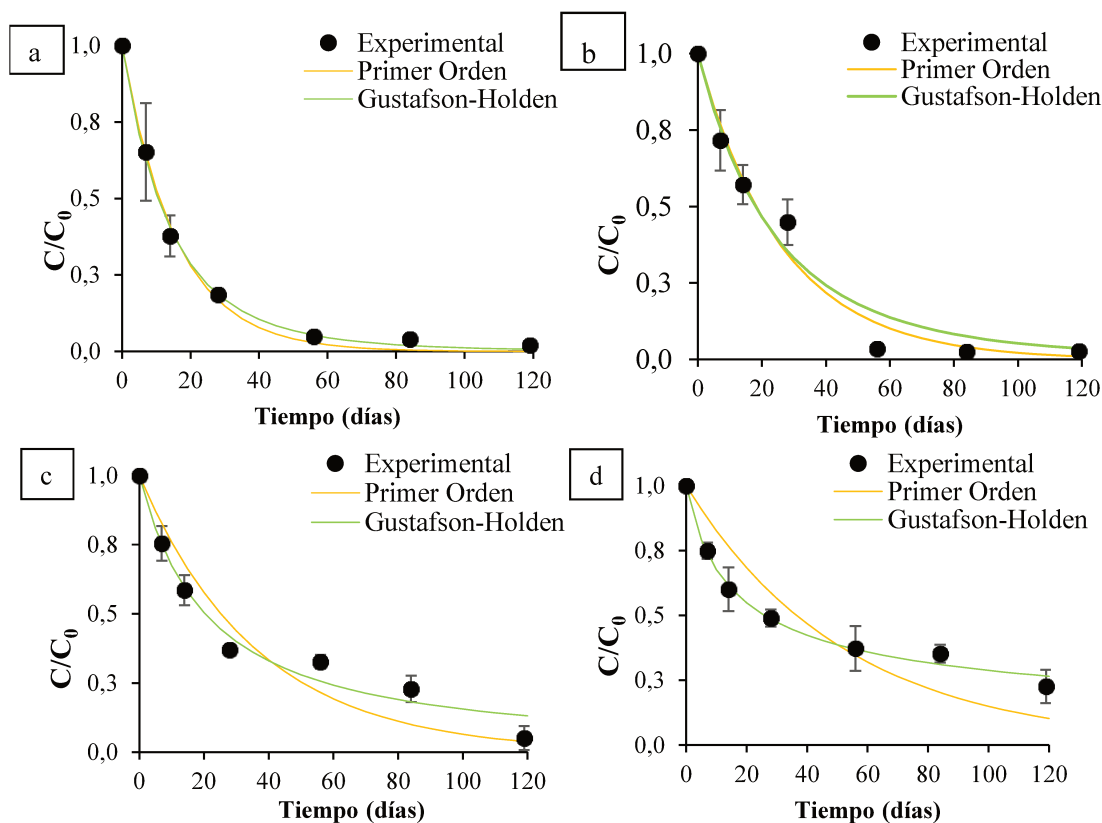
rendimiento (SRV-C1). Delgado-Moreno et al. (2017) también reportaron una alta eficiencia de disipación para este plaguicida utilizando cuatro biomezclas que contenían residuos orgánicos de olivo con suelo, pero debido a la rápida disipación no fue posible construir las curvas; y sugieren que las moléculas polares no aromáticas de este insecticida pueden mantenerlo en solución y más accesible al ataque de microorganismos. Karanasios et al. (2010b) encontraron que la disipación de DIM utilizando biomezclas que contienen compost se describía mejor mediante el modelo cinético de SFO, pero ambos modelos cinéticos de disipación (SFO y Gustafson-Holden) estimaron la misma vida media de 5,8 días. Por el contrario, Masis-Mora et al., (2019b) obtuvieron un valor de  $k$  de 0,004 día<sup>-1</sup> ( $DT_{50}$  = 173 días) para DIM con una biomezcla a base de compost, es decir de 13 a 23 veces menor que los obtenidos con SRV-C1 y SRV-C2 aplicando también el modelo de SFO.



**Figura 16.** Cinética de degradación modelada para DIM en cada uno de los sustratos a) Biomezcla SRV-C1; b) Biomezcla SRV-C2; c) Biomezcla SR y d) Suelo solo. Los modelos se indican en líneas amarillas (Primer Orden) y verdes (Gustafson-Holden), mientras que los datos experimentales ● y sus respectivas barras de error se indican en color negro

Para la CIP, se obtuvo un resultado de eliminación notable para las dos biomezclas con vermicompost. Como se puede ver en la Fig. 17, el porcentaje de degradación más alto se obtuvo con la biomezcla SRV-C1, que alcanzó un 95% después de 56 días de ensayo. En el caso de la biomezcla de referencia (SR), se logró un porcentaje de eliminación de solo el 67% en el mismo tiempo. Al final del ensayo, la remoción fue mayor al 95% para las biomezclas, mientras que solo se logró una remoción del 77% en el suelo. La CIP tuvo una de las mayores persistencias entre los plaguicidas probados, ya que al finalizar permaneció presente en los cuatro sustratos, aunque en bajas cantidades dentro de las biomezclas.

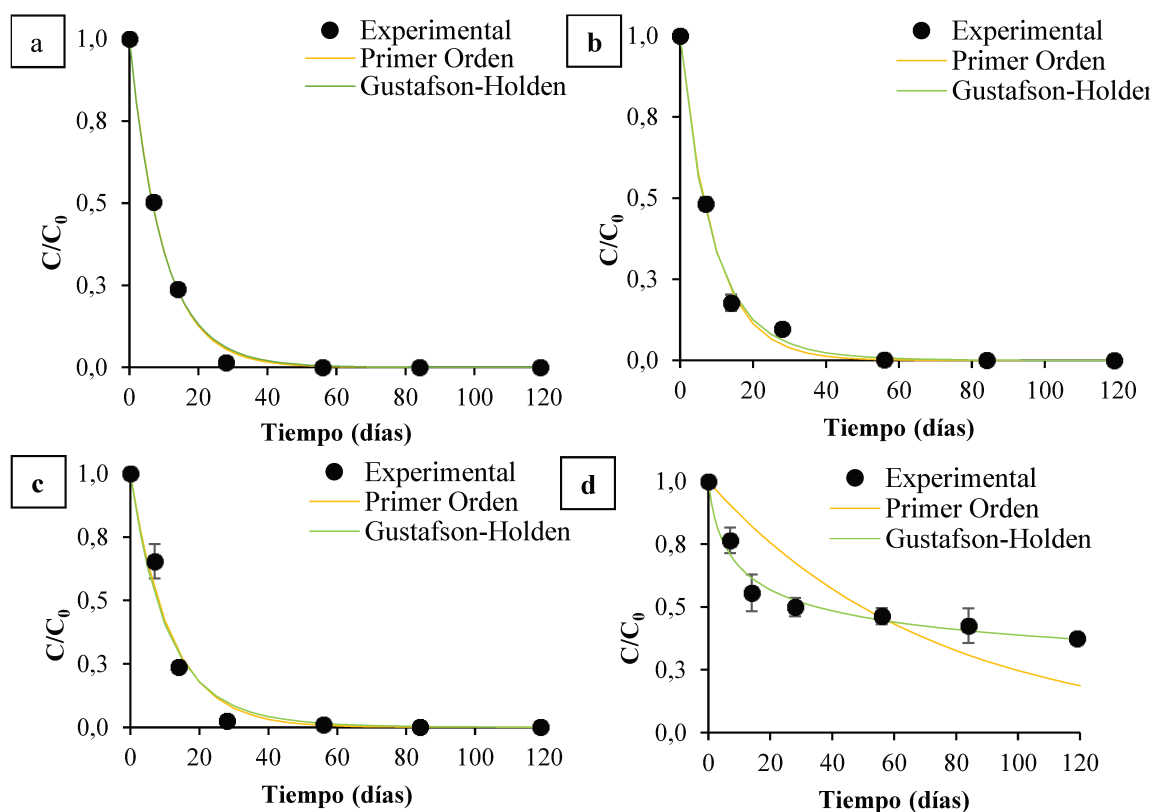
Este insecticida no polar, con una vida media reportada de 15 a 76 días en el suelo, es propenso a absorberse en el sólido debido a su baja solubilidad en agua, mientras que sus principales metabolitos intermedios (ácido 3-fenoxibenzoico y ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico son solubles y móviles, con tasas de degradación más rápidas pero mayor toxicidad aguda para los organismos terrestres (Bhatt et al., 2022; PPDB, 2024). En un estudio de Omirou et al. (2012a), se reportaron valores de vida media de 14,8 y 18,7 días para CIP con dos biomezclas compuestas por suelo, paja y tallos de uva, y un compost de semillas que contenía 25 y 50% de compost, respectivamente. Estos valores son consistentes con esta Tesis, ya que a partir de los datos experimentales se pudo estimar una vida media cercana a los 10 días en las biomezclas con vermicompost. La degradación de CIP fue también estudiada por Omirou et al. (2012b) en biomezclas a base de compost y encontraron que el modelo SFO describió mejor la cinética, informando un  $DT_{50}$  de 18,7 hasta 36,4 días, para las diferentes biomezclas. En este caso, SRV-C2 es comparable a su mejor biomezcla (18 días) y SRV-C1 fue aún más eficiente (11 días). La biomezcla SRV-C1 también fue más eficiente que las mezclas de suelo con enmiendas orgánicas e inorgánicas ensayadas por Amin et al. (2021) para la degradación de dosis bajas de CIP (0,9-4,8 mg kg<sup>-1</sup>), mientras que SRV-C2 fue comparable con su mejor biomezcla, que contenía estiércol ( $DT_{50}$  18,6 días). Estos autores informaron vidas medias aplicando ecuaciones cuadráticas de Primer Orden a las concentraciones de CIP residuales, y concluyeron que las enmiendas orgánicas tienen un mejor potencial que las enmiendas inorgánicas y el suelo solo para degradar este plaguicida; esto también se observó para organofosforados como el DIM.



**Figura 17.** Cinética de degradación modelada para CIP en cada uno de los sustratos a) Biomezcla SRV-C1; b) Biomezcla SRV-C2; c) Biomezcla SR y d) Suelo solo. Los modelos se indican en líneas amarillas (Primer Orden) y verdes (Gustafson-Holden), mientras que los datos experimentales ● y sus respectivas barras de error se indican en color negro.

En el caso del ACE, como se observa en la Fig. 18, su eliminación siguió la misma tendencia de disipación para las tres biomezclas con alta degradación a partir del día 28 ( $\geq 90\%$ ). Sin embargo, la eficiencia fue mayor para SRV-C1 y SRV-C2, ya que a partir del día 56 las concentraciones medidas estuvieron por debajo del límite de detección. En el caso del suelo, se logró una tasa de degradación del 63% después de 119 días de ensayo. En el caso de las biomezclas con vermicompost, se estimó una vida media de 6-7 días. Este resultado concuerda con Chu & Eivazi (2018) quienes informaron valores de vida media de 4 a 6 días para la eliminación de ACE en combinación con otros plaguicidas utilizando biomezclas con paja de trigo, tierra y compost en reemplazo de turba. Zhang et al. (2021) encontraron diez metabolitos y ocho conjugados como productos de la degradación del ACE en el suelo, pero la molécula de herbicida puede sufrir diferentes vías degradativas afectadas por la matriz, la humedad, el pH, la MO y las comunidades microbianas. Al respecto Delgado-Moreno et al. (2017) también sostienen que la presencia de metabolitos puede limitar la degradación de plaguicidas a través de un fenómeno de degradación competitivo. Para la disipación de ACE, Chu &

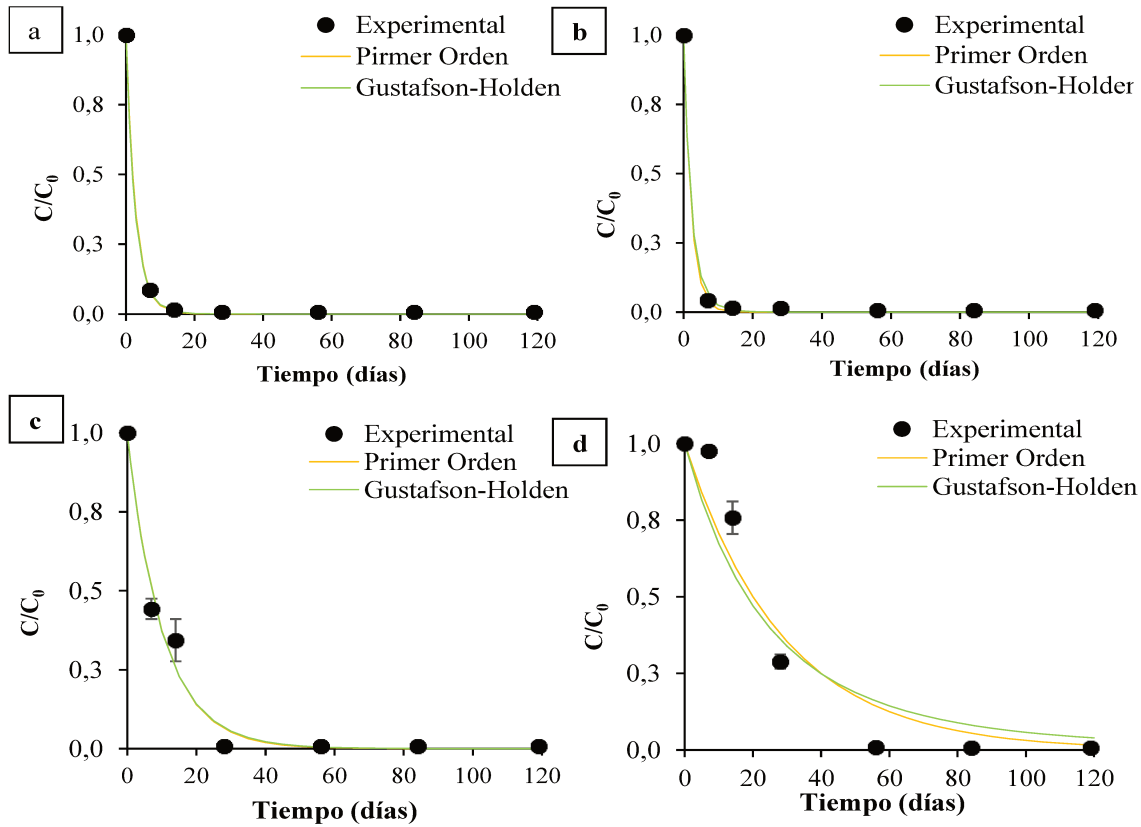
Eivazi, (2016) también aplicaron el modelo SFO y obtuvieron resultados consistentes a los aquí presentados, con valores de  $k$  comparables de 0,13-0,17 día<sup>-1</sup> y vidas medias similares con diferentes biomezclas de compost/turba, paja de trigo y suelo. Cai et al. (2007) informaron un valor de  $k$  similar de 0,11 día<sup>-1</sup>, junto con una vida media equivalente, para la degradación de ACE en un suelo modificado con un fertilizante líquido orgánico comercial; mientras que Feng et al. (2023) también aplicando un modelo cinético de primer orden, observaron una mejora de las tasas de degradación al agregar enmiendas orgánicas o fertilizantes al suelo, que modifican la estructura microbiana de bacterias y hongos. Cabe señalar que ambos trabajos se realizaron con una solución de ACE de soluto único y no en una mezcla de plaguicidas.



**Figura 18.** Cinética de degradación modelada para ACE en cada uno de los sustratos a) Biomezcla SRV-C1; b) Biomezcla SRV-C2; c) Biomezcla SR y d) Suelo solo. Los modelos se indican en líneas amarillas (Primer Orden) y verdes (Gustafson-Holden), mientras que los datos experimentales ● y sus respectivas barras de error se indican en color negro.

Finalmente, en cuanto al 2,4-D (Fig. 19), la concentración en todas las biomezclas estudiadas cayó por debajo del límite de detección a los 28 días, mientras que en el suelo no estuvo por debajo del límite de detección hasta los 84 días. A los 7 días, solo SRV-C1 y SRV-C2 presentaron menos de

9% y 4% de 2,4-D, respectivamente. A pesar de la alta eficiencia de remoción de las tres biomezclas, las velocidades de disipación fueron mayores para las dos biomezclas con vermicompost. Esta alta remoción concuerda con los resultados reportados por Knight et al. (2016) ,quienes estudiaron la disipación de este herbicida en una biomezcla de suelo, estiércol compostado y paja de trigo, y observaron el 50% de remoción en aproximadamente 6 días. De manera similar, el estudio de Fernandez et al. (2022) demostró que una biomezcla compuesta por rastrojo de trigo y suelo logró degradar más del 96% del 2,4-D después de 15 días, y no se detectó su metabolito principal, el 2,4-DCP, el cual mostró una degradación aún más rápida. Otros dos estudios reportaron la remoción total de 2,4-D, en una mezcla con otros plaguicidas, después de 41 días utilizando diferentes biomezclas con compost vegetal, sisal, algas y rastrojo de maíz (Góngora-Echeverría et al., 2017) y una biomezcla de suelo y cáscara de maíz (Córdova-Méndez et al., 2021a) con una vida media de entre 5,5 y 2,7 días, respectivamente. El grupo de Góngora-Echeverría et al. (2017) estudió la disipación de 2,4-D en una mezcla de plaguicidas, en diferentes biomezclas de compost y materiales orgánicos, informando un  $DT_{50}$  más alto, de 5,5 días a partir del modelo SFO. Más recientemente, Córdova-Méndez et al. (2021b) aplicaron el modelo de Gompertz y obtuvieron un  $DT_{50}$  de 2,7 días para una biomezcla de suelo y cáscara de maíz.



**Figura 19.** Cinética de degradación modelada para 2,4-D en cada uno de los sustratos a) Biomezcla SRV-C1; b) Biomezcla SRV-C2; c) Biomezcla SR y d) Suelo solo. Los modelos se indican en líneas amarillas (Primer Orden) y verdes (Gustafson-Holder), mientras que los datos experimentales ● y sus respectivas barras de error se indican en color negro.

El  $DT_{50}$  de IMI fue, en promedio, un 15% más bajo con SRV-C1, mientras que DIM y ACE se disiparon casi un 60% más rápido con esta biomezcla. Este resultado sugiere que SRV-C1 fue una biomezcla más efectiva en general. Al comparar las dos biomezclas con otras, mostraron una muy buena efectividad. Estas comparaciones muestran que, para estos cinco plaguicidas en biomezclas, el modelo cinético SFO es el más adecuado. Sin embargo, vale la pena mencionar que las diferencias en las vidas medias estimadas no solo dependen del modelo aplicado, sino que están influenciados por múltiples factores como la biodisponibilidad del compuesto, la actividad microbiana y las condiciones ambientales (Feng et al., 2023; Luzzi et al., 2024), las características fisicoquímicas de la biomezcla como el pH, la humedad, la MO y el contenido de lignina (Góngora-Echeverría et al., 2017) y también por la maduración de las biomezclas durante las cuales se desarrollan cambios en las comunidades microbianas y la actividad enzimática (Briceño et al., 2014).

**Tabla 8.** Parámetros estimados del modelo de Primer Orden Simple y Gustafson-Holden (bifásico) y vidas medias de disipación (DT<sub>50</sub>) calculadas de los cinco plaguicidas en cada sustrato.

		Primer Orden (SFO)			Gustafson-Holden			DT <sub>50</sub> (días)
		Parámetro del modelo		DT <sub>50</sub> (días)	Parámetros del modelo		DT <sub>50</sub> (días)	
		k (día <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>		α	β	r <sup>2</sup>	
<b>SRV-C1</b>	IMI	0,028	0,949	25,06	5,08	161,18	0,952	23,56
	DIM	0,091	0,953	7,65	18,00	190,00	0,951	7,46
	CIP	0,064	0,996	10,87	5,05	71,18	0,997	10,47
	ACE	0,103	0,998	6,71	21,32	200,00	0,997	6,61
	2,4-D	0,349	0,999	1,98	17,97	47,89	0,999	1,88
<b>SRV-C2</b>	IMI	0,023	0,966	30,69	2,82	98,00	0,955	27,28
	DIM	0,053	0,991	13,08	5,78	97,00	0,983	12,35
	CIP	0,038	0,978	18,21	4,41	105,50	0,972	17,98
	ACE	0,109	0,995	6,35	8,72	74,42	0,995	6,16
	2,4-D	0,449	0,999	1,54	9,16	20,00	0,999	1,57
<b>SR</b>	IMI	0,021	0,947	32,65	2,69	99,00	0,936	29,14
	DIM	0,039	0,936	17,79	4,44	99,80	0,918	16,85
	CIP	0,027	0,922	25,27	1,14	24,38	0,975	20,36
	ACE	0,086	0,980	8,02	9,00	94,90	0,975	7,60
	2,4-D	0,098	0,983	7,04	39,41	393,95	0,983	7,98
<b>S</b>	IMI	0,012	0,408	56,52	0,20	1,42	0,976	45,03
	DIM	0,018	0,892	38,66	0,68	16,99	0,995	30,08
	CIP	0,019	0,778	36,48	0,48	7,86	0,991	25,91
	ACE	0,014	0,424	49,57	0,25	2,33	0,972	35,03
	2,4-D	0,035	0,934	20,01	4,04	97,50	0,912	18,25

Los dos modelos cinéticos aplicados describieron muy bien las curvas experimentales de todas las biomezclas, principalmente las de SRV-C1 y SRV-C2 ( $r^2 > 0,95$ ). La similitud de los ajustes y de los DT<sub>50</sub> calculados con ambos modelos podría deberse a que más del 50% de la disipación de los plaguicidas ocurrió en la etapa inicial, durante las primeras semanas. Aunque el modelo de SFO ajustó ligeramente mejor la mayoría de las curvas de degradación, el modelo bifásico fue el que mejor pudo describir la cinética de degradación de la mayoría de los plaguicidas en el S ( $r^2 > 97$ ). Esto puede deberse a que, debido a la menor velocidad de degradación, tienen más peso las diferentes velocidades a las que se degradan las fracciones consideradas por el modelo. Para el caso del suelo el modelo de SFO sobreestima los DT<sub>50</sub>.

Acorde a las constantes  $k$  de degradación, en donde cuando mayor es el valor de  $k$ , más rápida es la degradación; en la biomezcla que más rápido se degradó el 2,4-D fue en SRV-C2. Al contrario, el ACE se degradó a una velocidad muy similar en ambas biomezclas con vermicompost. La CIP mostró las velocidades de remoción más altas en SRV-C1, al igual que el DIM, con respecto al resto de los sustratos. El escenario menos favorable, es decir la degradación más lenta, se observó para IMI en S.

El 2,4-D, como se mencionó anteriormente, fue el plaguicida que mostró menor persistencia en los sustratos, con un  $DT_{50}$  mínimo de 2 días para las biomezclas diseñadas en esta Tesis, y un máximo de 20 días en el S, mientras que el IMI fue el más persistente en el tiempo. Esto se respalda tanto gráficamente, como por las constantes cinéticas estimadas a partir del modelo SFO, donde 2,4-D exhibe el valor de  $k$  más alto y IMI el más bajo. Además, según el modelo de Gustafson-Holden, la disipación es más rápida para valores más altos de  $a$  y para valores más pequeños de  $\beta$ ; lo que concuerda con los valores estimados de estos parámetros para estos dos plaguicidas.

Los modelos de decaimiento exponencial (Hernández-Soriano et al., 2009) y el modelo bi-exponencial (FOCUS et al., 2006) también fueron aplicados, pero ninguno de ellos produjo un ajuste significativamente mejor; por lo tanto, no se examinan más a fondo en la presente Tesis. Como sostienen otros autores, cuando varios modelos describen con precisión los datos experimentales, es preferible seleccionar el más sencillo (Broznić & Milin, 2013).

### 2.5.2. Actividad microbiológica de las biomezclas y del suelo durante la degradación de los plaguicidas

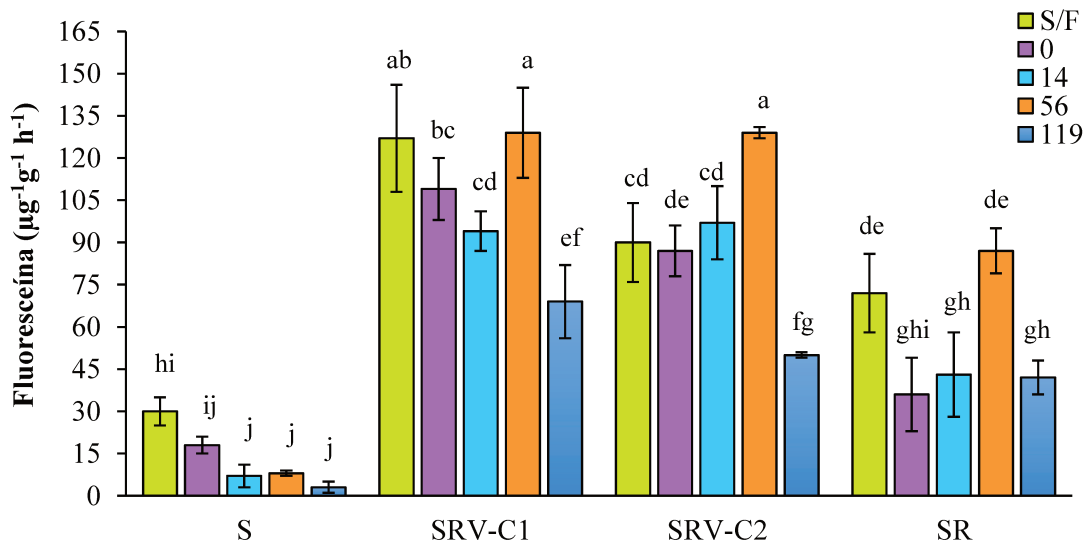
Como se mencionó previamente, a lo largo del ensayo de degradación, se midió a intervalos regulares la actividad microbiana (FDA y FOX), observándose la actividad biológica original de cada sustrato antes de ser pulverizados, así como su variación durante el ensayo y al finalizar a los 119 días. Se sabe que la actividad de las enzimas extracelulares como ser las celulasas, fosfatasas y otras hidrolasas pueden responder a perturbaciones en el sustrato y desempeñar funciones claves en los ecosistemas (Sinsabaugh, 2010). Conocer como varía esta actividad ayuda a comprender mejor la eficiencia en la remoción de plaguicidas, que depende en gran medida de los microorganismos presentes. Además, permite evaluar si concentraciones bajas de plaguicidas aún pueden ser perjudiciales para la microbiota del sustrato.

#### 2.5.2.1. Seguimiento de la hidrólisis de la FDA

En la Fig. 20 a continuación, se puede observar la variación de la FDA a lo largo de todo el ensayo en cada uno de los sustratos. Al comienzo, todos los sustratos presentaron una actividad

similar, excepto S. Este se diferenció del resto de los sustratos por su baja actividad biológica a lo largo de todo el ensayo. Las biomezclas con vermicompost sostuvieron la actividad en buenos niveles, no así SR, el cual disminuyó su actividad luego de que se aplicaran los plaguicidas, demostrando el aporte del vermicompost a la actividad biológica benéfica. Las fluctuaciones en la actividad de la FDA dependen generalmente de la composición de la biomezcla, de las propiedades y dosis de plaguicidas aplicadas. Al finalizar el ensayo, la hidrólisis de la FDA disminuyó significativamente en todos los sustratos ( $p_S = 0,008$ ;  $p_{SR} = 0,039$ ;  $p_{SRV-C1} = 0,012$ ;  $p_{SRV-2} = 0,04$ ) en comparación a cuando no estaban fumigadas. Una vez fumigados, se observó una tendencia a disminuir la actividad biológica, aunque luego de los 119 días de ensayo, las tres biomezclas lograron sostener mayores valores de actividad con relación a S ( $3 \pm 2 \mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$  biomezcla). La mayor actividad microbiológica al finalizar el ensayo se observó en SRV-C1. La actividad de la FDA puede ser estimulada o inhibida con el tiempo después de la aplicación de plaguicidas; que las biomezclas con vermicompost hayan sido biológicamente más activas que el suelo y que la biomezcla de referencia, podría explicar su mayor eficiencia para la eliminación de plaguicidas.

La disminución de la actividad de la hidrólisis de la FDA durante la degradación de una amplia gama de plaguicidas y otros contaminantes se ha reportado con frecuencia (Fernandez et al., 2022; Nobili et al., 2022; Saez et al., 2022b) . Aunque se ha sugerido la inhibición o estimulación inicial como respuesta a los plaguicidas, esta actividad, como se expresó anteriormente, está relacionada con la población de microorganismos, que a su vez está directamente relacionada con la disponibilidad de alimentos. La actividad microbiana fue mayor en SRV-C1 y SRV-C2 al inicio (0 día) y se mantuvo así después de 119 días del ensayo para la degradación de los plaguicidas, lo que también podría estar relacionado con el mayor contenido de MO y la acción de las lombrices cuando se produjo el vermicompost a partir de los residuos. Las lombrices modifican las propiedades físicas, químicas y biológicas del sustrato afectando la biomasa microbiana, las actividades enzimáticas y pueden mejorar las actividades de las enzimas microbianas en comparación con el suelo (Buivydaite et al., 2023). De hecho, las paredes del sistema de galerías que construyen las lombrices de tierra son sitios claves para los descomponedores microbianos y la producción de exoenzimas. Muchas enzimas hidrolasas muestran una mayor actividad catalítica en estas bioestructuras que en el suelo circundante (Sánchez-Hernández et al., 2021). La mayor actividad en SRV-C1 y SRV-C2 puede relacionarse con el mejor rendimiento de estas biomezclas en la degradación de algunos de los plaguicidas. Por el contrario, la pobre actividad microbiológica de S, reflejada en la baja actividad FDA, y el menor contenido de MO seguramente afectaron la capacidad degradativa de S, que difirió significativamente del resto de las biomezclas.



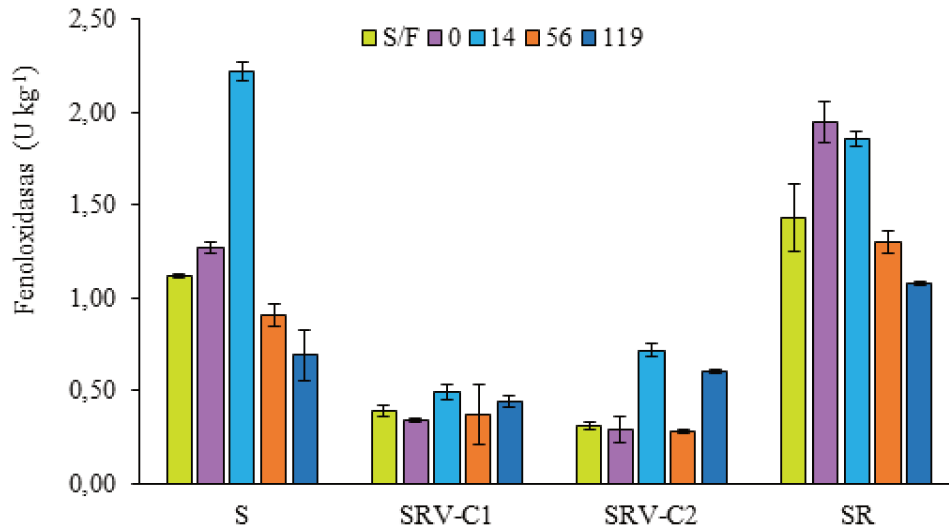
**Figura 20.** Actividad de la FDA en el suelo (S) y en las biomezclas (SRV-C1, SRV-C2 y SR) desde antes de ser fumigadas (S/F) hasta finalizar el ensayo a los 119 días. Los valores se encuentran expresados como la media de los valores y las barras de error indican la desviación estándar (SD). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

#### 2.5.2.2. Seguimiento de la actividad de las Fenoloxidasas

La actividad de FOX en los cuatro sustratos se muestra en la Fig. 21. Los valores obtenidos están en el mismo orden que los reportados por (Tortella et al., 2013) para una biomezcla tradicional. La actividad de FOX disminuyó después de la degradación de los plaguicidas en S y SR, aunque solo significativamente en S ( $p_s = 0,038$ ); por otro lado, aumentó en las biomezclas con vermicompost, aunque solo significativamente en SRV-C2 ( $p = 0,012$ ). Sin embargo, se puede observar que FOX fue mayor en SR y S, y menor en SRV-C1 y SRV-C2. Se ha encontrado que el pH ácido promueve el desarrollo de hongos (Gao et al., 2015), pero contrariamente ambas biomezclas con vermicompost presentaron valores de pH alcalino: 8,8 (SRV-C1) y 8,7 (SRV-C2), lo que podría haber inhibido los hongos degradadores de lignina y, en consecuencia, el peso de las enzimas peroxidasas en todo el proceso degradativo podría disminuir. Es necesario considerar también que, aunque la presencia de hongos es intrínseca a las biomezclas, otros microorganismos podrían ser más cruciales para la degradación de los plaguicidas y no solo los representados por la actividad de FOX (Saez et al., 2022b). Las biomezclas con vermicompost mostraron valores y comportamientos similares. Si bien sus valores fueron más bajos que el resto de los sustratos, demostraron poder sostener la actividad en el mismo nivel durante todo el tiempo de ensayo.

La medición de la actividad hidrolítica y fenoloxidasas en los sustratos puede proporcionar solo un enfoque parcial de la relación entre los plaguicidas y la actividad biológica, dado que la

biodegradación de estos plaguicidas en las biomezclas y el suelo es una conjunción compleja de interacciones físicas, químicas y biológicas previas de las lombrices, hongos, bacterias e incluso bacteriófagos, entre otros (Chao et al., 2023; Tortella et al., 2012).



**Figura 21.** Actividad FOX en el suelo (S) y en las biomezclas (SRV-C1, SRV-C2 y SR) desde antes de ser fumigadas (S/F) hasta finalizar el ensayo a los 119 días. Los valores se encuentran expresados como la media de los valores y las barras de error indican la desviación estándar (SD).

### 2.5.3. Ensayos biológicos para corroborar el grado de descontaminación

Después de su uso, las biomezclas gastadas pueden contener residuos de los plaguicidas originales e incluso algunos de sus metabolitos que también pueden ser tóxicos. Cuantificar regularmente todos estos compuestos puede ser poco práctico y costoso; por lo tanto, un enfoque útil para monitorear la biomezcla puede ser medir su capacidad de desintoxicación a través de pruebas ecotoxicológicas, como medida cualitativa de los posibles efectos perjudiciales de los compuestos residuales (Beltrán-Flores et al., 2024). Con el fin de investigar cualitativamente el grado de descontaminación alcanzado de los sustratos se realizaron, como se indicó en la metodología, un ensayo de germinación (Fig. 22-a y b) y uno de exposición de lombrices (Fig. 22-c).

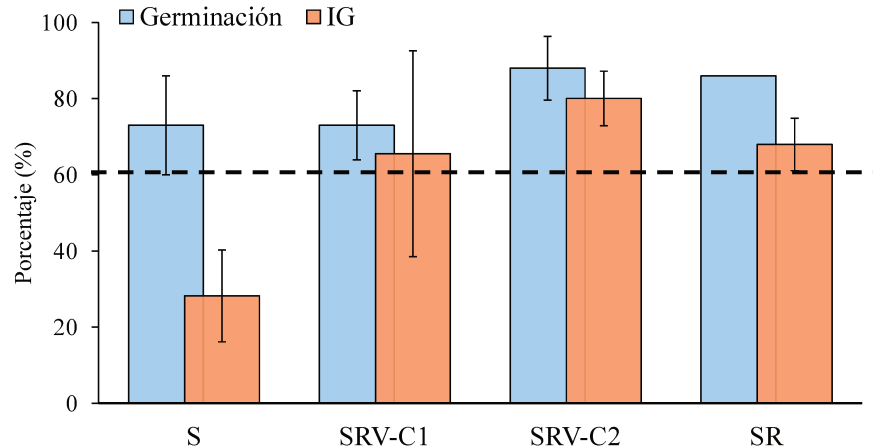


**Figura 22.** Fotografías de los Ensayos biológicos de germinación con semillas de *L. sativa* (a y b) y de lombrices *E. fetida* (c) expuestas a los diferentes sustratos al finalizar el ensayo de degradación.

### 2.5.3.1. Ensayo de germinación

La Fig. 23 muestra el porcentaje de germinación e IG para los sustratos resultantes. En todos los sustratos germinaron al menos el 70% de las semillas colocadas. Para que un sustrato no sea considerado fitotóxico su IG debe ser mayor al 60% (Zucconi et al., 1985). Los valores medios de las tres biomezclas estudiadas superaron este límite, mientras que en S se evidenció que a los 119 días de ensayo se hallaba dentro del rango de fitotoxicidad (IG=  $28 \pm 12\%$ ). Específicamente en las biomezclas SRV-C1 y SRV-C2 el IG fue de  $66 \pm 27$  y  $80 \pm 7$  %, respectivamente; la mayor diferencia se encontró entre S y SRV-C2 ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre SRV-C1 y SRV-C2 ( $p = 0,226$ ), ni entre SR y las biomezclas con vermicompost ( $p_{\text{SRV-C1}} = 0,77$ ;  $p_{\text{SRV-C2}} = 0,077$ ). Si bien SR y SRV-C1 mostraron un IG por encima del límite de fitotoxicidad, debido a su

variabilidad, no se puede garantizar un sustrato no fitotóxico. El mejor rendimiento fue logrado por SRV-C2, mostrando una desintoxicación significativa.



**Figura 23.** Índice de germinación (barras anaranjadas) y porcentaje de germinación (barras celestes) para cada uno de los sustratos luego de finalizar el ensayo de degradación (día 119). En líneas punteadas se encuentra marcado el límite mínimo de IG=60% para que un sustrato no sea considerado fitotóxico. Los valores se encuentran expresados como la media de los valores y las barras de error indican la desviación estándar (SD).

### 2.5.3.2. Exposición aguda de lombrices

Por otro lado, *E. fetida* también se comportó como un indicador sensible de la idoneidad de los sustratos. Solo las biomezclas con vermicompost en su composición fueron apropiadas para la supervivencia de las lombrices de tierra; todas ellas estaban vivas y se movían libremente después de 96 h. Esto puede ser consecuencia de las características de los sustratos y del hecho de que la concentración restante de los cinco plaguicidas en ambas biomezclas fue inferior a la  $CL_{50}$  (concentración letal media) reportada para *E. fetida* en bioensayos agudos; es decir, la concentración de imidacloprid disminuyó a 0,5-1,0 mg kg<sup>-1</sup> mientras que la  $CL_{50}$  reportada está entre 0,8 y 10,7 mg kg<sup>-1</sup> (Miglani & Bisht, 2020; Pesticide Properties Data Base, 2025). Tanto SR como el S resultaron ser tóxicos para esta especie. En estos sustratos se observó que todas las lombrices estaban muertas antes de llegar a las 96 h, con presencia de ampollas, ulceraciones y constricción. A pesar del buen rendimiento de la biomezcla SR en la degradación de la mayoría de los plaguicidas, con concentraciones por debajo de la  $CL_{50}$  para estos organismos, y un buen porcentaje de IG, trazas de los plaguicidas más recalcitrantes y/o sus metabolitos pudieron afectar la supervivencia en SR. Por el contrario, en S, la concentración de dimetoato fue superior a la tolerable en comparación con la  $CL_{50}$

de 28-31 mg kg<sup>-1</sup> para las lombrices y la concentración de imidacloprid (9,7 mg kg<sup>-1</sup>) también estuvo dentro del rango letal. Estos dos plaguicidas restantes junto a la presencia de metabolitos fueron posiblemente responsables de este resultado. En este sentido, Wang et al., (2016) encontraron que el orden decreciente de toxicidad aguda promedio en *E. fetida* fue neonicotinoides > piretroides > organofosforados. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la categoría química del contaminante, así como las características del sustrato, influyen en los efectos sobre las lombrices de tierra (Swati Bardiya & Seema Dixit, 2024).

## 2.6. Conclusión

A lo largo de este Capítulo se ha podido corroborar que el vermicompost mejora el éxito de las biomezclas, no solo en relación con su objetivo principal, la remoción de los plaguicidas, sino también en la obtención de biomezclas agotadas que no sean tóxicas para reutilizar, como fue el caso de las biomezclas con vermicompost. Además, según los resultados obtenidos, las biomezclas alcanzaron una eficacia de degradación de más del 90% de la concentración inicial de los plaguicidas en el plazo de 84 días, y al final del ensayo se había disipado más del 97% de los plaguicidas. Este Capítulo representa un avance en el aporte de estudios sobre biomezclas con vermicompost específico de residuos regionales, frente a una escasez de trabajos existentes al respecto.

Asimismo, se observó que las biomezclas que integran vermicompost sostuvieron en el tiempo una mayor actividad biológica total, lo que posiblemente mejoró la degradación de los plaguicidas y permitió que las lombrices de tierra *E. fetida* puedan sobrevivir en estas biomezclas agotadas, pero no en el suelo. Específicamente, al finalizar el ensayo, la hidrólisis de la FDA en las biomezclas con vermicompost fue 1,4 veces en promedio más alta que en SR, la biomezcla de referencia, y 20 veces más alta que en S. Asimismo, estas fueron las únicas biomezclas con tendencia a aumentar los valores de FOX a los 119 días. Estos valores son concordantes con el tiempo de vida media de los plaguicidas en cada sustrato; ya que a SR le llevó en promedio 1,5 veces más tiempo disipar la mitad de la concentración inicial de los plaguicidas y al S 3 veces más que ambas biomezclas SRV (modelo SFO).

Comparando ambas biomezclas con vermicompost, SRV-C2, que incluía los lodos cloacales, tuvo un 15% más alto el IG que SRV-C1. Respecto a la velocidad de degradación, IMI, DIM, y CIP se degradaron más rápido en SRV-C1. El ACE no mostró variaciones significativas entre biomezclas de su constante cinética *k*. Sólo el 2,4-D se degradó más rápido en SRV-C2.

Las respuestas biológicas permitieron confirmar que utilizar diferentes bioindicadores, además de la cuantificación de los plaguicidas, permite una evaluación más adecuada de los procesos de biodegradación en las camas biológicas.

Por último, aún quedan numerosos obstáculos por superar antes de que las camas biológicas puedan adoptarse ampliamente en los campos, pero las camas biológicas construidas con vermicompost facilitan la gestión sostenible de los residuos de plaguicidas. Estos desafíos están relacionados en gran medida con las políticas y legislaciones locales, que deberían facilitar su uso a través de la iniciativa de instituciones públicas o incluso entidades privadas. Es alentador señalar que el Instituto Argentino de Normalización y Certificación ha aprobado recientemente una guía para la construcción y operación de camas biológicas. Esto, sin duda, facilitará la implementación de esta tecnología.

### 3. Estudios de adsorción de los plaguicidas en las biomezclas

#### 3.1. Introducción

Los materiales constitutivos de las biomezclas biológicamente activas son fundamentales en el diseño y la eficiencia de los Sistemas de Biopurificación (SBP). Estas biomezclas tienen como propósito adsorber los plaguicidas que ingresan al sistema, reteniendo sus moléculas a medida que se desplazan a través de la cama biológica y haciéndolas accesibles para los microorganismos capaces de degradarlas. Por lo tanto, sus propiedades condicionan tanto la retención de los plaguicidas, como su biodisponibilidad para la degradación (Beltrán-Flores et al., 2024; Odukkathil & Vasudevan, 2020).

Comprender los mecanismos de adsorción resulta fundamental para interpretar la dinámica de los plaguicidas dentro del sistema y optimizar el diseño de biomezclas más eficientes (Crini et al., 2018; Rasool et al., 2022). Sin embargo, debido a la gran variedad de plaguicidas, su comportamiento de adsorción es difícil de prever en base únicamente a sus estructuras moleculares (Lengyel & Földényi, 2003). La relación entre los procesos de adsorción y degradación es compleja y depende tanto de las características intrínsecas de los plaguicidas como de la microbiología y las propiedades fisicoquímicas de la biomezcla (Delgado-Moreno et al., 2019). Es importante señalar que la mayoría de los estudios no profundizan en la integración entre los resultados de adsorción y degradación de los contaminantes, pese a que tal vez podrían ayudar a determinar la eficiencia global de los SBP.

En este tercer Capítulo se estudiaron exclusivamente las biomezclas que contenían vermicompost, dado que no existen investigaciones que evalúen la adsorción mono y multisoluto de los plaguicidas seleccionados en biomezclas formuladas con vermicompost derivado de estos residuos. Además de que este material como componente de las biomezclas potencia la degradación de plaguicidas, como ya se evaluó en el Capítulo 2, presenta ventajas estructurales y funcionales (Azizi Yeganeh et al., 2024; Ma et al., 2022b; Sánchez-Hernández et al., 2019) que lo posicionan como un componente prometedor para mejorar la adsorción de los plaguicidas.

La adsorción del adsorbato (plaguicidas) sobre el adsorbente (biomezcla) puede representarse gráficamente mediante isotermas de adsorción. Estas se dividen en seis tipos principales, según el comportamiento inicial de la curva (Anexo III: “Clasificación de las isotermas de adsorción”) (Crini et al., 2019; Hu et al., 2023). El modelado de estas isotermas permite estimar la capacidad de adsorción y describir características inherentes al proceso. Esta información es clave para evaluar el desempeño de los adsorbentes. La comprensión en profundidad de los modelos isotérmicos puede mejorar considerablemente el diseño de un SBP y el patrón de interacción adsorbato-adsorbente (Chen et al., 2022).

Asimismo, la investigación sobre adsorción multisoluto o competitiva aún debe avanzar, especialmente en comparación con la adsorción de un solo componente. Esto es relevante porque la mayoría de los sistemas reales están compuestos por múltiples adsorbatos de manera simultánea, situación que también se presenta en los SBP (Amrutha et al., 2023).

### 3.2. Objetivos

Este tercer Capítulo se centró en comprender y caracterizar la adsorción de los plaguicidas seleccionados sobre las dos biomezclas diseñadas con vermicompost en el Capítulo 1. Así como comparar la eficiencia de adsorción de ambas biomezclas para los cinco plaguicidas, a partir de aplicar diferentes modelos matemáticos para describir los datos experimentales. Además, se espera investigar si existe una correlación de la cinética de degradación, presentada en el Capítulo 2, con los parámetros de adsorción obtenidos. La finalidad de obtener esta correlación es dilucidar su contribución al funcionamiento de estos SBP y su posible uso como herramienta predictiva para la eficiencia del sistema.

### 3.3. Materiales y métodos

#### 3.3.1. Cuantificación de los plaguicidas en solución

Para la cuantificación de los plaguicidas en solución se emplearon dos cromatógrafos: un equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplado a un detector UV (Waters mod. 1525), y un equipo de cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones (GC-ECD) (PerkinElmer-Clarus 500 GC). Las principales propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas cuantificados se pueden observar en la Tabla 9.

La cuantificación de ACE, 2,4-D, DIM e IMI en solución se realizó mediante HPLC-UV. El IMI y el 2,4-D se midieron a longitudes de onda de 270 y 236 nm, respectivamente, utilizando acetonitrilo (ACN): H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) acidificado con ácido acético glacial al 1% como fase móvil (Ettiene et al., 2013; Fernandez et al., 2022). El ACE y el DIM se midieron a 210 nm, con la misma fase móvil, pero no acidificada (Kumar, 2013; Xiao-Zhen et al., 2014).

La cuantificación de CIP se realizó por GC-EC ya que posee una solubilidad en agua muy baja (0,009 mg mL<sup>-1</sup>, 20 °C). Previamente, fue necesario encontrar una técnica de extracción apropiada. Para ello se realizó una extracción líquido-líquido con n-hexano (Albaseer et al., 2010). Se obtuvo una recuperación promedio de 95 ± 3%. Las determinaciones con el GC-EC se realizaron empleando una columna capilar ZB-50 (30 m × 0,25 mm de diámetro interior, 0,25 μm de espesor de película) (Phenomenex, EE. UU.) utilizando N<sub>2</sub> como gas *carrier* (fase móvil), a un flujo constante de 1 μL min<sup>-1</sup>, y *make up* (gas auxiliar). El programa de temperatura comenzó a 130 °C (mantenido durante 1

min) y luego se elevó mediante rampa de 30 °C min<sup>-1</sup> hasta 310 °C (mantenido durante 4 min). El volumen de inyección fue de 1 µL y la temperatura del inyector de 270 °C.

Para realizar las curvas de calibrado correspondientes a cada plaguicida (Anexo II: “Curvas de calibrado de los plaguicidas seleccionados”). Se emplearon estándares analíticos: 2,4-D y ACE (PESTANAL®); DIM (Chem Service Inc.); IMI y CIP (Surcos S.A<sup>©</sup>). Con las curvas obtenidas se establecieron los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) acordes a cada equipamiento y plaguicida. Para las soluciones acuosas de los plaguicidas usados en los ensayos de adsorción se utilizaron sus formulaciones comerciales: 2,4-D (30% p/v DEDALO elite); CIP (Microactive 25% p/v); IMI (Record 30% p/v) y ACE (Acetoclor 90% p/v), El DIM se adquirió en un local comercial (GlacoXAN© D-Sist 7,5%).

**Tabla 9.** Características fisicoquímicas de las moléculas de los plaguicidas seleccionados (PubChem, 2025; Pesticide Data Base, 2025).

Plaguicida	Masa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidad en agua (g L <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
IMI	255,7	0,5	0,57
DIM	229,3	25	0,75
CIP	416,3	0,009	6,9
ACE	269,8	0,2	4,1
2,4-D	221,0	0,9	2,8

### 3.3.2. Estudios de adsorción monosoluto

#### 3.3.2.1. Ensayos preliminares

Se realizaron estudios preliminares a temperatura constante, para establecer en primer lugar, el tiempo de equilibrio y las dosis adecuadas (relación masa- volumen de la solución de plaguicidas). Para conocer el tiempo de equilibrio, tal como se observa en la Fig. 24, se contactaron las biomezclas con los plaguicidas empleando frascos color caramelo (para evitar la fotodegradación). Las suspensiones se agitaron a 150 rpm en un agitador rotatorio (M-23 VICKING SRL). En ellas se midió periódicamente el pH y la concentración de plaguicidas (Sección 1.3.1) a los tiempos: 0, 6, 24 y 48 h.

Por otro lado, se buscó descartar la influencia de la degradación biológica significativa de los plaguicidas, por los microorganismos presentes en las biomezclas, durante los experimentos de adsorción en modo batch. Para lo cual, se realizó un ensayo en el que se prepararon soluciones con una concentración final de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), como biocida, a una la solución de  $246 \pm 32 \text{ mg L}^{-1}$  de cada plaguicida, y luego se compararon con los resultados sin el biocida.



**Figura 24.** Agitador orbital empleado para los ensayos de adsorción, junto con los frascos que contenían la biomezcla en contacto con la solución de plaguicida.

### 3.3.2.2. Obtención de las isotermas

Una vez hallado el tiempo de equilibrio a las 24 h, la temperatura  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y definida la dosis biomezcla-solución de plaguicidas, tal como se describió en la Sección anterior 3.3.2, se procedieron a realizar los ensayos de adsorción.

Todos los estudios de adsorción en modo batch monosoluto se realizaron a la temperatura constante mencionada anteriormente. Para obtener las isotermas de adsorción de los plaguicidas, se contactaron 4 g de las biomezclas maduras con 25 mL de solución de cada plaguicida en el rango de concentración de  $20\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$  hasta alcanzar el tiempo de equilibrio (24 h); determinado previamente. El pH de las suspensiones fue registrado a las 0 y 24 h. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 718g y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ ; las concentraciones de plaguicidas se determinaron mediante HPLC o GC (Sección 1.3.1). Los resultados se informan como valores promedio de tres mediciones. La cantidad de plaguicida adsorbida por

kilogramo de las biomezclas en equilibrio,  $q_e$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), se calculó a partir de la diferencia entre las concentraciones iniciales y de equilibrio de los plaguicidas en solución, de la siguiente manera (Ec. 3.1):

$$q_e = \frac{(C_o - C_e) V}{m} \quad (3.1)$$

Donde  $C_o$  es la concentración inicial de plaguicida en la solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_e$ , la concentración de equilibrio de plaguicida en la solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $V$ , el volumen de solución (L) y  $m$ , la masa de biomezcla (kg).

### 3.3.2.3. Modelado

Para describir y ajustar las isotermas experimentales de adsorción, se aplicaron cuatro modelos matemáticos, en sus formas no lineales (Al-ghouti & Da, 2020). Las ecuaciones de cada modelo se presentan a continuación:

$$q_e = \frac{Q_L K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3.2)$$

$$q_e = K_F (C_e)^{1/n_F} \quad (3.3)$$

$$q_e = \frac{K_R C_e}{1 + a_R (C_e)^{n_R}} \quad (3.4)$$

$$q_e = \frac{Q_H C_e^{n_H}}{K_D + C_e^{n_H}} \quad (3.5)$$

La Ec. (3.2) representa el modelo de Langmuir, donde  $Q_L$  es la capacidad máxima de adsorción ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). La Ec. (3.3) representa el modelo de Freundlich, donde  $1/n_F$  es el factor de heterogeneidad adimensional. La Ec. (3.4) corresponde al modelo de Redlich-Peterson, donde  $a_R$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) y  $n_R$  son parámetros que dependen de la naturaleza del adsorbente y el adsorbato y la Ec. (3.5) representa el modelo de Hill, donde  $Q_H$  es la capacidad máxima de adsorción de Hill y  $n_H$  el coeficiente de interacción cooperativa.  $K_L$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ),  $K_F$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) ( $\text{L mg}^{-1}$ ) $^{1/n_F}$ ),  $K_R$  ( $\text{L kg}^{-1}$ ) y  $K_D$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) son las constantes correspondientes a cada modelo.

El modelo de Langmuir posee dos parámetros y es el más simple y utilizado, asume que la adsorción está limitada a una monocapa, donde, una vez que el plaguicida ocupa un sitio en el adsorbente, ya no se puede volver a adsorber otra molécula, y que no existe una interacción entre las moléculas adsorbidas en sitios cercanos (Saadi et al., 2015).

El modelo de Freundlich describe un proceso de adsorción reversible y no ideal. A diferencia del modelo de Langmuir, este no se limita a la formación de la monocapa, por lo que es posible su aplicación en la adsorción multicapa. Este modelo asume que la superficie del adsorbente es heterogénea y los sitios activos y sus energías se distribuyen exponencialmente. Los sitios de unión más fuertes se ocupan primero, hasta que la energía de adsorción disminuye exponencialmente al finalizar el proceso de adsorción (Al-ghouti & Da, 2020; Saadi et al., 2015).

El modelo de Redlich-Peterson contiene tres parámetros e incorpora las características de las isotermas de Langmuir y Freundlich; el mecanismo de adsorción es un híbrido y no sigue la adsorción monocapa ideal. Este modelo se puede aplicar tanto en sistemas homogéneos como heterogéneos.

Finalmente, el modelo de Hill asume que la adsorción es un fenómeno cooperativo y explica la unión de diferentes especies a sustratos homogéneos. Además, asume que los adsorbatos tienen la capacidad de unirse en un sitio del adsorbente, lo que podría influir en otros sitios de unión en el mismo adsorbente (Al-ghouti & Da, 2020).

Al igual que en los modelos de la etapa de degradación del Capítulo 2, se utilizó el análisis de regresión no lineal para estimar todos los parámetros de los modelos, minimizando la suma de las diferencias de los cuadrados entre los valores experimentales y predichos (FOCUS et al., 2006).

### 3.3.3. Estudios de adsorción multisoluto

Se realizó un ensayo de adsorción multisoluto, buscando posibles efectos sinérgicos o antagonísticos entre los cinco plaguicidas, para lo cual se contactaron también 4 g de la biomezcla con 25 ml de una solución que contenía los cinco plaguicidas (ACE:  $120 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$ , DIM:  $75 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ , 2,4-D:  $78 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ , IMI:  $31 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$  y CIP:  $80 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$ ). El resto de las condiciones fueron las descritas anteriormente en la Sección 3.3.2.2. Estas concentraciones se eligieron de acuerdo con el estudio de degradación del Capítulo 2. En este estudio, la cantidad de plaguicida adsorbida por masa de las biomezclas en equilibrio ( $q_e$ ) fue calculado de igual modo que en la Ec.1, y además se calculó el porcentaje de remoción de cada plaguicida en cada biomezcla como se informa a continuación en la Ec. 3.6:

$$\text{Remoción (\%)} = \frac{(c_0 - c_e)}{c_0} 100 \quad (3.6)$$

### 3.4. Análisis estadístico

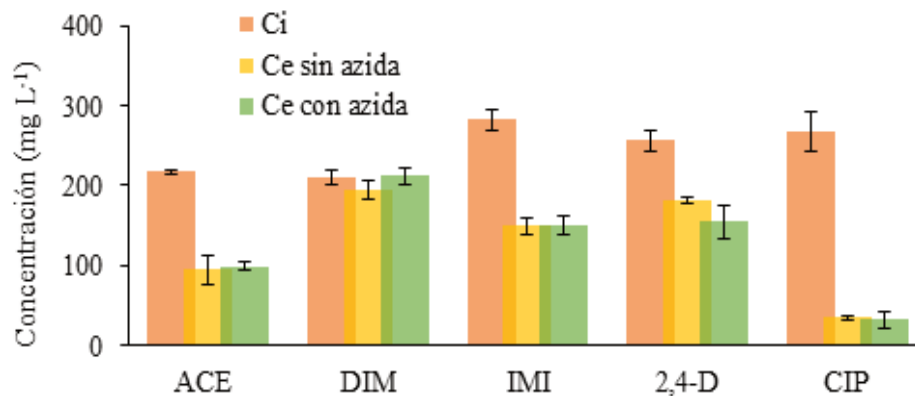
Los resultados se presentan como valores promedio de tres mediciones, junto a sus respectivas desviaciones estándar (SD). La diferencia significativa entre las medias de los grupos se analizó

aplicando la prueba t-Student para muestras independientes o pareadas con un nivel de significación del 95%, utilizando Minitab versión 19. Se aplicó la prueba de correlación de Spearman para datos no paramétricos entre los parámetros de remoción y adsorción de plaguicidas y las características de las moléculas.

### 3.5. Resultados y discusión

#### 3.5.1. Ensayos de adsorción preliminares

En la Figura 25 se presentan los resultados de los estudios preliminares realizados con soluciones de plaguicidas que contenían azida sódica como biocida. Estos revelaron que, durante los ensayos en batch, los microorganismos presentes en las biomezclas durante las 24 h de contacto no afectaron significativamente la concentración final de los plaguicidas, es decir no se obtuvieron coeficientes de variación que indicaran una diferencia significativa en comparación con la adsorción sin el biocida ( $p_{ACE}=0,62$ ;  $p_{DIM}=0,11$ ;  $p_{IMI}=0,89$ ;  $p_{2,4-D}=0,06$ ;  $p_{CIP}=0,82$ ). Por lo tanto, no se agregó biocida en los experimentos de adsorción posteriores, ya que la disminución de las concentraciones se puede adjudicar completamente al proceso de adsorción y no al de degradación biológica.



**Figura 25.** Concentración inicial (Ci) en barras naranjas y final a tiempo de equilibrio (Ce) de cada plaguicida con (barras verdes) y sin biocida (barras amarillas) para descartar la degradación microbiológica durante los estudios de adsorción. La desviación estándar (SD) de cada barra se muestra en líneas color negro.

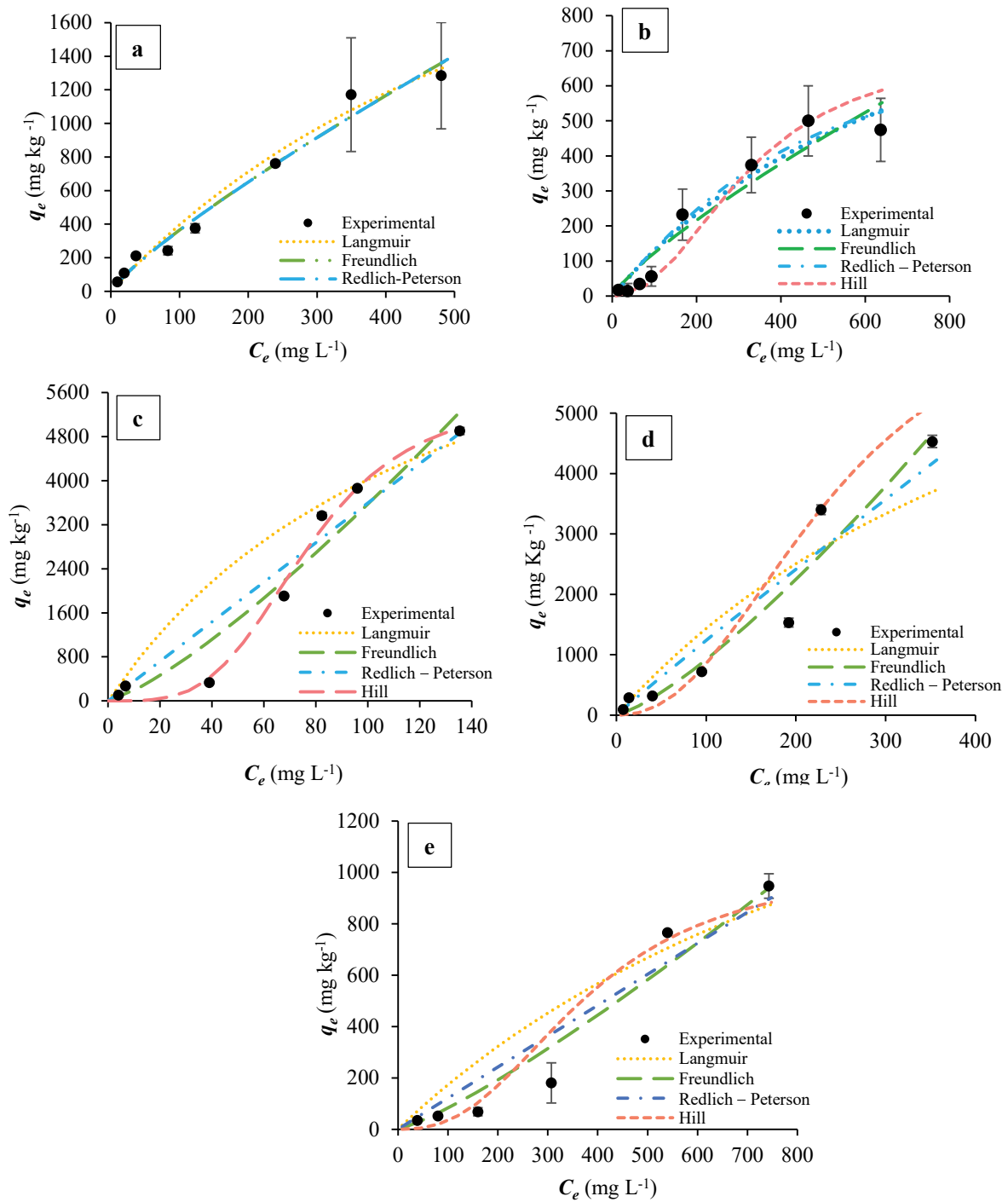
### 3.5.2. Estudios de adsorción monosoluto

El pH de las soluciones a las diferentes concentraciones iniciales de los plaguicidas fue bastante similar al inicio de los experimentos de adsorción ( $7,9\pm 0,1$ ), excepto para las soluciones de ACE que fue levemente mayor ( $8,6\pm 0,2$ ). Después de 24 h de contacto con las biomezclas, al tiempo de equilibrio, el pH de todas las soluciones de plaguicidas disminuyó significativamente a un valor similar de  $7,2\pm 0,1$  ( $p < 0,0001$ ). Considerando los  $pH_{CC}$  de SRV-C1 y SRV-C2 (ver Capítulo 1, Sección 1.5.4), que fueron solo ligeramente más bajos que el pH inicial, las superficies de estos sustratos exhibieron una leve carga neta negativa; sin embargo, en el equilibrio,  $pH < pH_{CC}$ . A estos valores de pH en la solución, solo el 2,4-D existe como anión ( $pK_a = 2,73$ ) y la adsorción podría darse por interacción electrostática. Sin embargo, y dada la cercanía de los valores de  $pH_{CC}$  de las biomezclas y de las soluciones de plaguicidas, los resultados sugieren que la adsorción no ocurriría principalmente a través de este tipo de interacción para el 2,4-D y los otros plaguicidas no ionizables. En cambio, como afirman otros autores, la adsorción de plaguicidas en el sistema acuoso está muy probablemente relacionada con el contenido de materia orgánica del adsorbente y con la polaridad y solubilidad de los mismos (Bedmar et al., 2011; Rasool et al., 2022).

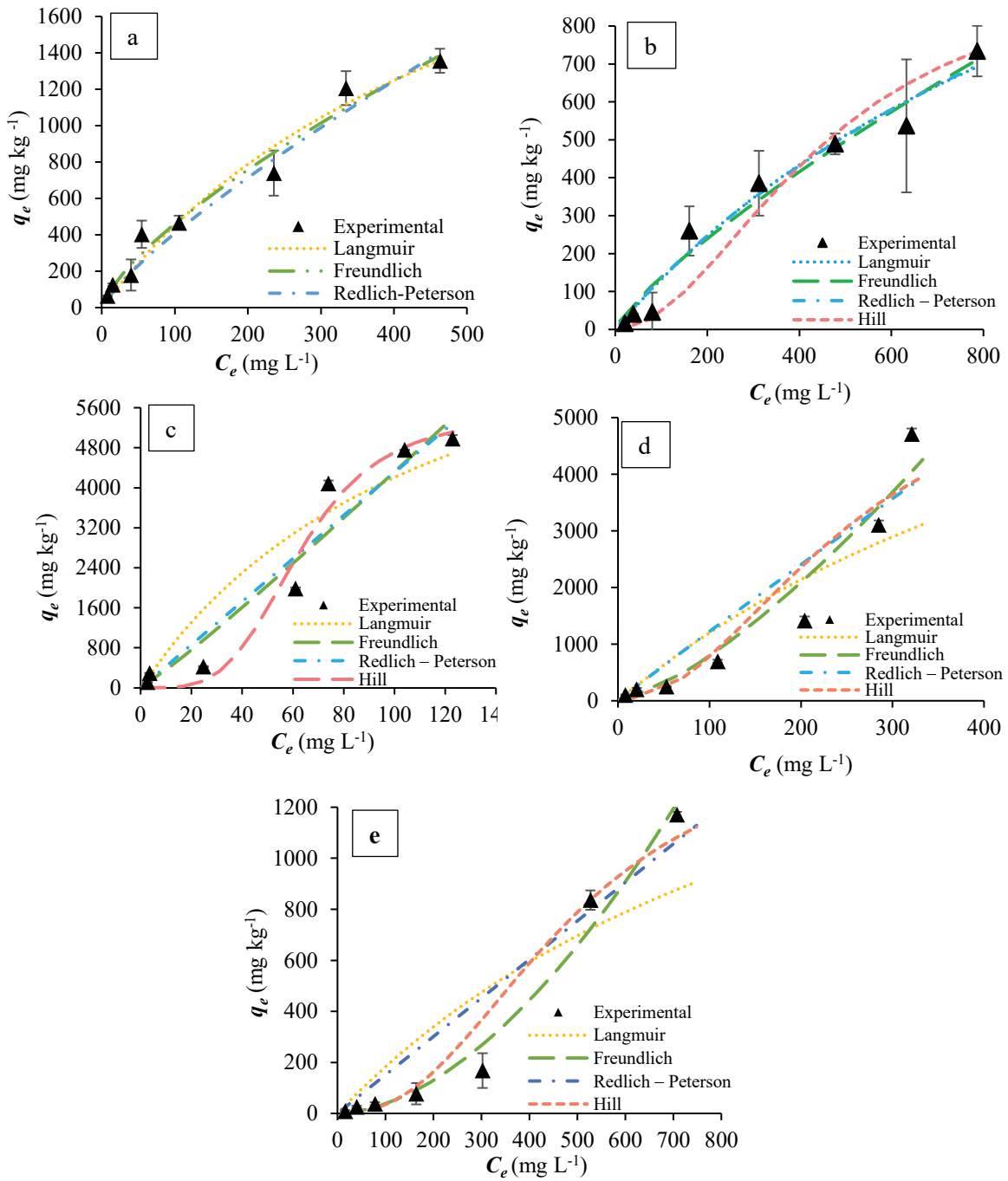
Las isotermas de adsorción obtenidas para los cinco plaguicidas en ambas biomezclas se pueden observar en la Figura 26 para SRV-C1 y en la Figura 27 para SRV-C2. En la mayoría de los casos, se obtuvieron curvas ascendentes. Estas curvas indican que una vez que se completa la adsorción en la superficie, las moléculas del plaguicida pueden atraerse entre sí formando múltiples capas y, es probable, que esta asociación se dé en gran medida a través de la interacción hidrofóbica entre ellas. Los plaguicidas no ionizables suelen presentar este tipo de isoterma (Ben Salem et al., 2019).

La mayoría de las isotermas obtenidas con la biomezcla SRV-C1 mostraron una forma sigmoide (S), con la excepción del insecticida IMI. Por otro lado, solo CIP presentó isotermas claramente en forma de S con ambas biomezclas. Como se describe en Inglezakis et al. (2018), las isotermas sigmoidales pueden ser el resultado de fenómenos opuestos: una adsorción cooperativa positiva debido a las fuerzas de atracción soluto-soluto en la superficie y también la inhibición de la adsorción debido a una reacción competitiva con la solución que muestra baja afinidad a bajas concentraciones. Esto indicaría que la adsorción se vuelve más fácil a medida que aumenta la concentración del plaguicida en la fase acuosa (Giles et al., 1960).

Además de las isotermas experimentales, como se mencionó, se aplicaron los modelos matemáticos, descritos en la Sección 3.3.2.3 del presente Capítulo. Los resultados también se muestran en las Figuras 26 y 27, y los parámetros estimados de cada uno de los modelos se presentan en las Tablas 10 y 11.



**Figura 26.** Isothermas de adsorción de a) IMI; b) DIM; c) CIP; d) ACE y e) 2,4-D en SRV-C1. Dosis de la biomezcla:  $160 \text{ g L}^{-1}$ . Los modelos se indican en líneas, mientras que los datos experimentales ● y sus respectivas barras de error se indican en color negro



**Figura 27.** Isothermas de adsorción de a) IMI; b) DIM; c) CIP; d) ACE y e) 2,4-D en SRV-C2. Dosis de la biomezcla:  $160 \text{ g L}^{-1}$ . Los modelos se indican en líneas, mientras que los datos experimentales  $\blacktriangle$  y sus respectivas barras de error se indican en color negro).

**Tabla 10.** Parámetros estimados a partir de la aplicación de los modelos a la adsorción de IMI, DIM, CIP, ACE y 2,4-D sobre la biomezcla SRV-C1.

SRV-C1	Parámetros de los modelos	IMI	DIM	CIP	ACE	2,4-D
Langmuir	$Q_L$ (mg kg <sup>-1</sup> )	3452	1232	9376	9874	2338
	$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	0,001	0,001	0,008	0,002	0,0008
	$r^2$	0,978	0,944	0,787	0,866	0,835
Freundlich	$K_F$ (mg kg <sup>-1</sup> ) (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>1/n<sub>F</sub></sup>	7,7	3,0	10,3	2,4	0,3
	$1/n_F$	0,8	0,8	1,3	1,3	1,2
	$r^2$	0,979	0,923	0,942	0,945	0,948
Redlich-Peterson	$K_R$ (L kg <sup>-1</sup> )	132	1,4	36,0	18,3	1,4
	$n_R$	0,2	1,5	0,05	0,1	0,01
	$\alpha_R$ (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>n<sub>R</sub></sup>	16,4	0,0001	0,003	0,30	0,15
	$r^2$	0,979	0,954	0,924	0,920	0,916
Hill	$Q_H$ (mg kg <sup>-1</sup> )		520	5950	7394	1460
	$n_H$		2,2	2,9	2,2	1,9
	$K_D$ (L mg <sup>-1</sup> )		98670	260200	305450	166500
	$r^2$		0,986	0,981	0,945	0,954

**Tabla 11.** Parámetros estimados a partir de la aplicación de los modelos a la adsorción de IMI, DIM, CIP, ACE y 2,4-D sobre la biomezcla SRV-C2.

SRV-C2	Parámetros de los modelos	IMI	DIM	CIP	ACE	2,4-D
Langmuir	$Q_L$ (mg kg <sup>-1</sup> )	3014	1792	9390	9790	2335
	$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	0,002	0,001	0,008	0,001	0,001
	$r^2$	0,970	0,972	0,889	0,786	0,816
Freundlich	$K_F$ (mg kg <sup>-1</sup> ) (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>1/n<sub>F</sub></sup>	16,9	3,6	30,0	1,3	0,01
	$1/n_F$	0,7	0,8	1,1	1,4	1,8
	$r^2$	0,976	0,968	0,938	0,939	0,981
Redlich-Peterson	$K_R$ (L kg <sup>-1</sup> )	184	1,5	70,3	14,9	2,0
	$n_R$	0,2	0,8	0,0008	0,1	0,003
	$\alpha_R$ (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>n<sub>R</sub></sup>	17,5	0,003	0,63	0,12	0,30
	$r^2$	0,970	0,972	0,937	0,865	0,901
Hill	$Q_H$ (mg kg <sup>-1</sup> )		1409	6190	7129	1716
	$n_H$		1,1	3,1	2,0	2,0
	$K_D$ (L mg <sup>-1</sup> )		1516	509500	104566	366421
	$r^2$		0,965	0,967	0,910	0,950

En cuanto a la adsorción de IMI en SRV-C1 y SRV-C2 (Fig. 26-a y 27-a), se puede observar que todos los modelos se ajustaron bien a ambas isothermas con un  $r^2$  elevado ( $\geq 0,97$ ). La capacidad máxima de adsorción IMI estimada por el modelo de Langmuir ( $Q_L$ ) fue bastante similar entre las biomezclas, pero notablemente mucho más alta en este estudio con respecto a otras biomezclas reportadas por autores como Mandal & Singh (2016) que informaron un  $Q_L$  ocho veces menor empleando corteza de eucalipto, o Kumari et al. (2019) con una capacidad máxima de adsorción de 333 mg kg<sup>-1</sup> en una biomezcla compuesta de paja de arroz/compost. Fernández-Bayo et al. (2007) encontraron también que la adición de vermicompost aumentó en gran medida la capacidad de adsorción de IMI en suelos enmendados y sugirió que aparentemente estaba relacionado con el contenido de lignina remanente, derivado de los residuos lignocelulósicos vermicompostados; en nuestro caso, esto se podría atribuir a la presencia del aserrín de eucalipto y del rastrojo de trigo añadido. Aunque la afinidad fue baja (valores bajos de  $K_L$ ), la adsorción fue favorable según el parámetro  $0 < 1/n_F < 1$  del modelo de Freundlich y el factor de separación de Langmuir,  $R_L$  (0,45 y 0,37, respectivamente), definido como  $R_L = 1/(1 + K_L C_0)$ . Esta constante adimensional es parámetro de equilibrio que se utiliza para predecir la factibilidad y eficiencia de la adsorción. Los valores de  $R_L$  entre 0 y 1 indican una adsorción favorable, mientras que valores de esta constante cercanos o mayores a la unidad o iguales a 0 son indicativos de una adsorción desfavorable, linear e irreversible (Saadi et al., 2015). A pesar de que los  $Q_L$  fueron similares, el valor de  $K_F$  para SRV-C2 fue el doble que el de SRV-C1, lo que sugiere una mayor capacidad de adsorción a bajas concentraciones. También se aplicó el modelo de Redlich-Peterson de tres parámetros, que, si bien mostró una buena correlación con los datos experimentales, el ajuste no fue necesariamente mejor en comparación a los modelos de dos parámetros. Sin embargo, cabe destacar que el valor del parámetro  $a_R$  para IMI fue mucho mayor que para el resto de los plaguicidas (16,4 y 17,5 (L mg<sup>-1</sup>)<sup>n<sub>R</sub></sup> para SRV-C1 y SRV-C2, respectivamente). Tanto  $a_R$  como  $K_R$  fueron  $\gg 1$ , lo que sugeriría un mayor acercamiento al modelo de Freundlich, como lo confirma la similitud de los valores de  $K_F$  y  $F_R/a_R$  (Tran et al., 2023). El modelo de Hill no se aplicó en los datos experimentales obtenidos para este insecticida, dado que es empleado específicamente para isothermas con forma de S.

El DIM, en cambio, fue el insecticida menos adsorbido por ambas biomezclas, evidenciado en los parámetros  $Q_L$  y  $Q_H$ , con valores varias veces menor que la capacidad máxima de adsorción estimada para, por ejemplo, ACE. Este resultado puede relacionarse con las características de su molécula: no contiene anillos aromáticos en su estructura química y tiene un alto carácter polar (con un  $\log K_{ow} = 0,75$ ) y la mayor solubilidad en agua respecto a las cinco moléculas estudiadas (25 g L<sup>-1</sup>); por lo tanto, lo más probable es que el DIM se haya distribuido principalmente en la fase acuosa (Delgado-Moreno et al., 2017a). Aun así, la adsorción fue favorable, tal como lo demuestran los valores de  $1/n_F$  y el factor de separación  $R_L$  (0,45 para SRV-C1 y 0,58 para SRV-C2). DIM mostró

una mayor capacidad de adsorción en SRV-C2. Esto se confirma gráficamente y por los valores de  $Q_L$  y  $Q_H$  ( $r^2 > 0,94-0,98$ ) estimados por los modelos aplicados. Para SRV-C1, el mejor ajuste se obtuvo aplicando el modelo de Hill ( $r^2 > 0,98$ ), que asume un fenómeno de adsorción cooperativa. Los valores de  $n_H > 1$  indican una cooperatividad positiva. En las Tablas 10 y 11 se puede ver que  $n_H$  para SRV-C1 fue el doble que para SRV-C2, lo que significa un fenómeno más pronunciado con respecto a la otra biomezcla, que también se puede ver plasmado en la forma de las isothermas (Fig. 26-b y 27- b), mientras que  $n_H$  para SRV-C2 fue el más cercano a 1, lo que sugiere que casi no hay fenómeno de cooperatividad. Otros autores han obtenido también isothermas sigmoides para DIM en suelos agrícolas con baja MO (Rani & Sud Sant, 2014; Vagi et al., 2010) y en suelos tropicales con contenido similar de MO (Alfonso et al., 2017).

Las Fig. 26 y 27 también reflejaron claramente que ambas biomezclas tuvieron una mayor capacidad de adsorción para ACE y CIP, a pesar de que éstos posean un tamaño molecular mayor que el resto de los plaguicidas estudiados. Estos dos plaguicidas son más hidrófobos ya que poseen un  $\log K_{ow}$  más alto (4,1 y 6,9, respectivamente) (Albaseer et al., 2010). Su menor polaridad en comparación con los otros plaguicidas les permite formar interacciones hidrofóbicas más fácilmente con la MO, en lugar de permanecer en la fase acuosa, mejorando su adsorción a las biomezclas. De acuerdo con Bahi et al. (2023), los plaguicidas de baja solubilidad e hidrófobos ( $\log K_{ow} > 3$ ) tienen más probabilidades de ser adsorbidos, como se observó con estos dos plaguicidas. El modelo de Langmuir tuvo un desempeño deficiente para describir las isothermas ACE y CIP ( $r^2 < 0,79-0,89$ ), sobreestimando las capacidades de adsorción. En cambio, los modelos de Freundlich y Hill describieron mejor los datos experimentales, lo cual permite sostener la presencia de adsorción física multicapa. Los valores de  $1/nF$  obtenidos para ambos plaguicidas en ambas biomezclas fueron  $> 1$ , lo que suele ser indicativo de isothermas de tipo S. La baja afinidad inicial de estos compuestos orgánicos no polares se revierte tan pronto como la superficie de las biomezclas se cubre con una monocapa de sus moléculas (sección media de la isoterma) y se produce una adsorción monocapa-multicapa (Inglezakis et al., 2018). Esto fue particularmente evidente para la adsorción CIP, lo cual no solo puede evidenciarse en las Fig. 26 -c y 27-c, sino también del mejor ajuste proporcionado por el modelo de Hill ( $r^2 > 0,97$ ). Ambas biomezclas tuvieron valores de  $nH$  más altos para CIP que para los otros plaguicidas, por lo tanto, por el fenómeno de cooperatividad, la presencia de moléculas adsorbidas aumentó la posibilidad de que otras moléculas se adsorbieran aún más.

Ringot et al. (2007) define la constante de disociación por sitio  $K_d$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ), como la concentración de plaguicida a la mitad de la saturación, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$K_d = \sqrt[n_H]{K_D} \quad (7)$$

Los valores de  $K_d$  calculados para CIP fueron los más bajos, 74 y 69 para SRV-C1 y SRV-C2, respectivamente (esto se puede observar también en las Fig. 26-c y 27-c). Estas biomezclas también mostraron una muy buena capacidad de adsorción de este insecticida, con el mayor valor de  $K_F$ . Todo esto sugiere una alta capacidad de adsorción a baja concentración y una alta cooperatividad a altas concentraciones de CIP. En otro estudio, Al-Smadi et al. (2019) reportaron un  $Q_L$  similar (8881-9083 mg kg<sup>-1</sup>) para diferentes suelos con bajo contenido de MO (~2%). Por el contrario, Domingues et al. (2007) informaron un  $Q_L$  (300 mg kg<sup>-1</sup>) casi veinte veces menor, empleando corcho granulado como adsorbente, en comparación con el  $Q_H$  estimado para las biomezclas estudiadas en este trabajo. Cabe destacar que las bajas capacidades de adsorción reportadas por otros autores podrían estar influenciadas por el hecho de que la mayoría de los estudios sobre adsorción de estos plaguicidas han utilizado concentraciones iniciales mucho más bajas para obtener sus isothermas, entonces las capacidades máximas de adsorción podrían haber sido subestimadas.

ACE presentó los valores más altos de  $Q_H$ , reflejando inicialmente el mejor rendimiento para la adsorción a las biomezclas. Aunque el  $K_F$  fue mayor para SRV-C1 que para SRV-C2, y aunque ACE fue el plaguicida con la mayor capacidad de adsorción estimada, los valores de  $K_F$  fueron más bajos que para otros plaguicidas. El  $1/nF$  mayor que la unidad indica también que no fue un proceso muy favorable al comienzo de la curva. Esto también se observa a partir del coeficiente de distribución calculado. Los valores de  $K_d$  fueron de 311-323 L mg<sup>-1</sup>, muy superiores a los reportados para la CIP, lo que indica que la ACE tuvo menor capacidad inicial para formar la monocapa que el insecticida. Sin embargo, en ambas biomezclas, el coeficiente  $nH$  fue mayor que la unidad, lo que demuestra que hubo una cooperatividad positiva en la unión. Esto también se observa en las Fig. 26-d y 27-d, con el incremento abrupto de  $q_e$  frente a valores elevados de  $C_e$ . Otros autores también han obtenido isothermas de forma sigmoideal para ACE (Kholodov et al., 2005). Estos autores sostienen que el aumento exponencial es el resultado del mecanismo de adsorción hidrofóbico, donde la fuerza de interacción entre las moléculas de ACE adsorbidas es más fuerte que la que existe entre las moléculas de herbicida disueltas y la biomezcla, promoviendo la formación de grupos y cadenas de moléculas de ACE en la superficie.

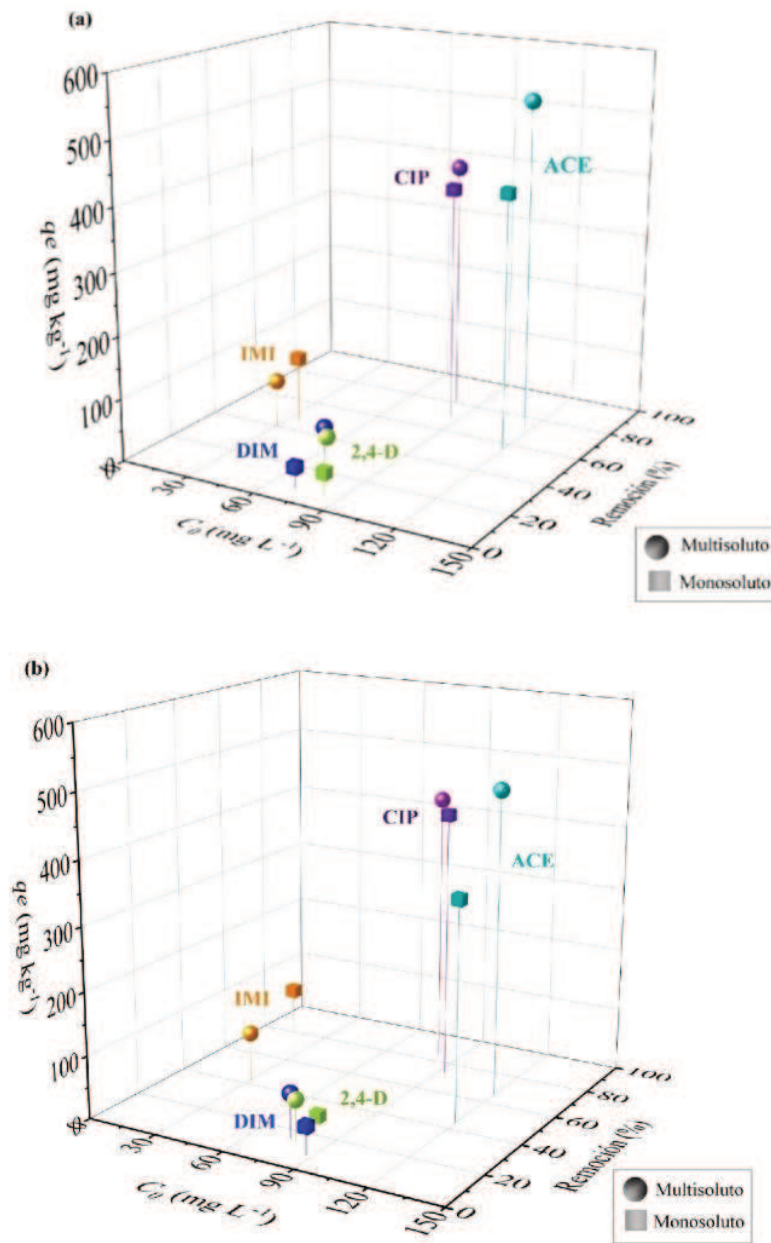
Para el herbicida 2,4-D, los modelos que mejor describieron las isothermas experimentales fueron el de Freundlich y Hill. El 2,4-D fue el segundo plaguicida menos adsorbido, después del DIM, como se observa en sus valores de  $Q_H$  en ambas biomezclas. Al igual que DIM, las moléculas de 2,4-D son altamente solubles en agua y, aunque tiene una hidrofiliidad intermedia (log  $K_{ow}$ = 2,8), las moléculas cargadas al pH de trabajo también pueden haber reducido su afinidad de adsorción a través de la repulsión electrostática mutua adsorbato-adsorbato (Sathishkumar et al., 2009).

Como se indicó al principio de la Sección, debido a los valores similares del pH de las soluciones y el  $pH_{cc}$ , las cargas positivas y negativas coexisten en la superficie de las biomezclas y las moléculas de 2,4-D pueden experimentar cierta repulsión. Se informó baja afinidad por 2,4-D también con otras biomezclas (Fernandez et al., 2022). Las Fig. 26-e y 27- e muestran que los valores experimentales de  $q_e$  para este herbicida se mantuvieron bajos para valores altos de  $C_e$ , en comparación con los otros plaguicidas, mostrando una menor capacidad de adsorción. Esto está respaldado por los valores más bajos de  $K_F$  entre los plaguicidas y también por las constantes de disociación más altas por sitio,  $K_d$  (560 y 605 mg L<sup>-1</sup> para SRV-C1 y SRV-C2, respectivamente). Se puede observar que  $1/nF$  también fue  $> 1$  y, además, este parámetro de heterogeneidad fue el más alto de todos en SRV-C2. De acuerdo con el parámetro  $n_H$ , la cooperatividad fue similar entre las biomezclas.

### 3.5.3. Estudios de adsorción multisoluto

Las Fig. 28-a y 28-b presentan gráficos de tres ejes que ilustran los resultados de los experimentos de adsorción multisoluto, donde se ensayó una solución que contenía los cinco plaguicidas en contacto con cada una de las dos biomezclas. En dichos gráficos se presentan las variables: Remoción (%),  $q_e$  (mg kg<sup>-1</sup>) y  $C_0$  (mg L<sup>-1</sup>). Los valores obtenidos en este ensayo se compararon con los resultados obtenidos en la Sección anterior 3.5.2, correspondiente al estudio individual de cada plaguicida (ensayos monosoluto) a las concentraciones iniciales  $C_0$  correspondientes. Excepto para el IMI, los otros cuatro plaguicidas estudiados mostraron porcentajes más altos de eliminación cuando se encontraron en el sistema multisoluto; este fenómeno también se vio reflejado en los valores de  $q_e$ .

Luego de comparar el porcentaje de remoción en ambas biomezclas, el sistema multisoluto demostró una mayor eficacia para eliminar el ACE respecto a cuando se estudió a partir de la solución monosoluto (22 y 52% más alto para SRV-C1 y SRV-C2, respectivamente). Se observó una tendencia similar para la CIP (14-16% más alto) y, aunque la remoción general fue baja, la remoción del DIM aumentó un 120% en SRV-C1 y un 80% en SRV-C2 en la solución multisoluto. Esto sugiere que podría existir un efecto sinérgico en la adsorción de estos tres plaguicidas. Por el contrario, el IMI se removió mejor en las biomezclas cuando se encontraba como soluto único (SRV-C1= 13 y SRV-C2= 28% más alto) que cuando se estudió en la solución multisoluto, exhibiendo un efecto antagonista cuando el resto de los plaguicidas están presentes. Finalmente, la eliminación de 2,4-D en multisoluto fue la más baja de todas, pero dos veces mayor en SRV-C1, mientras que en SRV-C2, la efectividad de la remoción no se modificó por la presencia de los otros plaguicidas. Además, la Fig. 28 muestra claramente que la efectividad de adsorción de ACE y CIP fue mayor que el resto, como se ve también en las isothermas monosoluto de la Sección anterior.



**Figura 28.** Adsorción multisoluto ● y monosoluto ■ de los plaguicidas acetoclor, 2,4-D, imidacloprid, dimetoato y cipermetrina en a) SRV-C1 y b) SRV-C2. Dosis de biomezcla: 160 g L<sup>-1</sup>.

Al comparar ahora el rendimiento de las dos biomezclas en la adsorción de cada plaguicida a partir de la solución multisoluto, no hubo diferencias significativas entre SRV-C1 y SRV-C2. Sin embargo, y como también se observó para las isotermas de adsorción en la Sección 3.5.2, sí se encontraron diferencias para los plaguicidas a partir de las soluciones monosoluto. La cantidad de los plaguicidas DIM, IMI, 2,4-D y CIP adsorbidos en equilibrio,  $q_e$ , fue mayor para SRV-C2 (45, 126,

51 y 381 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) que para SRV-C1 (34, 109, 38 y 428 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Por el contrario, solo el ACE se adsorbió más en SRV-C1 (411 mg kg<sup>-1</sup>) que en SRV-C2 (347 mg kg<sup>-1</sup>). Aunque muchos autores han mencionado la MO como un factor clave en la adsorción de plaguicidas, la misma no difirió significativamente entre estas dos biomezclas. Otras características o componentes del sustrato pueden haber influido en este proceso, tal como fue observado por otros autores (Karanasios, et al., 2010; Rodríguez-Liébana et al., 2011). El tipo de arcilla mineral también es un factor dominante, por ejemplo, en la degradación del IMI, tal como menciona Uthman et al. (2024). Esto puede explicar la elevada capacidad de este plaguicida de adsorberse y su limitada degradación, a pesar de que se utilizó a dosis bajas en el ensayo de degradación. Al igual que en el proceso de adsorción de un solo soluto, las características físicas y químicas de los adsorbentes y adsorbatos desempeñan un papel importante en la adsorción competitiva (Amrutha et al., 2023). Una posibilidad es que estas interacciones podrían haber equilibrado el rendimiento general de adsorción de ambas biomezclas cuando los cinco plaguicidas estaban presentes.

#### **3.5.4. Correlación entre la adsorción y degradación de los plaguicidas**

La identificación de relaciones entre la adsorción de plaguicidas en las biomezclas de los SBP y su eficiencia para degradarlos es fundamental porque permite comprender cómo el comportamiento fisicoquímico de los compuestos influye en el desempeño del sistema. Establecer estas correlaciones ayuda a explicar el papel de la adsorción en la retención y disponibilidad de los plaguicidas para su posterior biodegradación, y abre la posibilidad de usar los parámetros de adsorción como herramientas predictivas para optimizar el funcionamiento de estos sistemas.

Aunque algunos autores encontraron una conexión entre la adsorción y la degradación de los plaguicidas, la cuantificación de esta relación ha sido poco explorada. Se ha explorado más la relación entre las propiedades biológicas de las biomezclas y su rendimiento en la disipación de los plaguicidas (Lizano-Fallas et al., 2017; Romero et al., 2019). Omirou et al. (2012) encontraron una correlación significativa entre las velocidades de disipación estimadas por el modelo SFO para seis plaguicidas (incluida la CIP) y la respiración microbiana para biomezclas; sin embargo, no encontraron ninguna cuando se estudió con el suelo. Feng et al. (2023) aplicaron la correlación de Pearson a la degradación del ACE y la comunidad microbiana para identificar qué bacterias/hongos pueden haber contribuido a su degradación. En contraste, Cai et al. (2007) no encontraron ninguna correlación aparente entre la actividad microbiana del suelo (a través de la actividad deshidrogenasa) y la degradación del ACE. Amin et al. (2021) también buscó correlaciones entre la concentración de plaguicidas y las propiedades fisicoquímicas del suelo, encontrando una débil correlación positiva con la MO (0,38), y Góngora-Echeverría et al. (2017) analizaron el pH, la MO, el contenido de lignina y otros

parámetros fisicoquímicos y encontraron que, aunque existían algunas correlaciones entre ellos, eran muy débiles al contrastar las mismas con las concentraciones remanentes de los plaguicidas.

Con relación a la conexión con la adsorción, mientras que Karanasios et al. (2010) encontraron una relación positiva entre el parámetro de adsorción  $K_F$  y las velocidades de degradación de plaguicidas solo en algunas biomezclas, Papazlatani et al. (2019) no pudieron encontrar una correlación significativa entre la adsorción ( $K_F$ ) y la degradación ( $DT_{50}$ ) de otros plaguicidas en el suelo y una biomezcla de suelo, sustrato de hongos agotado y paja.

En este trabajo, se investigó la relación adsorción-degradación para prever la eficiencia de las biomezclas en camas biológicas. Las relaciones entre los parámetros de los modelos de adsorción y degradación y algunas características de las moléculas de los plaguicidas se analizaron mediante la prueba de correlación de Spearman., una prueba estadística no paramétrica que examina la relación entre dos variables, así como la fuerza y sentido de ésta. El coeficiente que se obtiene posee valores que varían entre -1 y 1. En la Tabla 12 se muestran los resultados correspondientes a los parámetros de los modelos con los mejores ajustes. Como se esperaba,  $DT_{50}$  se correlacionó de manera equivalente con la constante de tasa de degradación  $k$  de los otros parámetros. Solo se hallaron tres correlaciones significativas. El parámetro  $K_F$  del modelo de adsorción de Freundlich se correlacionó de forma significativa negativamente con el valor de  $k$  de cinética de degradación del modelo SFO ( $p=0,0002$ ) y, como se esperaba, también lo hizo con el  $DT_{50}$  ( $p=0,0002$ ). Curiosamente, la capacidad máxima de adsorción  $q_{max}$ , estimada por los modelos de Langmuir/Hill, no pronosticó la disipación de plaguicidas en las biomezclas de manera efectiva; sin embargo, dio una fuerte correlación negativa con la solubilidad de los plaguicidas ( $p=0,0006$ ) y una buena correlación positiva con  $\log K_{ow}$ , aunque no fue estadísticamente significativa ( $p=0,072$ ). El gráfico de matriz para las correlaciones de Spearman, así como las correlaciones por pares se pueden observar en la Tabla 13. Se aplicó un análisis de regresión no lineal para encontrar una correlación numérica entre la constante  $k$  en función de  $K_F$ . La ecuación obtenida fue  $k = 0,112 K_F^{-0,385}$  ( $r^2 = 0,824$ ).

**Tabla 12.** Correlaciones de Spearman para los parámetros  $k$  y  $DT_{50}$  del modelo cinético de SFO (primer orden), parámetros relevantes de los modelos de adsorción ( $K_F$  y  $q_{max}$ ) y características de las moléculas de los plaguicidas ( $\log K_{ow}$  y solubilidad).

	<b>k</b>	<b>DT<sub>50</sub></b>	<b>K<sub>F</sub></b>	<b>q<sub>max</sub></b>	<b>log K<sub>ow</sub></b>
DT <sub>50</sub>	-0,997				
K <sub>F</sub>	-0,915	0,912			
q <sub>max</sub>	-0,042	0,049	0,176		
log K <sub>ow</sub>	0,369	-0,370	0,000	0,591	
Solubilidad	0,197	-0,198	-0,443	-0,886	-0,700

**Tabla 13.** Correlaciones de Spearman por pares entre la capacidad de adsorción (Langmuir / Freundlich / Hill), los parámetros de degradación del modelo SFO y la polaridad y solubilidad de las moléculas de plaguicidas (salida de Minitab)

<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Correlación</b>	<b>95% CI para <math>\rho</math></b>	<b>Valor-p</b>
DT <sub>50</sub>	k	-0,997	(-1,000; -0,982)	0,0000
K <sub>F</sub>	k	-0,915	(-0,985; -0,589)	0,0002
q <sub>max</sub>	k	-0,042	(-0,655; 0,604)	0,9074
log K <sub>ow</sub>	k	0,369	(-0,361; 0,819)	0,2936
Solubilidad	k	0,197	(-0,499; 0,739)	0,5855
K <sub>F</sub>	DT <sub>50</sub>	0,912	(0,576; 0,984)	0,0002
q <sub>max</sub>	DT <sub>50</sub>	0,049	(-0,600; 0,658)	0,8939
log K <sub>ow</sub>	DT <sub>50</sub>	-0,370	(-0,819; 0,360)	0,2921
Solubilidad	DT <sub>50</sub>	-0,198	(-0,739; 0,499)	0,5843
q <sub>max</sub>	K <sub>F</sub>	0,176	(-0,515; 0,728)	0,6272
log K <sub>ow</sub>	K <sub>F</sub>	0,000	(-0,630; 0,630)	1,0000
Solubilidad	K <sub>F</sub>	-0,443	(-0,849; 0,291)	0,1996
log Kow	q <sub>max</sub>	0,591	(-0,123; 0,902)	0,0721
Solubilidad	q <sub>max</sub>	-0,886	(-0,979; -0,485)	0,0006
Solubilidad	log K <sub>ow</sub>	-0,700	(-0,935; -0,041)	0,0242

La tendencia decreciente en las vidas medias de disipación (IMI > CIP > DIM > ACE > 2,4-D) se alineó estrechamente con las capacidades de adsorción relativas estimadas por el  $K_F$  del modelo de Freundlich (CIP > IMI > DIM > ACE > 2,4-D), lo que sugiere que cuanto mayor es la adsorción de plaguicidas en la biomezcla a bajas concentraciones, más lenta es su disipación. Por el contrario,

DT<sub>50</sub> no se alineó con las capacidades máximas de adsorción estimadas por los modelos Langmuir/Hill (ACE > CIP > IMI > 2,4-D > DIM), excepto para la CIP. Como se sugiere a menudo, los plaguicidas adsorbidos son menos accesibles para los microorganismos, lo que limita su transporte y reduce su degradación, pero puede mejorar la degradación no biológica (Rasool et al., 2022). Sin embargo, Luzzi et al. (2024) argumentan que la adsorción de un compuesto no siempre es proporcional a una disminución en su degradación, ya que las bacterias aún pueden acceder y degradar el plaguicida adsorbido sobre superficies sólidas.

### 3.6. Conclusión

En este Capítulo se pudo observar que la mayoría de las isotermas de adsorción mostraron curvas ascendentes y de forma sigmoidea, revelando un efecto dual cooperativo e inhibitorio, principalmente influido por la polaridad y la solubilidad de cada plaguicida. Los mejores ajustes se obtuvieron con los modelos de Freundlich y de Hill, sobre todo en los casos en que ocurrió adsorción cooperativa.

Los mayores valores de capacidad máxima de adsorción en monosoluto fueron observados para el ACE y la CIP, en ambas biomezclas estudiadas, a pesar de su elevada masa molecular, respecto a los otros plaguicidas. Mientras que los menores valores se presentaron en la adsorción del DIM, posiblemente por su alta polaridad y solubilidad. La capacidad máxima de adsorción de ACE fue 4 veces mayor que la del 2,4-D. Los mayores valores de  $q_e$  se exhibieron en SRV-C2 para todos los plaguicidas, excepto para el ACE, que fue mejor en SRV-C1.

Este Capítulo resulta relevante, además, en el sentido de que existe una necesidad de entender sinergias y antagonismos entre los plaguicidas cuando se presentan todos juntos en una mezcla dentro de los SBP; esta es la forma en que generalmente ocurren en un tratamiento real. Específicamente en este estudio, se evidenciaron efectos sinérgicos interesantes para la adsorción de tres plaguicidas (ACE, CIP y DIM) cuando todos estaban presentes en la solución y solo el IMI mostró una pequeña disminución (efecto antagonista) en la efectividad de la remoción a partir de la solución multisoluto. La remoción del 2,4-D no se vio afectada por la presencia del resto de los plaguicidas.

Predecir la eficacia de una biomezcla es complejo debido a las variadas características de los plaguicidas que se pretenden degradar. En un esfuerzo por identificar un posible enfoque, se demostró que la capacidad máxima de adsorción de los plaguicidas sobre las biomezclas no podía predecir las tasas de degradación, pero sí que esta capacidad se correlacionaba bien con dos características moleculares de los plaguicidas (hidrofilicidad y solubilidad). En particular, la fuerte correlación negativa entre la constante cinética  $k$  y el  $K_F$ , según lo estimado a partir del modelo de adsorción de Freundlich, proporciona una valiosa información para comprender el vínculo entre la adsorción y la

degradación, incluso cuando la biomezcla trata múltiples plaguicidas de diferentes características. También es destacable la alta correlación negativa hallada entre la capacidad máxima de adsorción del modelo de Langmuir con la solubilidad de los plaguicidas. Los conocimientos obtenidos al modelar y comparar el proceso de adsorción de estos plaguicidas y su degradación contribuyen a la hora de diseñar SBP más efectivos para manejar este tipo de contaminantes.

## 4. Incorporación de oligoquetos terrestres en las camas biológicas

### 4.1. Introducción

Las lombrices a través sus acciones biológicas, químicas y físicas pueden ser empleadas en estrategias de biorremediación para promover la biodegradación de contaminantes orgánicos. Se ha demostrado que airean y favorecen la mezcla de componentes de los sustratos y modifican la dinámica de la materia orgánica, variables que se sabe que limitan la biorremediación. También se ha demostrado que su acción puede retardar la unión de contaminantes orgánicos a la matriz sólida, o liberar contaminantes previamente ligados al sustrato para su posterior degradación, a la vez que promueven y dispersan microorganismos que degradan contaminantes orgánicos (Hickman & Reid, 2008). Autores como Grasserová et al. (2020) y Shi et al. (2018) también definen la tecnología de la biorremediación basada en lombrices como aquella que aprovecha su ciclo de vida (alimentación, excavación, metabolismo, secreción) o su interacción con otros factores abióticos y bióticos para acumular, transformar o degradar contaminantes en diferentes sustratos y efluentes.

Las especies de lombrices, como *E. fetida*, pueden ser capaces de eliminar altas concentraciones de plaguicidas cuando el sustrato posee materiales orgánicos, ya que el hábitat natural de *E. fetida* es la materia orgánica. Esta capacidad favorecería su crecimiento y reproducción en sustratos formados por suelo y residuos orgánicos, como las biomezclas (Lescano et al., 2020; Tejada & Masciandaro, 2011). Es por ello por lo que en este Capítulo se estudió la capacidad de biorremediación de las lombrices en la biomezcla de referencia (suelo y rastrojo) y en la biomezcla que contenía vermicompost basado en lodos cloacales (suelo, rastrojo y vermicompost). Se seleccionó la biomezcla SRV-C2 por sobre SRV-C1 para aprovechar que incluía la transformación de un residuo más (lodos), conservando características físicoquímicas y microbiológicas similares. Asimismo, esta biomezcla exhibió mayores valores de  $q_e$  para la mayoría de los plaguicidas, indicando mayores concentraciones de los mismos en la matriz sólida. Como la capacidad degradativa de SRV-C2 fue levemente menor a SRV-C1, se evaluó entonces la posibilidad de una mejoría de la misma al incorporar la actividad de las lombrices.

Es importante mencionar que, durante la exposición a los plaguicidas, las lombrices pueden experimentar daños subletales de tipo físico, tales como ruptura de la cutícula, pérdida de coloración, desaparición del clitelo, adelgazamiento y estrangulamientos, formación de ampollas o llagas, e incluso autólisis de la parte posterior del cuerpo. Asimismo, pueden presentarse alteraciones neurológicas, como el bloqueo de canales o receptores, la disrupción neural y la inhibición o sobreestimulación de enzimas asociadas al estrés oxidativo, entre otros efectos (Migliani & Bisht, 2020). Además de las funciones mencionadas sobre biorremediación, las lombrices actúan como

bioindicadores, ya que poseen biomarcadores capaces de emitir señales de alerta temprana sobre efectos biológicos relevantes, como los daños subletales descritos. Esto se debe a que las respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas suelen anteceder a los cambios observables en niveles más altos de organización biológica (Velki & Hackenberger, 2013).

## **4.2. Objetivos**

En este Cuarto Capítulo se buscó evaluar la efectividad del proceso de vermirremediación, a través de la incorporación de lombrices a dos de las biomezclas diseñadas: una de referencia y otra formulada con vermicompost (Capítulo 1), con el propósito de potenciar la capacidad degradativa de las biomezclas sobre los plaguicidas seleccionados (Capítulo 2), con los cuales fueron fumigadas.

Asimismo, una vez ingresadas las lombrices, se buscó monitorear periódicamente el estado fisiológico de las lombrices, a partir de biomarcadores enzimáticos y registros fotográficos de su evolución física para determinar un índice de lesión. En paralelo, se procedió a evaluar la actividad microbiana, fitotoxicidad y otros parámetros relevantes de las biomezclas, antes y durante la actividad de las lombrices.

## **4.3. Materiales y métodos**

### **4.3.1. Diseño experimental**

Para este nuevo ensayo de degradación se conservaron las condiciones experimentales establecidas en el Capítulo 2, con la diferencia de que, en este caso y como se mencionó previamente, solo se estudiaron las biomezclas compuestas por rastrojo de trigo y suelo agrícola (SR) y rastrojo de trigo, suelo agrícola y vermicompost con lodos cloacales (SRV-C2). Se dispuso en cajas de vidrio  $1,8 \pm 0,2$  kg de cada biomezcla (base seca) y se las maduraron por 30 días con humedad controlada; el ensayo se realizó por triplicado (Fig. 29). Luego, las biomezclas se fumigaron con la solución acuosa de plaguicidas correspondiente (concentraciones iniciales en las biomezclas:  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  2,4-D, CIP y DIM,  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  IMI y  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  ACE).

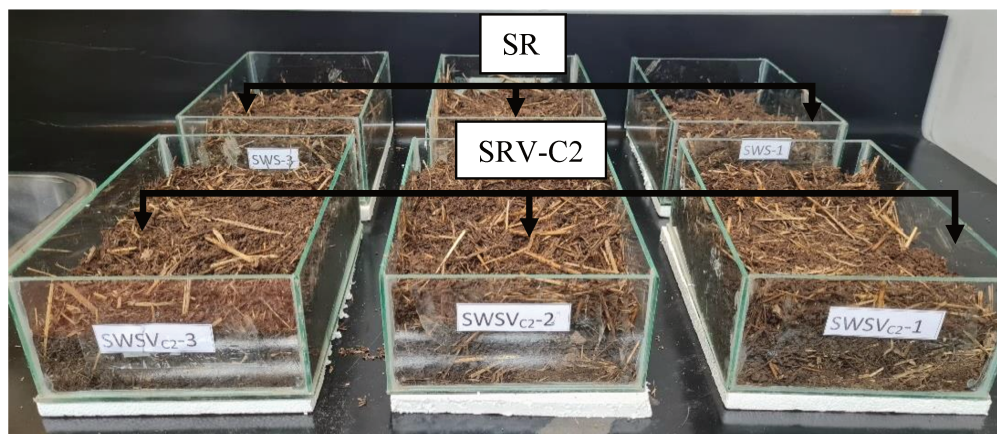


Figura 29. Ensayo de degradación con las biomezclas maduras: adelante biomezcla SRV-C2 y atrás SR.

#### 4.3.2. Incorporación de las lombrices en biomezclas

Los resultados obtenidos previamente en el Capítulo 2 (Sección 2.5.3) mostraron que las lombrices *E. fetida* podían sobrevivir al menos 96 h en las biomezclas con vermicompost al finalizar el ensayo. Pero este escenario no se había estudiado a largo plazo, así como tampoco sus efectos sobre las lombrices y las biomezclas; por ello, en este Capítulo se procedió a estudiar la posibilidad y efectos de incorporar las lombrices en dos de las biomezclas, pero durante un tiempo prolongado.

Se decidió comenzar a probar la incorporación de las lombrices a partir del día 49 del ensayo, teniendo en cuenta las concentraciones de los plaguicidas en el ensayo anterior, que, a ese mismo tiempo, las mismas debían estar dentro de las tolerables por las lombrices. Para poder conocer la aceptación de los individuos al sustrato, se extraían 100 g de la biomezcla y se exponían 3 lombrices por 72 h. de forma preliminar. De subsistir, se incorporarían en la cama biológica correspondiente de manera definitiva, en una proporción de 30 individuos por kg de biomezcla.

#### 4.3.3. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y biológicos de las biomezclas

A lo largo de los 254 días que duró el ensayo, se midieron en diferentes momentos sobre ambas biomezclas: hidrólisis de la FDA, pH, CE, IG y actividad de la Fosfatasa Alcalina (FA). En ambas biomezclas se efectuaron las mismas mediciones, para realizar un estudio comparativo de los efectos de la presencia de *E. fetida* en las biomezclas.

Además, se cuantificó la concentración de cada plaguicida 24 h luego de fumigar las biomezclas, a los 8 días de incorporar las lombrices (día 155 del ensayo) y al finalizar (día 254 del

ensayo). La cuantificación de plaguicidas en las biomezclas fue realizada bajo la misma técnica que fue descrita en el Capítulo 2, en la Sección 2.3.3.

#### 4.3.3.1. Actividad de la fosfatasa alcalina

Las fosfomonoesterasas se clasifican en enzimas fosfatasas ácidas y alcalinas, y se diferencian por su pH óptimo de catálisis, las ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores y las alcalinas principalmente por microorganismos. Estas enzimas brindan información acerca del potencial del suelo para mineralizar el fósforo orgánico a formas inorgánicas solubles disponibles para las plantas, y pueden tener un rol fundamental como indicadores tempranos y sensibles de los cambios que ocurren en el suelo. Estas enzimas son significativamente afectadas por el pH, la disponibilidad de fósforo y la materia orgánica (Fuentes Godo, 2023; Nannipieri et al., 2011).

La actividad de la FA en las biomezclas fue determinada acorde a Mupambwa et al. (2016) y se realizó mediante la cuantificación colorimétrica del p-nitrofenol (pNP, coloración amarilla) liberado por la actividad de la fosfatasa cuando un sustrato (biomezclas, en este caso) es incubado con el sustrato p-nitrofenil fosfato de sodio (pNPP, incoloro) a pH 11; es decir, la fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del pNPP a pNP y fosfato. Para llevar a cabo la determinación se añadieron, a 1 g de biomezcla fresca, 4 mL de buffer universal modificado (MUB) a pH 11 y 1 mL de una solución de pNPP (0,05 M). Se incluyó, además, un blanco sin el sustrato. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 h y posteriormente, se adicionaron 1 ml de CaCl<sub>2</sub> y 4 ml de NaOH (0,5 M). Las suspensiones resultantes se filtraron en papel de filtro Whatman N°2, para luego medir su absorbancia a 410 nm en espectrofotómetro UV-vis. Los resultados se expresaron en µg pNP por g biomezcla por hora, en base a la curva de calibrado realizada con el patrón del reactivo purificado.

#### 4.3.4. Selección de los biomarcadores monitoreados en lombrices

Se evaluaron biomarcadores tanto fisiológicos como enzimáticos en las lombrices que pudieron ingresar a la biomezcla para estudiar su estado durante el tiempo de ensayo y compararlo con lombrices no expuestas. La selección se basó en aquellos marcadores que pudiesen verse modificados en las lombrices durante la vermirremediación en las biomezclas (donde se habían estado degradando los plaguicidas); es decir, conocer si su bienestar se veía perjudicado más allá de que pudiesen mejorar las condiciones de la biomezcla y disminuir las concentraciones de plaguicidas en ella. Se escogieron biomarcadores enzimáticos: Acetilcolinesterasa (AChE), Catalasa (CAT); biológicos: Proteínas Totales (PT) y Biomasa (BS); y físicos: Índice de Lesión (IL).

El uso de biomarcadores permite la evaluación de los efectos subletales de los contaminantes en las lombrices, proporcionando más información sobre la respuesta al estrés del organismo y el

modo de acción tóxico de la sustancia evaluada. Las colinesterasas y, en particular, la actividad de la AChE responde específicamente a los plaguicidas, ya que la modificación de la actividad de la AChE se considera un signo de neurotoxicidad bajo exposiciones a plaguicidas (Solé, 2021).

En condiciones naturales, existe un equilibrio en los organismos entre la producción y la eliminación de radicales libres. El exceso de radicales libres puede causar peroxidación lipídica, daño al ADN y agotamiento de las reservas antioxidantes. Por lo tanto, la medición del estado antioxidante se puede estimar mediante sistemas de defensa antioxidante enzimáticos para eliminar las especies reactivas de oxígeno. La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, protegiendo así a las células de los efectos tóxicos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hackenberger et al., 2012; Khovarnagh & Seyedalipour, 2021).

#### **4.3.5. Monitoreo de los biomarcadores en las lombrices**

A partir de su incorporación y mientras las lombrices permanecieron en la biomezcla se llevaron a cabo muestreos periódicos para monitorear el estado fisiológico de las mismas, siendo el día 0 el estado base de las lombrices antes de ser ingresadas, es decir, provenientes del bioterio -sin exposición-. Para ello, se tomaron muestras de los individuos de forma aleatoria y se les registró la BS y luego se procesaron para poder medir la actividad de AChE, CAT y PT sobre el tejido. Además, se realizó un registro fotográfico periódico para evaluar el daño físico de las lombrices mediante la aplicación del IL. La toma aleatoria de las muestras de lombrices consistió en extraer un pool de 4 individuos de cada caja (réplica) en los días establecidos previamente. Todos los procedimientos presentados a continuación se realizaron manteniendo la temperatura con baño de hielo para minimizar la degradación.

##### **4.3.5.1. Obtención del homogenato**

En primer lugar, de cada muestra tomada (n= 4) se obtuvo la fracción S9 (fracciones microsomales y citosólicas) disgregando las lombrices enteras en tampón fosfato pH 7,2 (1:6 m/v) a 24000 rpm utilizando un homogeneizador (Ultraturrax® IKA). Los homogenatos se centrifugaron a 9000g durante 30 min a 4°C, y los sobrenadantes se reservaron para realizar las determinaciones.

##### **4.3.5.2. Determinación de Proteínas Totales**

Se utilizó la reacción colorimétrica basada en el método de Biuret para la cuantificación de proteínas totales (PT) en el homogenato obtenido, empleando un kit comercial (Wiener©). Se incubaron 0,05 mL de sobrenadante a 37°C durante 15 min con 4 mL de reactivo y luego se midió la absorbancia puntualmente a 540 nm en espectrofotómetro UV-vis. Se empleó como reactivo estándar,

un suero de albúmina (Proti2 Wiener Lab®) para determinar los contenidos de PT. Los resultados se expresaron en g de proteína por g de tejido.

#### 4.3.5.3. *Determinación de actividad Acetilcolinesterasa*

La determinación de la actividad de AChE se realizó mediante un método colorimétrico (Ellman et al., 1961) utilizando 0,05 mL del homogenato, 2,6 mL tampón de fosfato pH 8, 0,1 mL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,01 M como reactivo y 0,02 mL yoduro de acetiltiocolina 0,075 M como sustrato. La cinética se registró a 412 nm en espectrofotómetro UV-vis como variación de la absorbancia en el tiempo. La actividad enzimática específica se expresó como  $\mu\text{mol}$  acetiltiocolina hidrolizada por mg de PT, calculada con un coeficiente de extinción molar de  $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.5.4. *Determinación de la actividad Catalasa*

La actividad CAT se determinó en base a la técnica empleada por Hackenberger et al. (2012) midiendo la tasa de consumo o descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , expresado como una disminución en la absorbancia en el tiempo, medida a 240 nm en espectrofotómetro UV-vis. Para la reacción, se añadió en una cubeta de cuarzo 1,56 mL de tampón fosfato sódico (0,1M, pH 7,2), 40  $\mu\text{L}$  del homogenato y 1,40 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,019 M). Para calcular la actividad se aplicó un coeficiente de absorción de  $42,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad de CAT se expresó como  $\text{nmol H}_2\text{O}_2$  degradado por minuto por mg de PT.

#### 4.3.5.5. *Registro de la Biomasa*

Con la misma modalidad empleada en el Capítulo 1, durante el vermicompostaje, se registró la BS promedio inicial de las lombrices, es decir, antes de ser incorporadas a la biomezcla y luego se monitoreó su evolución a lo largo del ensayo. Este registro se realizó a los mismos tiempos en que se midieron las enzimas en las lombrices.

#### 4.3.5.6. *Determinación del índice de lesión*

El índice de lesión en las lombrices se calculó acorde a Lammertyn et al. (2024). Este índice está diseñado específicamente para lombrices *E. fetida* y consta de siete categorías en función de la gravedad de las lesiones que puede sufrir una lombriz cuando es expuesta a un contaminante, en este caso, plaguicidas. Las categorías de las lesiones y su puntuación correspondiente se describen brevemente a continuación:

- S1=0 “Ileso” (sin alteración morfológica visible).
- S2=1 “Lesión menor” (clitelo poco pronunciado o ausente, con pérdida de pigmentación).
- S3=2 “Lesión moderada” (adelgazamiento continuo inferior al 50% de la longitud corporal o con adelgazamiento discontinuo).
- S4= “Lesión seria” (adelgazamiento mayor al 50% de la longitud corporal).
- S5= “Lesión grave” (ampollas y/o con constricciones en partes posteriores).
- S6= “Lesión mayor” (ampollas rotas o llagas, y/o con fragmentación y necrosis en partes posteriores).
- S7= “Muerte” (muerte del organismo).

Para poder calcular el índice, a cada tiempo de muestreo se tomaron 10 individuos al azar de cada caja. A cada individuo se le realizó un registro fotográfico. El registro consistió en colocar, de una, las lombrices limpias, sobre una superficie blanca iluminada que contaba con una regla de referencia, y posteriormente tomarles la fotografía. La gravedad de las lesiones de cada individuo expuesto se evaluó considerando las alteraciones morfológicas identificadas en el registro fotográfico en relación con los patrones de referencia. Los resultados se expresaron en porcentaje ( $I_1$  %), correspondiendo a la categoría  $S_1 \leq 16,7\%$ ;  $S_2 \leq 33,3\%$ ;  $S_3 \leq 50\%$ ,  $S_4 \leq 66,7 \%$ ,  $S_5 \leq 88,3\%$ ,  $S_6 \leq 100\%$  y  $S_7 100\%$ .

#### 4.4. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como los valores medios de al menos tres mediciones a las que se les calcularon e informaron sus desviaciones estándar (SD). Para comparar la respuesta entre los grupos de mediciones, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post hoc de Tukey con un nivel de significancia establecido en  $p < 0,05$ . En el caso de la comparación de mediciones puntuales, se utilizó la prueba t-Student, considerando un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando Minitab, versión 19.

#### 4.5. Resultados y discusión

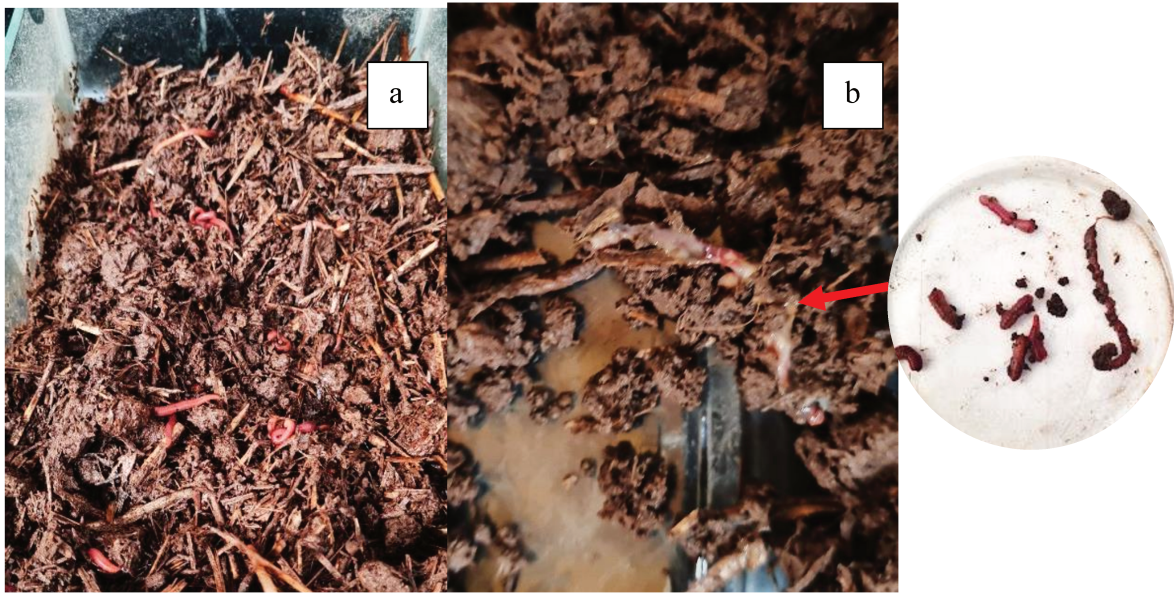
##### 4.5.1. Incorporación de las lombrices en biomezclas

Tal como se mencionó en la metodología, las lombrices se intentaron incorporar a los sustratos para comenzar la biorremediación a partir del día 49, con pruebas a menor escala. Sin embargo, en los primeros intentos ningún individuo lograba sobrevivir en ninguna de las dos biomezclas; finalmente, los individuos aceptaron ingresar y permanecer únicamente en SRV-C2, recién a los 147 días de ensayo (día 1 de la exposición de las lombrices). Mientras que, en SR se continuó intentando la incorporación de las lombrices hasta el final del experimento, pero sin éxito. La proporción

utilizada, una vez aceptado el sustrato, fue de 30 individuos por kg de biomezcla. En la Figura 30-a puede observarse la biomezcla SRV-C2 con las lombrices ya incorporadas, habiendo aceptado el sustrato. Mientras que, en la Figura 30-b se observa una fotografía de una de las exposiciones preliminares de las lombrices a la biomezcla SR, donde claramente se puede ver como éstas no sobrevivían frente a la exposición; algunas de ellas auto extirpando extremos de su cuerpo, como mecanismo de defensa y otras muriendo en menos de 72 h.

La imposibilidad de las lombrices de permanecer en SR, a pesar de que algunas de las características de las biomezclas eran similares (ver Sección siguiente, 4.5.2), pudo haberse debido a los residuos de los plaguicidas remanentes en este sustrato o a los metabolitos generados por la propia degradación. Al inicio, la mayoría de las concentraciones de los plaguicidas en ambas biomezclas fueron considerablemente más altas que su  $CL_{50}$  informada. En este sentido, en la Tabla 14 pueden observarse las concentraciones registradas de todos los plaguicidas para ambas biomezclas al inicio del ensayo (día 0), en el día 155 (día 8 de exposición de lombrices) y al día 254 (final del ensayo, día 107 de exposición de lombrices). Si bien ambas biomezclas fueron efectivas en la remoción de la mayoría de los plaguicidas, se destaca la diferencia que tuvieron en la remoción del IMI (99 % en SRCV-C2 contra 78 % para SR). De acuerdo con los valores de  $CL_{50}$ , este plaguicida es el más tóxico para *E. fetida* (Ver Tabla 15). La concentración de IMI en la biomezcla SR en el tiempo intermedio y al final del ensayo ( $\sim 10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) podría explicar el rechazo de las lombrices a ingresar, tal como se mencionó previamente, ya que los valores registrados son cercanos al  $CL_{50}$  informado ( $p= 0,436$ ). Por el contrario, en la biomezcla SRV-C2 los valores hallados fueron significativamente más bajos y menores al  $CL_{50}$  ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, a esta dificultad de supervivencia podría sumarse también la falta de alimento disponible en ese sustrato respecto a la biomezcla con vermicompost, que contaba con partículas palatables para las lombrices, de menor fracción. Esto puede verse reflejado en los contenidos de MO: antes de fumigar, en SR fue de  $22 \pm 3$  y  $30 \pm 8$  % para SRV-C2. La biomezcla de referencia disminuyó el contenido de MO un 75 % al finalizar el ensayo ( $5,4 \pm 0,2$  %) mientras que a ese mismo tiempo en la biomezcla con vermicompost se registró una MO de  $14 \pm 2$  % (disminución del 53 %). Este fenómeno también fue observado por Delgado-Moreno et al. (2020), quienes afirman que la composición de la biomezcla a la hora de ser vermirremediada puede no ser adecuada en recursos nutricionales para un crecimiento y una reproducción óptimos. Igualmente, diversos autores mencionan que la disponibilidad de materia orgánica y la heterogeneidad del sustrato orgánico modula notablemente el desarrollo y la supervivencia de las lombrices, además de la biodisponibilidad de los plaguicidas (Ećimović et al., 2022; Masin & Rut Rodríguez, 2012; Pelosi et al., 2014).



**Figura 30.** a) Individuos de *E. fetida* incorporados en SRV-C2, en estado saludable; b) Individuos muertos de *E. fetida*, incorporados en SR (señalado con flecha) y evidencias de autólisis corporal.

**Tabla 14.** Concentraciones registradas de los plaguicidas en las biomezclas a lo largo del tiempo de ensayo.

Concentraciones (mg kg <sup>-1</sup> )						
Biomezcla	Día	IMI	DIM	ACE	2,4-D	CIP
SR	0	36,0 ± 1,6	84,6 ± 5,6	140,8 ± 12,4	104,7 ± 5,3	90,2 ± 1,8
	155	10,0 ± 1,0	0,6 ± 0,5	0,8 ± 0,1	ND	0,6 ± 0,1
	254	10,0 ± 0,1	<LD	0,11 ± 0,01	ND	0,5 ± 0,1
SRCV-C2	0	38,6 ± 1,6	87,2 ± 2,8	132,2 ± 13,3	83,6 ± 1,1	95,7 ± 2,0
	155	3,0 ± 0,6	ND	0,14 ± 0,07	ND	0,5 ± 0,1
	254	0,2 ± 0,1	ND	0,04 ± 0,01	ND	0,4 ± 0,2

**Tabla 15.** Concentraciones letales medias de cada plaguicida sobre las lombrices *E. fetida*. Los valores refieren a un ensayo agudo de 14 días de exposición en suelo seco. Valores obtenidos de Pesticide Data Base (2025).

Plaguicida	CL <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) agudo
Acetoclor	106
Imidacloprid	11
Dimetoato	31
2,4-D	350
Cipermetrina	>100

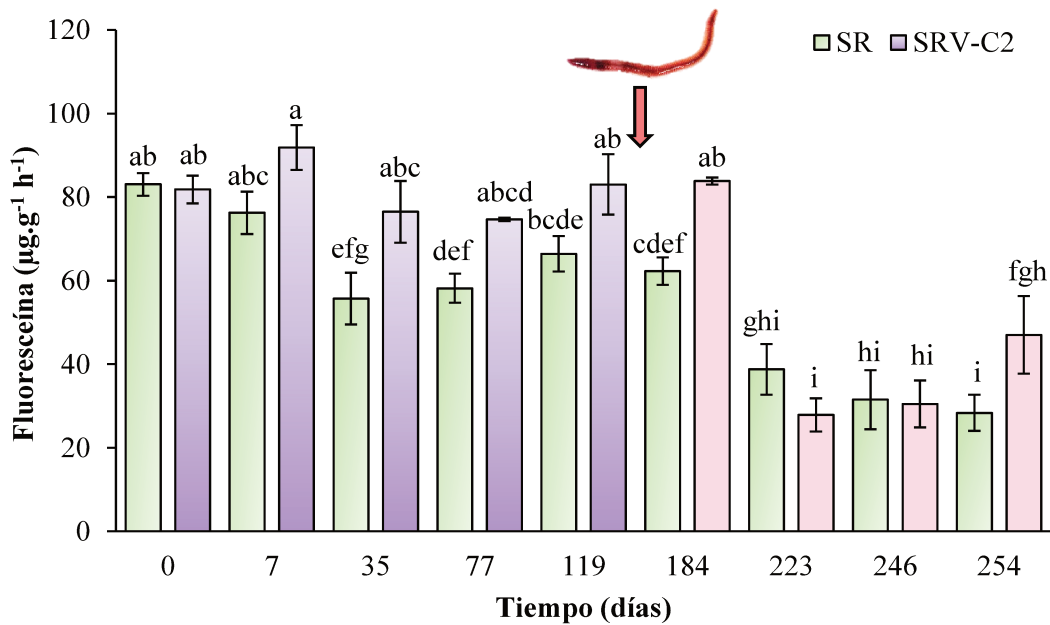
#### 4.5.2. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y biológicos de las biomezclas

En cuanto al pH de las biomezclas, durante los primeros 119 días fue más alcalino ( $SR = 7,5 \pm 0,3$ ;  $SRV-C2 = 8,0 \pm 0,2$ ) y luego disminuyó a valores cercanos a 6 en ambos casos; la CE fue siempre en promedio más baja en SR ( $422 \pm 165 \mu S \text{ cm}^{-1}$ ) respecto a SRV-C2 ( $873 \pm 258 \mu S \text{ cm}^{-1}$ ) durante todo el ensayo. Estos valores se hallan en concordancia con las biomezclas empleadas por Masin et al. (2018), y son viables para la supervivencia de lombrices.

La Figura 31 muestra la variación de la actividad microbiológica a partir de la hidrólisis de la FDA. Al comienzo del ensayo, ambas biomezclas mostraron una actividad microbiológica similar y esperable para su tipo de composición (promedio de  $82,4 \pm 0,9 \mu g \text{ FDA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). A los 7 días de ser fumigadas ambas biomezclas, se pudo observar que la biomezcla SRV-C2 tenía un valor microbiológico levemente más alto que SR. Específicamente SRV-C2 mantuvo sus valores iniciales sin diferencias significativas entre sí hasta 37 días después de incorporar las lombrices (día 184). Posteriormente (a partir del día 223) la actividad microbiológica en SRV-C2 disminuyó significativamente un 67 %, manteniendo valores no mayores a  $47 \mu g \text{ FDA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  hasta finalizar el ensayo. Es decir, la actividad microbiológica en la biomezcla que contenía las lombrices se sostuvo sin diferencias estadísticas desde el día 223 hasta el 254 (día 107 de exposición de lombrices). La disminución abrupta pudo ser posiblemente potenciada por el consumo de fuentes de C disponible para los microorganismos. Algunos autores reportan este tipo de comportamiento en biomezclas con diferentes plaguicidas (Tortella et al., 2012; Urrutia et al., 2013).

En cambio, la biomezcla SR logró mantener la actividad microbiológica igual de activa que al inicio solo durante los primeros 7 días, mostrando ya al día 35 una disminución estadísticamente significativa del 33 %. Estos valores de la hidrólisis de la FDA en SR se mantuvieron por 149 días más, y disminuyeron aún más al día 223, sosteniendo este valor hasta finalizar el ensayo. Esta última tendencia, resultó similar en ambas biomezclas, a pesar de que SRV-C2 contenía lombrices, y se podría asociar a un agotamiento esperable de ambas biomezclas. De todas maneras, al finalizar, la actividad microbiana fue de  $28 \pm 4 \mu g \text{ FDA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en SR y un 35 % más alta en SRV-C2 ( $47 \pm 9 \mu g \text{ FDA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), pudiendo considerar que, la presencia de las lombrices en la biomezcla contribuyó a recuperar parte de la actividad microbiológica. La hidrólisis de la FDA se sabe que puede ser alterada por los plaguicidas en general, pero se cree que puede hallarse más influenciada por la presencia de insecticidas principalmente (Riah et al., 2014). No obstante, Lescano et al. (2020) estudiaron diferentes biomezclas con lombrices para mejorar la degradación del herbicida glifosato y observaron que la actividad de la hidrólisis de la FDA fue mayor en aquellas biomezclas que presentaban mejores porcentajes de degradación del plaguicida. Sin embargo, a los 90 días de ensayo la actividad

microbiológica total habría decaído en comparación a los valores registrados al comienzo. Los rangos de valores de hidrólisis de la FDA ( $10\text{-}70 \mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) fueron similares a los observados en este ensayo.

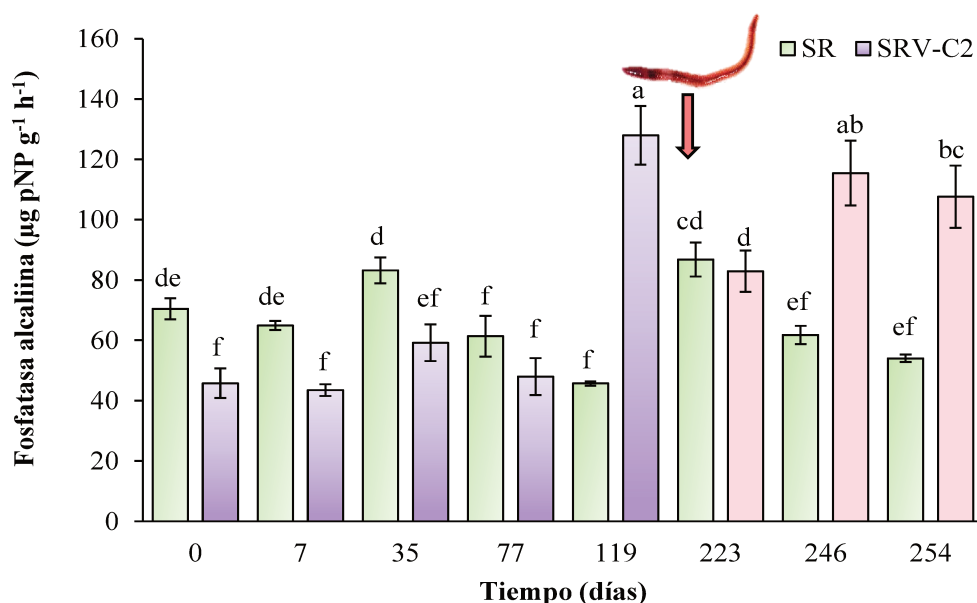


**Figura 31.** Evolución en el tiempo de la hidrólisis de la FDA en ambas biomezclas. En barras verdes se presenta SR y en barras violetas SRV-C2, ambas sin lombrices. Las barras color rosa corresponden a SRV-C2 con lombrices (incorporadas el día 147, indicado con la flecha). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. La desviación estándar de cada barra se muestra en líneas de color negro.

El monitoreo de FA (Figura 32) se incorporó en este capítulo como un indicador más de la actividad microbiana junto con la FDA en las biomezclas. Se eligió FA ya que, específicamente, cumple funciones clave dentro del ciclo del fósforo y algunos plaguicidas pueden alterar su actividad (Riah et al., 2014).

Con respecto a la variación de la FA, antes de fumigar las biomezclas y durante los primeros 35 días, SR presentó una actividad enzimática significativamente mayor respecto a la de la biomezcla con vermicompost. Posteriormente, se observó una disminución de la actividad en SR, equiparándose con los niveles de SRV-C2. A partir del día 119 hasta el fin del ensayo, la actividad enzimática de SRV-C2 fue igual o mayor a la de SR, considerando que al día 147 ya se hallaban incluidas las lombrices en esa biomezcla. Extrañamente, SRV-C2 mostró un incremento significativo 28 días antes de la incorporación de los individuos. Este valor se redujo después de su incorporación un 35% (día

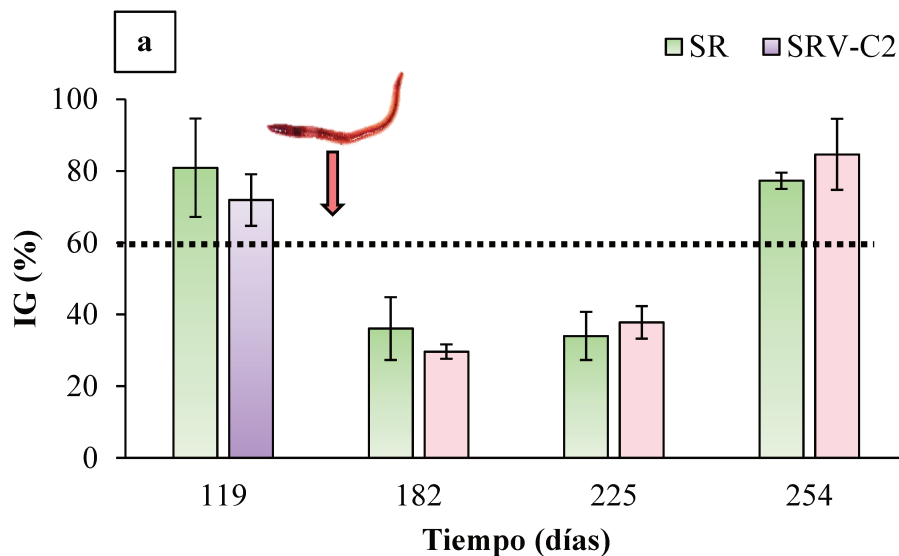
223), aproximadamente luego de 76 días de permanencia de las lombrices. Por último, mientras los valores de FA en la biomezcla de referencia sin lombrices continuaban disminuyendo, en SRV-C2 se incrementaban, posiblemente por la acción positiva de las lombrices. Nahidan & Ghasemzadeh (2022) observaron que la incorporación de estiércol vacuno y *E. fetida* en un suelo calcáreo aumentó la actividad de la FA. Además, informaron que las lombrices pueden mejorar la movilidad y biodisponibilidad de fósforo a partir de la secreción de compuestos orgánicos. La actividad FA fue significativamente 50 % más alta en SRV-C2 que en la biomezcla sin vermicompost. Riah et al. (2014) informan que diversos autores han mostrado que la actividad FA puede quedar inalterada o decrecer tras varias aplicaciones de plaguicidas. Además, mencionan que las fosfatasa no responden del mismo modo a los herbicidas (tienden a inhibir la FA) que a los insecticidas (estimulan la FA). Por lo tanto, la dinámica observada en este ensayo de degradación es esperable, ya que no se trata de un plaguicida individual, sino de una mezcla de cinco con diferentes propiedades.

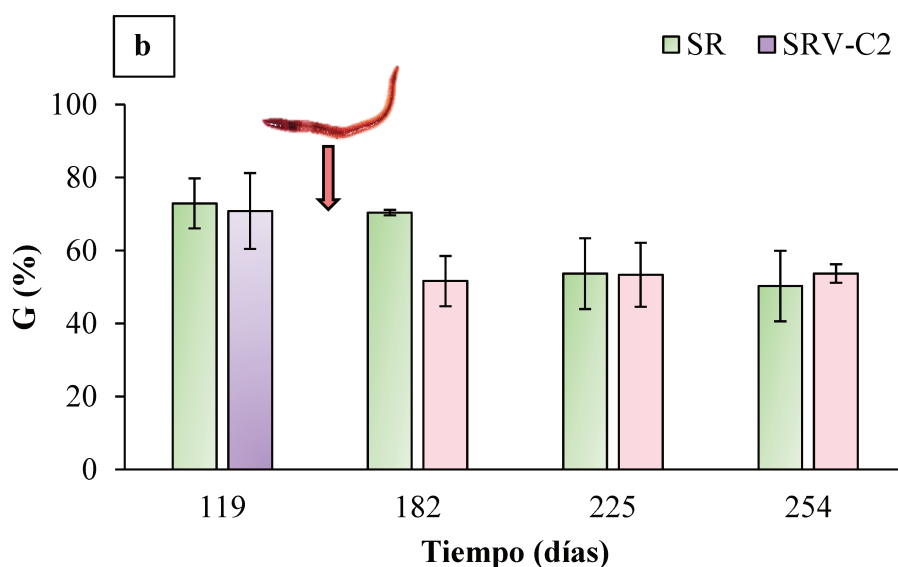


**Figura 32.** Evolución en el tiempo de la Fosfatasa Alcalina en ambas biomezclas. En barras verdes se presenta SR y en barras violetas SRV-C2, ambas sin lombrices. Las barras color rosa corresponden a SRV-C2 con lombrices (incorporadas el día 147, indicado con la flecha). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. La desviación estándar de cada barra se muestra en líneas de color negro.

En la Figura 33 se encuentran representados gráficamente el IG (Fig. 33-a) y la capacidad de germinación (G) (Fig 33- b) de ambas biomezclas, determinados durante el ensayo. La determinación del IG, que considera tanto la G de las semillas de *L. sativa*, como la longitud de la radícula de éstas luego de 5 días, se determinó a los días 119 (finalización del ensayo sin lombrices), 182 (luego de

incorporar las lombrices), 225 y 254 (finalización del ensayo). Este índice permitió observar que, a los 119 días, ninguna de las biomezclas era fitotóxica ( $IG > 60\%$ ); sin embargo, sufrió una depleción a tiempos intermedios para ambas biomezclas, por lo que este fenómeno no podría atribuirse específicamente a la presencia de las lombrices, dado que sólo estaban presentes en SRV-C2. La fitotoxicidad mostrada en estos tiempos posiblemente se deba a la aparición de intermediarios o metabolitos de la degradación de los plaguicidas que, posteriormente, con el avance de la biodegradación pueden también ser degradados a productos inocuos. Esta explicación se fundamenta en el hecho de que ambas mezclas resultaron no fitotóxicas a los 254 días. Al respecto, este comportamiento fue observado cuando se evaluó el IG durante la aplicación de un proceso avanzado de oxidación para remover plaguicidas del agua (López et al., 2018). Por otro lado, la G disminuyó significativamente luego de 35 días de permanencia de las lombrices en SRV-C2. Es decir, disminuyó a partir del día 182 en SRV-C2 ( $p = 0,002$ ) y del día 225 en SR ( $p = 0,008$ ). Los valores de germinación G se mantuvieron cercanos al 50 % en ambas biomezclas hasta el final del ensayo ( $p_{SRV} = 0,113$ ;  $p_{SR} = 0,810$ ).





**Figura 33.** a) Índice de germinación, En barras verdes SR y en violeta SRV-C2. La línea punteada indica un IG de 60%, mínimo para que no sea fitotóxica; b) porcentaje de germinación en ambas biomezclas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Las barras color rosa corresponden a SRV-C2 con lombrices (incorporadas el día 147, indicado con la flecha). La desviación estándar de cada barra se muestra en líneas de color negro.

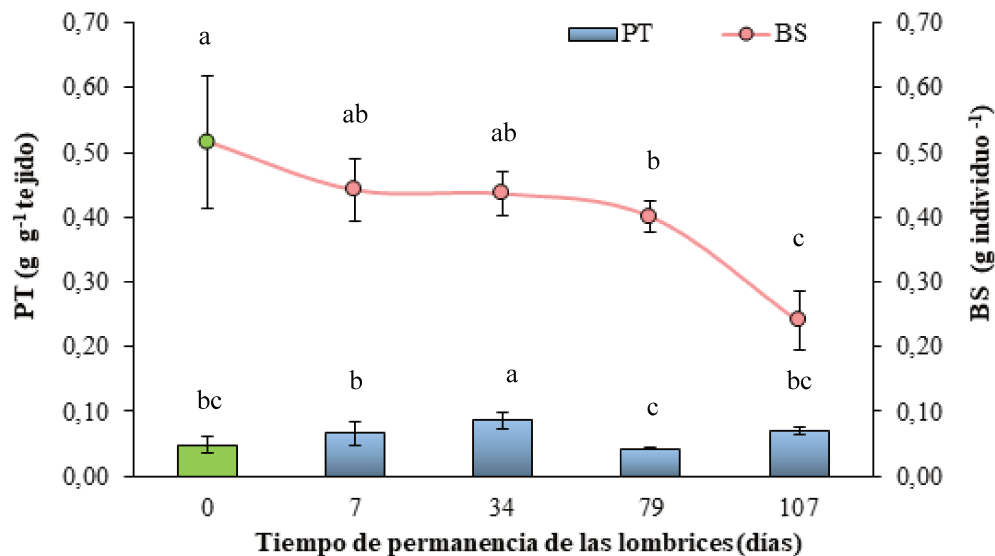
### 4.5.3. Monitoreo enzimático y físico de las lombrices

#### 4.5.3.1. Biomasa y biomarcadores enzimáticos

En la Figura 34 puede observarse la variación de la BS y de las PT a lo largo del periodo de permanencia de las lombrices en la biomezcla. La BS promedio de los individuos colocados inicialmente (del bioterio, sin exposición) fue de  $0,52 \pm 0,10$  g; este valor disminuyó un 53,5 % a lo largo del periodo de supervivencia en la biomezcla. Al finalizar los 107 días, la BS promedio de los individuos fue de  $0,24 \pm 0,05$  g. El decrecimiento significativo de la BS se dio desde el día 79 al 107. Cabe recordar que las lombrices durante su permanencia no fueron alimentadas de manera adicional. Lescano et al. (2020), al exponer lombrices de la misma especie a biomezclas con glifosato, observaron al comienzo un incremento de la BS de los individuos, pero luego, al igual que en este estudio, la BS decreció significativamente. Delgado-Moreno et al. (2020) también ensayaron la vermirremediación empleando biomezclas que contenían vermicompost en su composición junto a la acción de *E. fetida* por 12 semanas en presencia de diurón, imidacloprid, tebuconazol, oxifluorfen y dimetoato). En este estudio registraron la misma tendencia de disminución de la biomasa de los individuos a lo largo del tiempo. La presencia de las lombrices tuvo un efecto limitado en la disipación

de los plaguicidas debido a las altas concentraciones, principalmente del imidacloprid. Asimismo, Liu et al. (2021) reportaron que el ACE, por ejemplo, puede inducir daño al ADN en las lombrices, así como disminuir considerablemente su crecimiento y reproducción tras la exposición a este herbicida.

Otros autores reportan también, para los plaguicidas estudiados en esta Tesis, la disminución de la masa corporal de las lombrices al ser expuestas, así como la generación de un exceso de secreciones, disminución de la reproducción, adelgazamiento del clitelo, pérdida de pigmentación, ruptura de la cutícula y/o ampollas (Dasgupta et al., 2015; Miglani & Bisht, 2020; Xiao et al., 2006). Durante la permanencia de las lombrices en la biomezcla, si bien disminuyó su BS, se mantuvieron en un estado de buena apariencia fisiológica (determinada por el índice de lesión que se presenta en la subsiguiente Sección 4.5.3.2). Esto se ve además respaldado por la conservación del nivel de proteínas en relación con el tejido, entre 0,04 y 0,09 g PT g<sup>-1</sup> tejido (Fig. 34).



**Figura 34.** Evolución del contenido de proteínas totales (g PT g<sup>-1</sup> tejido) y de la biomasa (g) ● de los individuos a lo largo de su permanencia en SRV-C2. En verde se indica el día 0, que corresponde a lombrices no expuestas (en condiciones de bioterio). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. La desviación estándar de cada barra se muestra en líneas de color negro.

La Figura 35 muestra la variación de la actividad de las dos enzimas estudiadas en los tejidos de las lombrices (AChE y CAT). La AChE mostró un descenso hasta el día 34 de exposición de los individuos, en el cual fue significativamente más baja. Posiblemente la inhibición causada fue reversible en esas condiciones, ya que a medida que avanza la degradación de los plaguicidas y sus

metabolitos, la actividad de esta enzima mostró una recuperación significativa hacia el día 79 de permanencia, que se sostuvo hasta el final. Al día 254 (107 de permanencia de las lombrices) los valores de AChE se asemejaron a los valores de partida. La actividad de AChE, podría haber estado inhibida como una respuesta a la concentración de IMI (neonicotinoide) y a metabolitos de degradación de los plaguicidas, principalmente del DIM (organofosforado) (Solé, 2021). La recuperación de esta actividad se podría vincular a capacidades adaptativas de los individuos, o a que las concentraciones de los plaguicidas en la primera semana de exposición de las lombrices ya se encontraban por debajo de los valores de  $CL_{50}$ , presentados en la Tabla 15 con anterioridad, por lo que no hubo un daño de magnitud considerable y permanente.

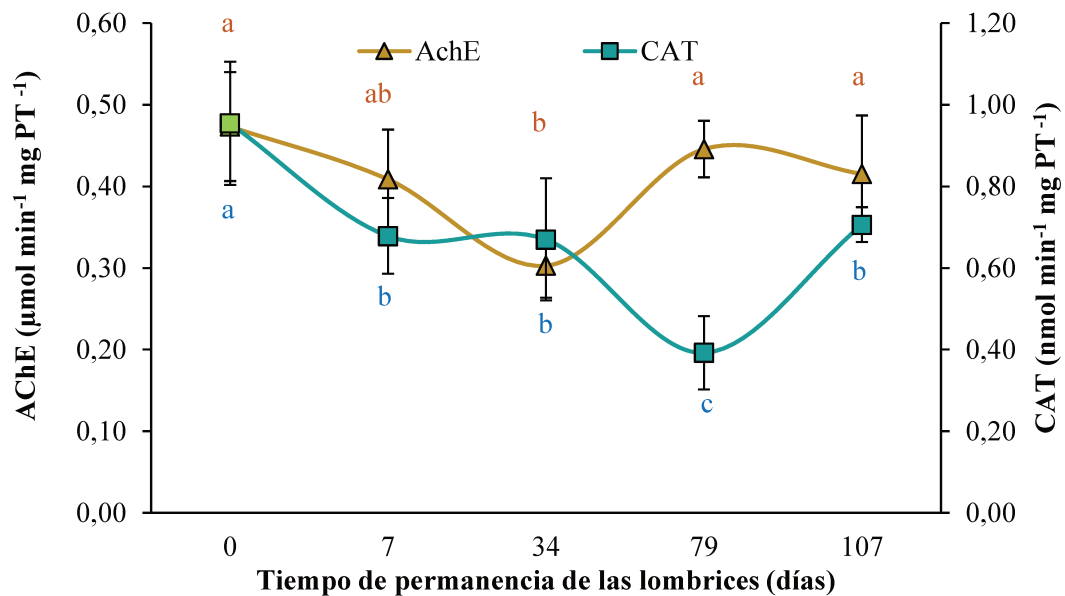
Los resultados aquí presentados fueron similares a los observados por Velki & Hackenberger (2013) que expusieron lombrices (*E. andrei*) a diferentes concentraciones de DIM en suelo. Estos autores observaron una inhibición significativa de la actividad de la AChE a concentraciones de 3 mg  $kg^{-1}$ , registrando el valor más bajo luego de 15 días de exposición; mientras que, en concentraciones más bajas, si bien la actividad tendió a disminuir, presentó mayores fluctuaciones, recuperando valores cercanos a los originales luego de 28 días. Por otro lado, Teng et al. (2022) estudiaron la toxicidad combinada de clorpirifós, abamectina, imidacloprid y acetamiprid en *E. fetida*, reportando que la actividad de AChE en aplicaciones combinadas es inhibida con el aumento del tiempo de exposición, mientras que en exposiciones individuales y a bajas concentraciones observaron un incremento de esta actividad.

Respecto a la actividad de la oxidorreductasa CAT, se observó una primera inhibición a los siete días de ser incorporadas las lombrices, que se sostuvo hasta el día 34. El día 79 se registró una disminución mucho más pronunciada de la actividad de esta enzima, aunque luego hacia la finalización del ensayo estos valores aumentaron, aunque sin alcanzar los correspondientes a las lombrices sanas del inicio. Andrade-Herrera et al. (2019) informan que, aunque la actividad de la CAT tiende a aumentar en presencia de diferentes plaguicidas para mantener niveles adecuados de ROS, esta puede inhibirse en presencia de neonicotinoides (imidacloprid en este caso). Asimismo, en su estudio, Rodríguez-Campos et al. (2014) reportan que como respuesta primaria a la exposición se puede observar una inactivación de la actividad de las enzimas a corto plazo, pero que posteriormente a una exposición más prolongada (>28 días) las actividades tienden a aumentar nuevamente, lo que sugiere una adaptación de las lombrices o tolerancia a los contaminantes o metabolitos a los que están expuestas. Velki & Hackenberger (2013) reportaron también una disminución de la actividad de CAT en las lombrices expuestas a diferentes dosis de dimetoato, seguido de una leve recuperación de la actividad luego de 28 días. Zhang et al. (2014) por otro lado, observaron que hasta dosis de 2 mg  $kg^{-1}$  de imidacloprid la actividad de la CAT se estimuló, pero que a partir del doble de la concentración se registraron leves disminuciones de la misma. Es esperable que esta enzima muestre fluctuaciones

en su concentración durante el estrés oxidativo (Hackenberger et al., 2012; Khovarnagh & Seyedalipour, 2021).

La actividad de la CAT puede aumentar cuando las lombrices están sometidas a un estrés leve, pero generalmente disminuye bajo un estrés severo (Nyoka et al., 2021). Este fenómeno se condice con lo observado en la Fig. 35, ya que los primeros 79 días de exposición de las lombrices aún había remanentes de IMI, ACE y CIP, posiblemente generando un estrés severo en los individuos, lo que se vio reflejado en el decrecimiento de la actividad CAT. Hacia el final del ensayo las concentraciones de los posibles metabolitos generados durante la degradación de los plaguicidas probablemente también disminuyeron. El menor estrés de los individuos permitió que los valores de CAT se incrementen, hasta valores cercanos a cuando no estaban expuestos. Al día 155 (día 8 de exposición de las lombrices), el IMI era el plaguicida que mayor concentración presentaba. Nyoka et al. (2021) reportaron observar una inhibición de la CAT cuando las concentraciones de IMI eran más altas.

En base a los reportes de los autores mencionados, se podría considerar que la actividad de estos biomarcadores enzimáticos es dependiente del tipo y de la dosis de los plaguicidas, el tiempo de exposición y de si las lombrices se encuentran expuestas a uno o más plaguicidas.

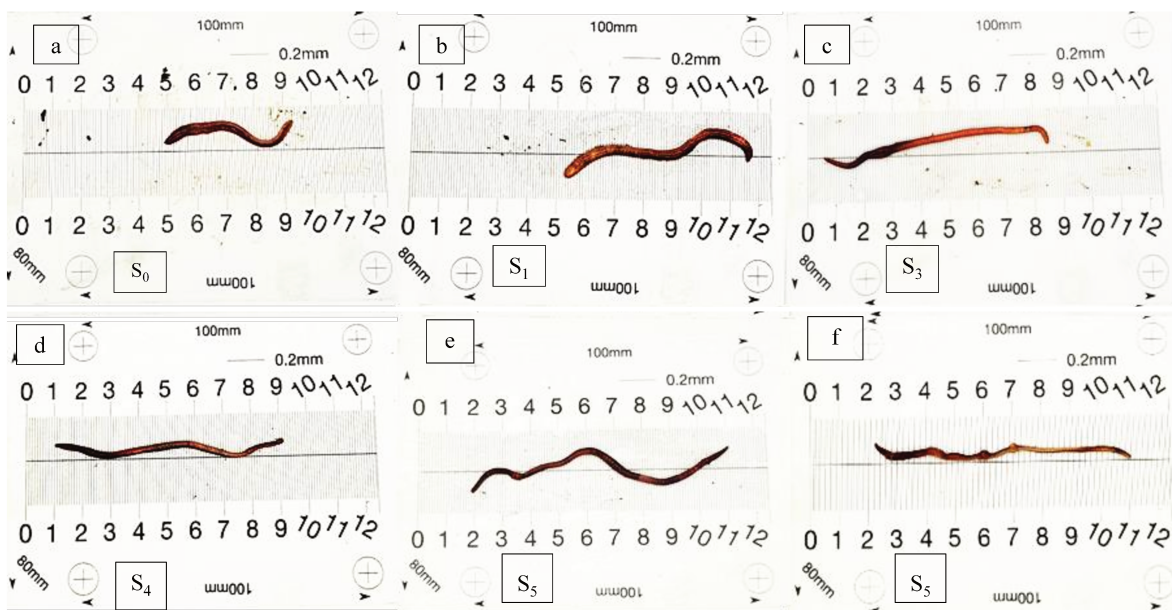


**Figura 35.** Evolución de la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (▲ eje izq.) y catalasa (■ eje der.) en los individuos a lo largo de su permanencia en SRV-C2. En verde se indica el día 0, que corresponde a lombrices no expuestas (en condiciones de bioterio). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (abajo para CAT, arriba para AChE. La desviación estándar de cada barra se muestra en líneas de color negro.

#### 4.5.3.2. Índice de lesión

Las lombrices empleadas para los ensayos, como se mencionó en el Capítulo 1, son las provenientes de un bioterio propio. El estado físico de las mismas al ser incorporadas a la biomezcla SRV-C2 era muy bueno, con un porcentaje de lesión promedio de  $7 \pm 1 \%$  (Fig. 36-a), que se corresponde con la categoría de “ilesas” del  $I_L$  (ver Sección 4.3.5.6 del presente Capítulo). Luego de 15 días de permanencia en la biomezcla, el  $I_L$  aumentó aproximadamente un 10% ( $I_L = 17 \pm 3 \%$ ), por lo que los individuos mostraban evidencias claras de “lesión menor” (Fig. 36-b). Este estado fisiológico se sostuvo durante un mes, mostrando que los individuos podían subsistir de forma adecuada en la biomezcla. Una vez pasados los 107 días de permanencia estas mismas lombrices mostraron un estado fisiológico correspondiente a “lesión moderada” ( $I_L = 41 \pm 7 \%$ ) (Fig. 36-c), ya que algunos individuos luego de dicho período poseían una prominencia menor del clitelo, adelgazamiento de la longitud corporal o con adelgazamiento discontinuo, o se encontraban con menor pigmentación. El aumento del 30 % del daño no fue un problema para que los individuos puedan vermirremediar el sustrato, y se puede también asociar a la escasez de alimento en la biomezcla. Estas observaciones son coincidentes con Velki & Hackenberger (2013), quienes informan que durante la exposición a concentraciones bajas de dimetoato (0,03; 0,1; 0,3 y 1 mg kg<sup>-1</sup>), las lombrices poseían visibles constricciones y lesiones menores, pero no se habían fragmentado ni presentado daños mayores.

Cabe mencionar que cuando se intentó colocar las mismas lombrices de bioterio en la biomezcla de referencia SR, al pasar 72 h expuestas mostraron rápidamente un aumento del daño en su fisiología, con lesiones serias a las 24 h ( $I_L = 55 \pm 11 \%$ ) (Fig. 36-d) y graves (ampollas, constricciones, adelgazamiento, despigmentación) a las 72 ( $I_L = 69 \pm 6 \%$ ) (Fig. 36-e-f). Esta respuesta fue indicativa de un desmejoramiento de los individuos insostenible en el tiempo. Esto fundamenta la imposibilidad de la incorporación de las lombrices en dicha biomezcla, continuándose con el ensayo de vermirremediación únicamente de SRV-C2.



**Figura 36.** Imágenes ilustrativas (de un ejemplar) tomadas de las lombrices para la evaluación del  $I_L$ . a) lombriz ilesa previa a la incorporación; b) lombriz con lesión menor a los 15 días en SRCV-C2; c) lombriz con lesión moderada en SRCV-C2 al finalizar el ensayo (107 días); d) lombriz con lesión seria, a las 24 h de incorporarse en SR; e-f) lombrices con lesiones graves luego de permanecer 72 h en SR.

#### 4.6. Conclusión

La incorporación de lombrices en las biomezclas permitió evaluar la factibilidad de aplicar vermirremediación para una mezcla de plaguicidas compleja. Aunque se esperaba que ambas biomezclas alcanzaran condiciones aptas para el ingreso de lombrices hacia los 119 días, en la práctica solo SRV-C2, la formulada con vermicompost, logró condiciones compatibles con la supervivencia de *E. fetida*. En SR persistieron concentraciones de imidacloprid cercanas a su  $CL_{50}$ , lo que puede explicar el rechazo y la rápida aparición de lesiones severas en los individuos. En cambio, en SRV-C2 las lombrices pudieron ingresar a los 147 días y permanecer durante 107 días, favorecidas tanto por menores residuos tóxicos como por una mayor disponibilidad de materia orgánica.

La actividad biológica de las biomezclas mostró comportamientos diferenciales. SRV-C2 mantuvo durante más tiempo una mayor actividad, y hacia el final del ensayo exhibió una recuperación de FDA y FA asociada a la acción de las lombrices y a una mayor disipación total de plaguicidas. Si bien la fitotoxicidad fluctuó en ambos sustratos, posiblemente por la presencia transitoria de metabolitos, ninguna biomezcla resultó fitotóxica al finalizar el ensayo.

Las lombrices sobrevivieron sin mortalidad en SRV-C2, aunque con una reducción progresiva de biomasa atribuible a la falta de alimento y a la exposición residual a contaminantes. Los

biomarcadores enzimáticos reflejaron estrés subletal, con inhibición inicial de AChE y CAT seguida de una recuperación parcial, lo que sugiere una adaptación al descenso de los plaguicidas disponibles. El índice de lesión indicó un deterioro moderado pero compatible con la permanencia y actividad de los individuos.

En conjunto, los resultados muestran que la vermirremediación, en este caso, no es viable como estrategia inmediata tras la aplicación de plaguicidas, debido a las altas concentraciones iniciales; sin embargo, sí puede aplicarse de manera efectiva como etapa complementaria una vez alcanzados niveles subletales, especialmente en biomezclas enriquecidas con materiales orgánicos como el vermicompost. De esta manera se puede reciclar la mezcla ya usada como sustrato para un nuevo ciclo de uso. El aporte adicional de fracciones orgánicas lignocelulósicas como rastrojo de trigo podría potenciar aún más el desempeño de esta tecnología en futuras aplicaciones.

## Conclusiones generales

Este trabajo de Tesis se encuadró en el estudio de una estrategia tecnológica integral, orientada a la resolución de un problema de relevancia global: la biodegradación de una mezcla compleja de plaguicidas a la vez que se valorizan residuos orgánicos locales disponibles.

Específicamente, se realizó una investigación orientada a evaluar la incorporación de sustratos vermicompostados en la formulación de biomezclas para Sistemas de Biopurificación, con el propósito de sustituir la turba -insumo tradicional del diseño original de los SBP- por una alternativa más sostenible, coherente con los principios de la economía circular y la reducción del impacto ambiental. Asimismo, se consideró la incorporación de la lombriz *E. fetida* para distintos propósitos durante la investigación: como organismo biotransformador tanto en el vermicompostaje de los residuos orgánicos, así como en la vermirremediación de biomezclas, como bioindicador en ensayos ecotoxicológicos y como organismo para la evaluación de daños subletales a través de biomarcadores tales como biomasa, contenido de proteínas, actividad enzimática y lesiones tisulares.

Los hallazgos de mayor relevancia obtenidos en esta Tesis se detallan a continuación:

- Es posible estabilizar de manera eficiente residuos agropecuarios y urbanos (cama de pollo, aserrín de eucalipto y lodos activados cloacales), dando lugar a dos mezclas diferentes (sin -C1- y con lodos -C2-). Las mezclas cumplieron con los estándares nacionales para sustratos estabilizados. La presencia de lodos activados en la mezcla impactó en una mayor actividad biológica inicial, respecto a C1. El período de estabilización propició el aumento de esta actividad en ambos casos.
- Los sustratos estabilizados resultaron altamente palatables para *E. fetida*, habilitando su vermicompostaje, durante el cual se registró un fuerte aumento poblacional y de biomasa, especialmente en la mezcla con lodos. El vermicompostaje permitió homogeneizar los sustratos, mejorar sus propiedades fisicoquímicas y sostener la actividad biológica benéfica, obteniéndose vermicompost estables, libres de patógenos y con características fisicoquímicas similares entre sí (V-C1 y V-C2).
- Los sustratos generados contaron con propiedades favorables para la formulación de biomezclas que sustituyan el uso de turba (suelo, rastrojo y vermicompost), ya que presentaron mayor contenido de materia orgánica y actividad biológica respecto a la biomezcla de referencia.
- Las biomezclas exhibieron un alto potencial para la adsorción y degradación de los plaguicidas seleccionados, logrando disipaciones superiores al 97-99 %, en la mayoría de los casos y en tiempos más cortos cuando las biomezclas incluían vermicompost.

- Las biomezclas con vermicompost mantuvieron una mayor actividad biológica total a lo largo del tiempo, lo que favoreció la degradación de los plaguicidas. La incorporación de vermicompost ayudó al mejor desempeño de las biomezclas, no solo en relación con su función principal, la remoción de los plaguicidas, sino también en la obtención de biomezclas agotadas sin efectos tóxicos, aptas para reutilizar.
- Las biomezclas que contenían vermicompost degradaron en promedio el 98% de los plaguicidas más recalcitrantes (IMI y CIP) y más del 99% de ACE y DIM.
- El estudio cinético reveló que la disipación de los plaguicidas pudo describirse adecuadamente mediante modelos de primer orden y bifásico, indicando la coexistencia de etapas de rápida y lenta degradación, fuertemente influenciadas por la materia orgánica del sustrato y por las características fisicoquímicas de cada compuesto. Todos los  $DT_{50}$  de los plaguicidas en las biomezclas que incorporaban vermicompost fueron más bajos que para la biomezcla de referencia. Del mismo modo, las constantes de velocidad de degradación fueron más elevadas en SRV-C1 y SRV-2.
- El estudio y la comprensión de los mecanismos de adsorción fue fundamental para interpretar la dinámica de las moléculas de los plaguicidas a medida que se desplazan a través de la biomezcla.
- Se obtuvieron las isothermas de adsorción de los plaguicidas, muchas de las cuales mostraron curvas sigmoideas, revelando un efecto dual cooperativo e inhibitorio, marcadamente influenciado por la polaridad y solubilidad de cada plaguicida. La ecuación de Freundlich proporcionó de forma más consistente una descripción adecuada de las isothermas experimentales, mientras que la ecuación de Hill ofreció un ajuste muy bueno en casos donde ocurrió adsorción cooperativa.
- La identificación de correlaciones entre la adsorción de los plaguicidas en las biomezclas y su eficiencia de degradación es clave para interpretar la retención y biodisponibilidad de los plaguicidas. Esto habilita el uso de parámetros de adsorción y de cinéticas de degradación como indicadores predictivos para mejorar el funcionamiento de los SBP.
- Se evidenciaron efectos sinérgicos interesantes para la adsorción de tres plaguicidas (ACE, CIP y DIM) cuando todos estaban presentes en la solución y solo el IMI mostró una pequeña disminución (efecto antagonista) en la efectividad de la remoción a partir de la solución multisoluta. La remoción del 2,4-D no se vio afectada por la presencia del resto de los plaguicidas.

- La incorporación de *E. fetida* en las biomezclas permitió evaluar la posibilidad de aplicar la vermirremediación para una mezcla de plaguicidas compleja. Únicamente la biomezcla SRV-C2 frente a la de referencia fue apta para la incorporación de las lombrices.
- Si bien las lombrices sobrevivieron sin mortalidad en SRV-C2, se registraron efectos subletales dependientes de la biomezcla y de las concentraciones remanentes de plaguicidas y/o sus metabolitos, reflejados en cambios de biomasa y en biomarcadores enzimáticos. No obstante, estos efectos fueron compatibles con la permanencia y actividad de los individuos, lo que respalda la viabilidad de la vermirremediación como una etapa final complementaria, orientada a sostener la calidad biológica de biomezclas ya utilizadas.

En conjunto, los resultados de esta Tesis demuestran que la integración de vermicompostaje, biopurificación y vermirremediación constituye una estrategia robusta y ambientalmente sostenible para la mitigación de la contaminación por plaguicidas, al tiempo que promueve la valorización de residuos orgánicos locales. Este enfoque contribuye de manera concreta al diseño de tecnologías de saneamiento más circulares, resilientes y adaptadas a contextos productivos regionales, con potencial transferencia a sistemas reales y relevancia para la formulación de políticas de gestión ambiental y residuos.

## **Anexo I: Cuantificación de plaguicidas en matrices sólidas**

La cuantificación de los plaguicidas en estas matrices se realizó en el Programa de Investigación y Análisis de Residuos de Pesticidas (PRINARC, FIQ-UNL). Los patrones analíticos de los plaguicidas se adquirieron principalmente de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg; Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; USA) y ChemService (West Chester, PA; USA).

Para los estudios de validación, se prepararon soluciones estándar de trabajo a una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup>, se almacenaron a -20 °C en viales de ámbar y se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Para la preparación de la fase móvil, el formiato de amonio (FNH<sub>4</sub>), el acetato de amonio (AcNH<sub>4</sub>), el ácido fórmico (98%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; EE.UU.), el metanol (MeOH) y el acetonitrilo (MeCN) se compraron a Fisher Chemical (Geel, Bélgica) y eran de grado Optima®, y el agua desionizada se produjo con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.). Para la preparación de muestras se obtuvo sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), cloruro de sodio (NaCl) y acetonitrilo de grado HPLC (MeCN) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; Estados Unidos). Todos los demás insumos utilizados eran del mejor grado analítico disponible comercialmente.

La determinación de los plaguicidas objetivo de LC se realizó con un sistema Acquity UPLC® (Waters, Milford, MA, EE. UU.) equipado con una columna Acquity UPLC® BEH C18 Shield (100 × 2,1mm × 1,7µm) y acoplado a un analizador de masas de triple cuadrupolo TQD (Waters, Milford, MA, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). El plaguicida susceptible de GC se determinó utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890B acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 7000C de triple cuadrupolo (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y la separación cromatográfica se realizó mediante una columna capilar HP-5MS de fenilmetilsiloxano al 5% (30m x 250µm x 0,25µm, Agilent Technologies). Los parámetros y condiciones instrumentales específicos empleados en cada una de las diferentes determinaciones se presentan en las Tablas 16-21.

**Tabla 16.** Condiciones UHPLC-MS/MS para la determinación de plaguicidas.

HPLC	Waters Acquity UPLC® system
MS	Waters TQD
Tipo de columna	Acquity UPLC® BEH C18 Shield (100 × 2,1 mm × 1,7 µm)
Temperatura de la columna	40°C
Fase móvil A (agua)	5mM formiato de amonio con 0,1% ácido fórmico
Fase móvil B (metanol)	5mM formiato de amonio con 0,1% ácido fórmico

Gradiente de la fase móvil	0 min – 0,4mL/min – 10% B
	1 min – 0,35mL/min – 50% B
	11 min – 0,45mL/min – 95% B
	12 min – 0,7mL/min – 95% B
	14 min – 0,7mL/min – 95% B
	16 min – 0,3mL/min – 10% B
Volumen de inyección	5 µL
Temperatura del muestreador automático	5°C
Modo de ionización	ESI + / ESI -
Voltaje capilar	1 kV
Temperatura de la fuente	120°C
Temperatura de desolvatación	350°C
Flujo de gas de desolvatación (N <sub>2</sub> )	800 L/h
Flujo de gas de cono (N <sub>2</sub> )	150 L/h
Flujo de gas de colisión (Ar)	0,14 mL/min

**Tabla 17.** Condiciones GC-MS/MS para la determinación de plaguicidas.

GC	Agilent 7890B
MS	Agilent 7000C triple cuadrupolo
Tipo de columna	Agilent HP-5MS 5% columna capilar de fenilmetilsiloxano (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Gas portador	Helium 99,999%
Flujo portador (fijo)	1 mL/min
Gradiente de temperatura	0 min – 60°C
	3,7 min – 170°C – 40°C/min
	17,7 min – 310°C – 10°C/min
	20,7 min – 310°C
Volumen de inyección	1 µL
Modo de inyección	Splitless
Temperatura del inyector	280°C
Temperatura del muestreador automático	Ambiente
Temperatura de la línea de transferencia MS	280 °C
Modo de ionización	EI 70eV

**Tabla 18.** UHPLC-ESI-MS/MS condiciones: ion precursor y ion producto de transición del cuantificador y del calificador y su respectiva energía de colisión (CE). Voltaje del cono (CV) y modo de electrospray de ionización (ESI) positivo (+) o negativo (-).

COMPUESTO	Transición del cuantificador	CE (V)	Calificador transición	CE (V)	CV (V)	ESI
2,4-D	219 > 161	15	219 > 163	16	25	-
Acetoclor	270 > 148	20	270 > 224	16	20	+

Dimetoato	230,1 > 125	20	230,1 > 199	10	18	+
Imidacloprid	256,1 > 175,1	17	256,1 > 209,1	15	25	+

**Tabla 19.** GC-EI-MS/MS condiciones: ion precursor y ion producto de la transición del cuantificador y calificador I y II, y su respectiva energía de colisión (CE).

COMPUESTO	Transición del cuantificador	CE (V)	Clasificadorio I transición	CE (V)	Clasificadorio II transición	CE (V)
Cipermetrina	162,9 > 127	5	181,1 > 127,1	35	181 > 152	30

La extracción de plaguicidas del suelo (S) y el material de biomezclas (SRV-C1, SRV-C2 y SR) se realizó de la siguiente manera (Tablas 20 y 21).

**Tabla 20.** Pasos detallados de los procedimientos analíticos para la determinación de acetoclor, cipermetrina, dimetoato e imidacloprid.

	QuEChERS método original modificado
Cantidad de muestra (g)	2
Disolvente de remojo (mL)	0,2 % ácido fórmico en agua (10)
Mezcla	30 s por vortex
Tiempo de remojo	30 min
Disolvente extractante (mL)	Acetonitrilo 1% CH <sub>3</sub> COOH (10)
Mezcla	1 min por vortex
Sales de partición líquido-líquido (g)	Anhidro MgSO <sub>4</sub> (3) y NaCl (1)
Mezcla	3 min por vortex
Centrifugación	5 min a 2500 rpm
Sorbentes dispersivos de SPE (mg) por ml de extracto	Anhidro MgSO <sub>4</sub> (150), C18 (50) y amina secundaria primaria (PSA) (50)
Agitación manual vigorosa	3 min
Centrifugación	5 min a 2500 rpm
Extracto final	Filtre el extracto de 1 ml a través del filtro de PTFE de 0,22 mm para el análisis UPLC-MS/MS. Evaporado hasta la sequedad 1 ml y reconstituido en acetato de etilo para el análisis GC-MS/MS.

**Tabla 21.** Etapas detalladas de los procedimientos analíticos para la determinación de 2,4 D.

	Extracción con disolventes
Cantidad de muestra (g)	2,5
Disolvente de remojo (mL) <sup>(1)</sup>	Agua (0,5) pH = 1 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 9 M)
Mezcla <sup>(2)</sup>	30 s por vortex
Disolvente extractante (mL) <sup>(3)</sup>	Diclorometano (7,5)

Mezcla <sup>(4)</sup>	30 min por agitador
Centrifugación <sup>(5)</sup>	5 min a 2500 rpm
Re-extracción	Repita los pasos 1-5
Extracto final	Evaporado hasta la sequedad, reconstituir en agua ácido acético al 0,2% y filtrar a través de un filtro de PTFE de 0,22 mm para UPLC-MS/MS.

---

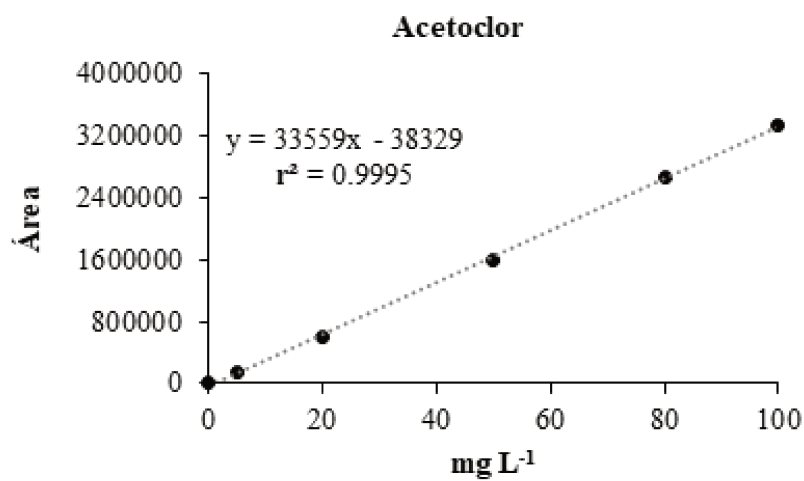
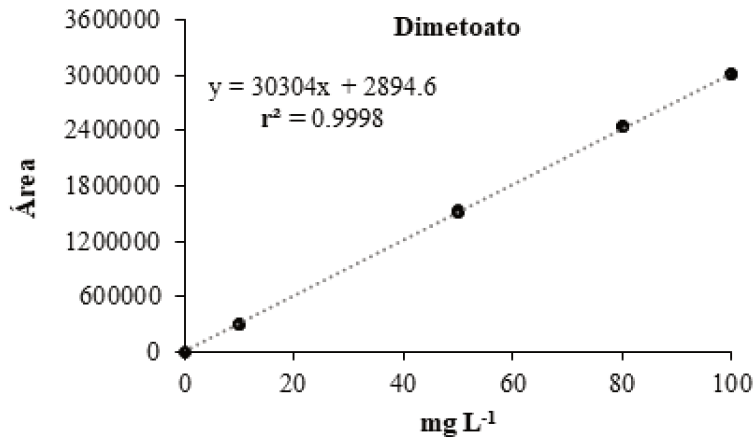
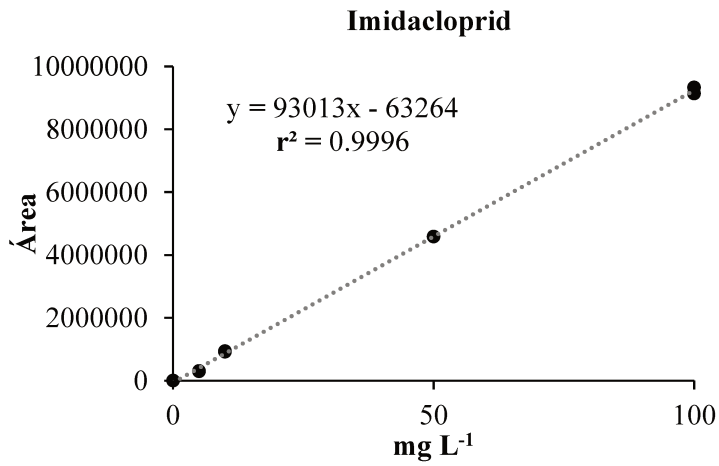
La validación se llevó a cabo determinando la recuperación, la selectividad, los límites de cuantificación, la linealidad, la precisión y la exactitud. La recuperación de cada plaguicida se determinó en 3 réplicas a 3 niveles de concentración, comparando las áreas máximas de cada plaguicida de muestras estándar con las de: (1) muestras en blanco extraídas, enriquecidas con las mismas cantidades de los compuestos y luego tratadas como se describió anteriormente (ensayo de recuperación); (2) y para comprobar el posible efecto de la matriz en la ionización ESI (LC-MS/MS) y en el sistema de GC, las muestras en blanco extraídas se trataron como se ha descrito anteriormente y luego se añadieron con las mismas cantidades de cada plaguicida (estándares de matriz coincidente). El porcentaje promedio de recuperaciones estuvo entre el 70 y el 120%, con una desviación estándar relativa (DSR) inferior al 20% para todos los casos. Para comprobar la selectividad del método, se ensayaron extractos de muestras en blanco y enriquecidas. El límite de cuantificación (LOQ) se estimó inyectando un número de extractos de muestras en blanco (n=6) y midiendo la magnitud de la respuesta de fondo como diez veces la relación señal-ruido (S/N). Finalmente, el LOQ se estableció como la concentración más baja que podía medirse con una precisión intraensayo CV% y un sesgo relativo inferior al 20%. La precisión se expresó como % RSD y la exactitud se calculó a través del error relativo (% RE). Tabla 21.

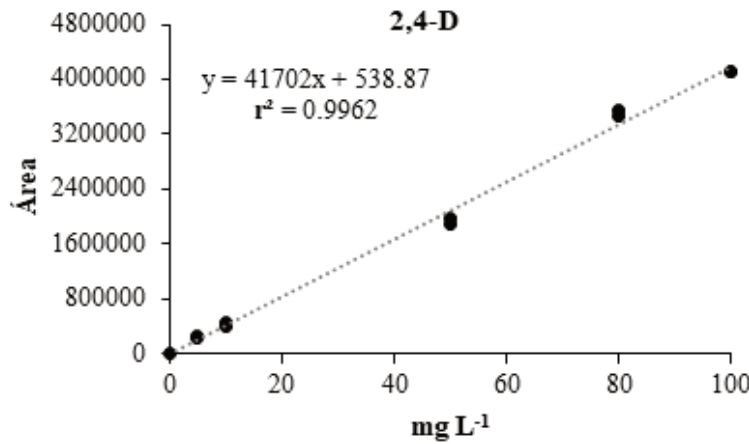
**Tabla 22.** Resultados de la validación analítica. Porcentajes de recuperación obtenidos para los plaguicidas determinados a tres niveles de concentración.

PLAGUICIDAS	S	SRV-C1			SRV-C2			SR				
	Nivel de concentración			Nivel de concentración			Nivel de concentración			Nivel de concentración		
	(mg/kg)			(mg/kg)			(mg/kg)			(mg/kg)		
	0.1 (LOQ)	10	80	0.1 (LOQ)	10	80	0.1 (LOQ)	10	80	0.1 (LOQ)	10	80
%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)	%Rec (RSD) (n=3)
2,4- D	72 (12)	69 (10)	65 (18)	73 (15)	82 (6)	85 (15)	82 (19)	77 (15)	81 (20)	69 (17)	67 (21)	68 (20)
Acetoclor	75 (13)	65 (22) (1)	70 (20) (2)	115 (20)	105 (9) (1)	110 (8) (2)	103 (21)	98 (12) (1)	110 (9) (2)	65 (20)	71 (20) (1)	77 (13) (2)
Dimetoato	72 (12)	81 (13)	70 (17)	101 (20)	110 (14)	109 (17)	83 (17)	89 (11)	112 (20)	68 (19)	80 (13)	101 (12)
Imidacloprid	95 (9)	90 (17)	95 (20) (3)	114 (21)	105 (12)	97 (20) (3)	98 (14)	87 (9)	98 (17) (3)	89 (12)	91 (13)	102 (9) (3)
Cipermetrina	86 (13)	79 (11)	70 (19)	118 (17)	110 (13)	102 (11)	104 (11)	97 (12)	92 (11)	86 (17)	81 (17)	97 (12)

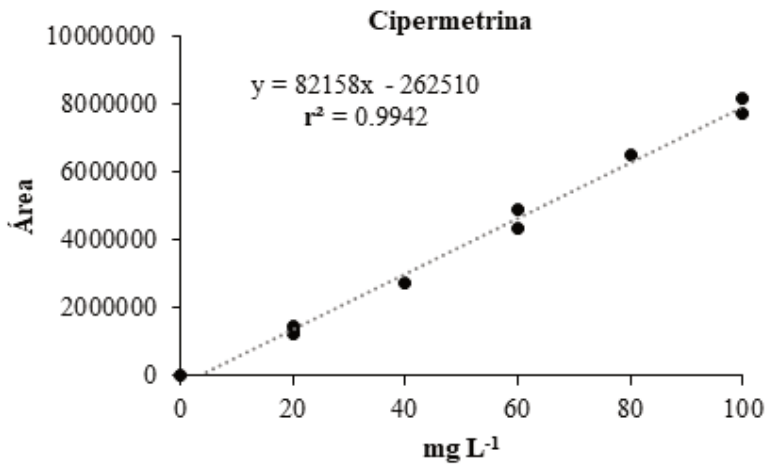
(1) Nivel de concentración: 50 mg kg<sup>-1</sup>  
(2) Nivel de concentración: 120 mg kg<sup>-1</sup>  
(3) Nivel de concentración: 30 mg kg<sup>-1</sup>

**Anexo II: Curvas de calibrado en matriz líquida de los plaguicidas seleccionados**





<b>LOD</b>	6,773 mg L <sup>-1</sup>
<b>LOQ</b>	20,526 mg L <sup>-1</sup>

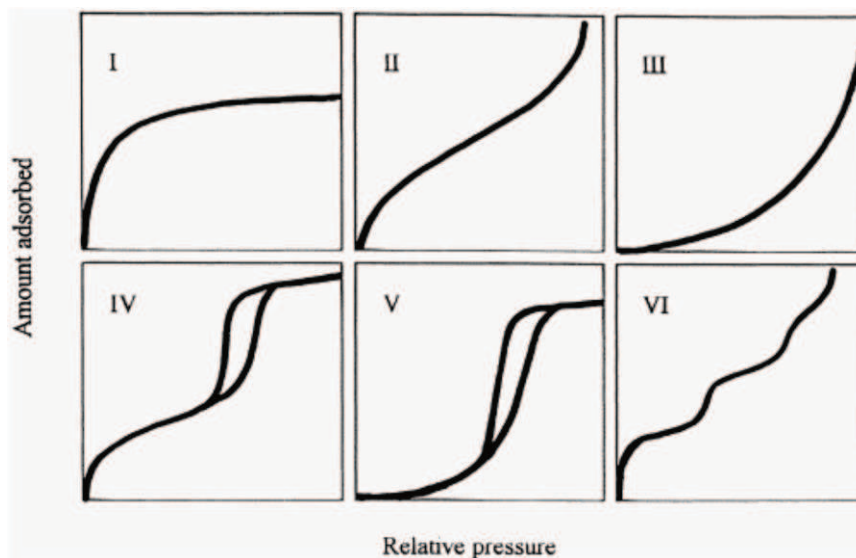


<b>LOD</b>	13,078 mg L <sup>-1</sup>
<b>LOQ</b>	39,631 mg L <sup>-1</sup>

**Figura 37.** Curvas de calibrado obtenidas para cada plaguicida. A la derecha se informan las cifras de mérito obtenidas para cada curva de calibrado: LOD (límite de detección) y LOQ (límite de cuantificación). Dentro de las gráficas se presenta la ecuación de la recta de regresión lineal junto al coeficiente de determinación  $r^2$ .

### **Anexo III: Clasificación de las isotermas de adsorción**

La clasificación de las isotermas de adsorción se basa en el tamaño medio de poros del adsorbente y la intensidad de las interacciones adsorbato-adsorbente. En la Figura 38 se muestra la clasificación IUPAC, correspondiente al equilibrio gas/sólido. En la Tabla 23 se encuentra la descripción de cada tipo de isoterma graficada.



**Figura 38.** Ilustración de la clasificación de las isotermas de adsorción según sus diferentes formas. Imagen recuperada de Inglezakis et al. (2018).

**Tabla 23.** Descripción de cada tipo de isoterma (Crini et al., 2019; Inglezakis et al., 2018).

<b>Tipo de isoterma</b>	<b>Forma de la curvatura</b>	<b>Descripción</b>
<b>Tipo I</b>	Convexo hacia arriba	Caracterizado por una meseta horizontal en la que se mantiene para presiones /concentraciones muy altas, y puede describirse mediante la ecuación de Langmuir
<b>Tipo II</b>	En forma de S con un punto de inflexión	Describe la adsorción en materiales mesoporosos, en monocapa a baja presión/concentración y en multicapa a alta presión/concentración cerca de la saturación, sin histéresis. También, se observa en sólidos microporosos, no porosos o dispersos con diámetro de poro > 50 nm.
<b>Tipo III</b>	Cóncavo hacia arriba	ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbato es grande en

		comparación con la interacción adsorbato-adsorbente.
<b>Tipo IV</b>	Dos puntos de inflexión y un bucle de histéresis	describe la adsorción en materiales mesoporosos que exhiben un bucle de histéresis asociado al llenado y vaciado de los poros por condensación capilar (adsorción/desorción).
<b>Tipo V</b>	En forma de S con un punto de inflexión y bucle de histéresis	Similar al anterior. Indica la presencia de mesoporos de baja afinidad y exhiben el bucle de histéresis por el cambio de fase por condensación capilar en los poros.
<b>Tipo VI</b>	Varios puntos de inflexión	Corresponde a superficies no porosas homogéneas. Las isotermas presentan adsorción en multicapa escalonada.

**Anexo IV: Análisis estadístico: ANOVA- Modelo lineal general-  
Comparaciones por parejas “ad hoc”.**

a. *Capítulo 1 – Sección 1.5.2.1- Figura 9. Salida de Minitab*

Comparaciones para FDA			
Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = FDA, Término = Tiempo(Mezcla)			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Tiempo (Mezcla)	N	Media	Agrupación
45 (C2)	3	362,423	A
45 (C1)	3	342,384	A B
60 (C2)	3	324,209	A B
15 (C2)	3	314,141	A B C
60 (C1)	3	289,471	B C D
15 (C1)	3	265,839	C D E
30 (C2)	3	261,889	C D E
30 (C1)	3	247,842	D E F
1 (C2)	3	243,472	D E F
0 (C2)	3	227,264	E F G
75 (C1)	3	200,748	F G H
1 (C1)	3	177,613	G H
75 (C2)	3	160,925	H
0 (C1)	3	91,335	I

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Figura 39.** Comparaciones por pareja de Tukey para FDA, tiempo y mezcla.

**Tabla 24.** Análisis de Varianza Figura 39.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Mezcla	1	16691	16691,4	51,44	0,000
Tiempo (mezcla)	12	205541	17128,4	52,79	0,000
Error	28	9085	324,5		
Total	41	231317			

**Tabla 25.** Resumen del Modelo Figura 39.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
18,0127	96,07 %	94,25 %	91,16 %

b. Capítulo 1- Sección 1.5.4 -Figura 12. Salida de Minitab

<b>Comparaciones por parejas de Tukey Respuesta = FDA, Término = Tratamiento</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
SRV-C1	3	119,289	A
SRV-C2	3	93,814	A
SR	3	82,917	A
S	3	30,149	B
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 40.** Comparaciones por pareja de Tukey para FDA, tiempo y sustrato.

**Tabla 26.** Análisis de Varianza Figura 40.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	12656	4218,6	10,18	0,004
Error	8	3315	414,3		
Total	11	15970			

**Tabla 27.** Resumen del Modelo Figura 40.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
20,3550	79,25 %	71,46 %	53,30 %

<b>Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = FOX, Término = Tratamiento</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
SR	3	1,42536	A
S	3	1,11751	B
SRV-C1	3	0,39034	C
SRV-C2	3	0,31295	C
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 41.** Comparaciones por pareja de Tukey para FOX, tiempo y sustrato.

**Tabla 28.** Análisis de Varianza Figura 41.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	2,68917	0,896391	204,42	0,000
Error	8	0,03508	0,004385		
Total	11	2,72425			

**Tabla 29.** Resumen del Modelo Figura 41.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
0,0662199	98,71 %	98,23 %	97,10 %

c. Capítulo 2- Sección 2.5.2.1 -Figura 20. Salida de Minitab

Comparaciones por parejas de Fisher: Respuesta = Hidrólisis FDA, Término = Tiempo(Biomezcla)			
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%			
Tiempo (Biomezcla)	N	Media	Agrupación
56 (SRV-C2)	3	129.329	A
56 (SRV-C1)	3	129.005	A
s/f (SRV-C1)	3	119.289	A B
0 (SRV-C1)	3	108.580	B C
14 (SRV-C2)	3	97.323	C D
14 (SRV-C1)	3	93.627	C D
s/f (SRV-C2)	3	92.543	C D
0 (SRV-C2)	3	86.849	D E
56 (SR)	3	86.702	D E
s/f (SR)	3	82.917	D E
119 (SRV-C1)	3	68.994	E F
119 (SRV-C2)	3	50.082	F G
14 (SR)	3	43.072	G H
119 (SR)	3	42.150	G H
0 (SR)	3	36.359	G H I
s/f (S)	3	30.149	H I
0 (S)	3	18.008	I J
56 (S)	3	7.959	J
14 (S)	3	6.514	J
119 (S)	3	3.149	J
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 42.** Comparaciones por pareja de Fisher para FDA, tiempo y sustrato.

**Tabla 30.** Análisis de Varianza Figura 42.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Biomezcla	3	73857	24619.0	174,06	0,000
Tiempo (biomezcla)	16	24858	1556,6	10,98	0,000
Error	40	5658	141,4		
Total	59	104373			

**Tabla 31.** Resumen del modelo Figura 42.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
11,8929	94,58 %	92,00 %	87,80 %

**d. Capítulo 4 – Sección 4.5.2.- Figura 31. Salida de Minitab**

**Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = hidrólisis FDA, Término = Tiempo(Biomezcla)**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo(Biomezcla)	N	Media	Agrupación
7 (SRV)	6	91,8905	A
184 (SRV)	6	83,8389	A B
0 (SR)	6	83,2798	A B
119 (SRV)	6	83,0066	A B
0 (SRV)	6	81,8128	A B
35 (SRV)	6	76,4687	A B C
7 (SR)	6	76,2298	A B C
77 (SRV)	6	74,6777	A B C D
119 (SR)	6	66,4312	B C D E
184 (SR)	6	62,2704	C D E F
77 (SR)	6	58,1824	D E F
35 (SR)	6	55,6903	E F G
254 (SRV)	6	47,1476	F G H
223 (SR)	6	38,7690	G H I
246 (SR)	6	32,1839	H I
246 (SRV)	6	31,0009	H I
254 (SR)	6	28,3041	I
223 (SRV)	6	27,8570	I

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Figura 43.** Comparaciones por pareja de Tukey para FDA, tiempo y mezcla

**Tabla 32.** Análisis de Varianza Figura 43.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Biomezcla	1	3095	3095,06	42,65	0,000
Tiempo (Biomezcla)	16	46099	2881,21	39,70	0,000
Error	90	6532	72,58		
Total	107	55726			

**Tabla 33.** Resumen del modelo Figura 43.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
8,51922	88,28 %	88,06 %	83,127 %

e. Capítulo 4 - Sección 4.5.2.- Figura 32. Salida de Minitab

<b>Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = ALP, Término = Tiempo(Biomezcla)</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Tiempo(Biomezcla)	N	Media	Agrupación
119(SRV)	4	125.291	A
246(SRV)	4	115.436	A B
254(SRV)	4	104.201	B C
223(SR)	4	86.781	C D
35(SR)	4	83.201	D
223(SRV)	4	82.949	D
0(SR)	4	70.430	D E
7(SR)	4	67.537	D E
35(SRV)	4	59.185	E F
246(SR)	4	58.759	E F
254(SR)	4	55.528	E F
0(SRV)	4	46.061	F
119(SR)	4	45.954	F
77(SRV)	4	45.045	F
77(SR)	4	44.999	F
7(SRV)	4	43.452	F
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 44.** Comparaciones por pareja de Tukey para FA, tiempo y mezcla

**Tabla 34.** Análisis de Varianza Figura 44

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Biomezcla	1	2939	2939,25	51,16	0,000
Tiempo (Biomezcla)	14	38917	2779,77	48,38	0,000
Error	48	2758	57,45		
Total	63	44614			

**Tabla 35.** Resumen del Modelo Figura 44.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
7,57969	93,82 %	91,89 %	89,01 %

f. Capítulo 4 - Sección 4.5.3.1- Figura 34. Salida de Minitab

<b>Comparaciones para BS</b>			
<b>Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = BS, Término = DIA</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
DIA	N	Media	Agrupación
0	4	0.524250	A
7	4	0.441667	A B
34	4	0.434167	A B
79	4	0.400750	B
107	4	0.212133	C
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 45.** Comparaciones por pareja de Tukey para BS y tiempo.

**Tabla 36.** Análisis de Varianza Figura 45.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día	4	0,21441	0,053602	19,10	0,000
Error	15	0,04210	0.002807		
Total	19	0,25651			

**Tabla 37.** Resumen del Modelo Figura 45.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
0,0529803	83,59 %	79,21 %	70,82 %

<b>Comparaciones para PT</b>			
<b>Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = PT, Término = DIA</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
DIA	N	Media	Agrupación
34	4	0.0999796	A
7	4	0.0665683	B
107	4	0.0621852	B C
0	4	0.0499758	B C
79	4	0.0429263	C
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 46.** Comparaciones por pareja de Tukey para PT y tiempo.

**Tabla 38.** Análisis de Varianza Figura 46.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día	4	0,007779	0,001945	18,18	0,000
Error	15	0,001605	0,000107		
Total	19	0,009383			

**Tabla 39.** Resumen del Modelo Figura 46.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
0,0103430	82,90 %	78,34 %	69,60 %

Capítulo 4- Sección 4.5.3.1- Figura 35. Salida de Minitab

<b>Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = ACHE, Término = TIEMPO</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
TIEMPO	N	Media	Agrupación
0	3	0,473045	A
79	3	0,460082	A
107	3	0,434051	A
7	3	0,408606	A B
34	3	0,297176	B
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 47.** Comparaciones por pareja de Tukey para AChE y tiempo.

**Tabla 40.** Análisis de Varianza Figura 47.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	4	0,05906	0,014765	7,43	0,005
Error	10	0,01988	0,001988		
Total	14	0,07894			

**Tabla 41.** Resumen del Modelo Figura 47.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
0,0445890	74,81 %	64,74 %	43,33 %

<b>Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = CAT, Término = TIEMPO</b>			
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
TIEMPO	N	Media	Agrupación
0	3	0,954572	A
34	3	0,729851	B
107	3	0,705003	B
7	3	0,678385	B
79	3	0,351465	C
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

**Figura 48.** Comparaciones por pareja de Tukey para CAT y tiempo.

**Tabla 42.** Análisis de Varianza Figura 48.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	4	0,55909	0,139773	30,84	0,000
Error	10	0,04533	0,004533		
Total	14	0,60442			

**Tabla 43.** Resumen del Modelo Figura 47.

S	R-cuad.	R-cuad. Ajustado	R-cuad. Pred.
0,0673253	92,50 %	89,50 %	83,13 %

## Bibliografía

- Acosta-Sánchez, A., Soto-Garita, C., Masis-Mora, M., Cambroner-Heinrichs, J. & Rodríguez-Rodríguez, C. (2020). Impaired pesticide removal and detoxification by biomixtures during the simulated pesticide application cycle of a tropical agricultural system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195, 110460. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110460>.
- Adam, G. & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7–8), 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3).
- Agarwal, P., Saha, S. & Hariprasad, P. (2023). Agro-industrial-residues as potting media: physicochemical and biological characters and their influence on plant growth. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(11), 9601–9624. Springer. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01998-6>.
- Aguado, S., Cotler, H., Astier, M. & Padilla-Rivera, A. (2025). Evaluation Methodologies for Circular Economy in Municipal Composting and Urban Agriculture: A Literature Review with Focus on Latin America. *Circular Economy and Sustainability*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s43615-025-00582-8>.
- Aguilar-Paredes, A., Valdés, G., Araneda, N., Valdebenito, E., Hansen, F. & Nuti, M. (2023). Microbial Community in the Composting Process and Its Positive Impact on the Soil Biota in Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 13(2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020542>.
- Aihemaiti, A., Jiang, J., Li, D., Liu, N., Yang, M., Meng, Y. & Zou, Q. (2018). The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *Journal of Environmental Management*, 222, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>.
- Akpan, S. (2016). Sawdust Briquette: A Renewable Energy for Sustainable Livelihood of Rural Dwellers in Nigeria. *Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries*, 8(1).
- Albaseer, S., Nageswara, R., Swamy, Y. & Mukkanti, K. (2010). An overview of sample preparation and extraction of synthetic pyrethroids from water, sediment and soil. *Journal*

- of Chromatography A*, 1217(35), 5537–5554.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.058>.
- Alfonso, L., Germán, G., María del Carmen, P. & Hossein, G. (2017). Adsorption of organophosphorus pesticides in tropical soils: The case of karst landscape of northwestern Yucatan. *Chemosphere*, 166, 292–299.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.109>
- Al-ghouti, M. & Da, D. (2020). Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122383.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122383>.
- Al-Smadi, B., Al Oran, E. & Abu Hajar, H. (2019). Adsorption-desorption of cypermethrin and chlorfenapyr on Jordanian soils. *Arabian Journal of Geosciences*, 12(15).  
<https://doi.org/10.1007/s12517-019-4614-7>.
- Amin, M., Raza Gurmani, A., Rafique, M., Ullah Khan, S., Mehmood, A., Muhammad, D. & Hussain Syed, J. (2021). Investigating the degradation behavior of Cypermethrin (CYP) and Chlorpyrifos (CPP) in peach orchard soils using organic/inorganic amendments. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5890–5896.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.035>.
- Amrutha, Jeppu, G., Girish, C., Prabhu, B. & Mayer, K. (2023). Multi-component Adsorption Isotherms: Review and Modeling Studies. *Environmental Processes*, 10(2).  
<https://doi.org/10.1007/s40710-023-00631-0>.
- Anastassiades, M. & Lehotay, S. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal Of AOAC International*, 86(2), 412–429. <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/86/2/412/5656996>.
- Andrade-Herrera, M., Escalona-Segura, G., González-Jáuregui, M., Reyna-Hurtado, R., Vargas-Contreras, J. & Rendón-von Osten, J. (2019). Presence of Pesticides and Toxicity Assessment of Agricultural Soils in the Quintana Roo Mayan Zone, Mexico Using Biomarkers in Earthworms (*Eisenia fetida*). *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3), 1–13.  
<https://doi.org/10.1007/s11270-019-4105-1>.
- Aparicio, V., De Gerónimo, E., Hernández Guijarro, K., Pérez, D., Portocarrero, R. & Vidal, C. (2015). *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente* 1ed.). Ediciones INTA. ISBN 978-987-521-665-5. [Accedido el 13 de Mayo de 2025].

- Azizi Yeganeh, M., Shahabi, A., Ebadi, A. & Abdoosi, V. (2024). Vermicompost as an alternative substrate to peat moss for strawberry (*Fragaria ananassa*) in soilless culture. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04807-0>.
- Bahi, A., Sauvage, S., Payraudeau, S., Imfeld, G., Sánchez-Pérez, J. M., Chaumet, B. & Tournebize, J. (2023). Process formulations and controlling factors of pesticide dissipation in artificial ponds: A critical review. *Ecological Engineering*, 186. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106820>.
- Bedmar, F., Daniel, P., Costa, J. & Giménez, D. (2011). Sorption of acetochlor, S-metolachlor, and atrazine in surface and subsurface soil horizons of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(9), 1990–1996. <https://doi.org/10.1002/etc.602>.
- Belmeskine, H., Ouameur, W., Dilmi, N. & Aouabed, A. (2020). The vermicomposting for agricultural valorization of sludge from Algerian wastewater treatment plant: impact on growth of snap bean *Phaseolus vulgaris* L. *Heliyon*, 6(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04679>.
- Beltrán-Flores, E., Sarrà, M. & Blánquez, P. (2024). A review on the management of rinse wastewater in the agricultural sector. *Chemosphere*, 352. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141283>.
- Ben Salem, A., Chaabane, H., Caboni, P., Angioni, A., Salghi, R. & Fattouch, S. (2019). Environmental Fate of Two Organophosphorus Insecticides in Soil Microcosms under Mediterranean Conditions and Their Effect on Soil Microbial Communities. *Soil and Sediment Contamination*, 28(3), 285–303. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1564733>.
- Bhatt, P., Rene, E., Huang, Y., Wu, X., Zhou, Li, J., Kumar, A., Sharma. & Chen, S. (2022). Indigenous bacterial consortium-mediated cypermethrin degradation in the presence of organic amendments and Zea mays plants. *Environmental Research*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113137>.
- Biabani, A., Carpenter-Boggs, L., Gholizadeh, A., Vafaie-Tabar, M. & Omara, M. (2018). Reproduction Efficiency of *Eisenia foetida* and Substrate Changes During Vermicomposting of Organic Materials. *Compost Science and Utilization*, 26(3), 209–215. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2018.1463877>.
- Boivin, A., Amellal, S., Schiavon, M. & Van Genuchten, M. (2005). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental Pollution*, 138(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.016>.

- Bose, S., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Rajamohan, N. & Saravanan, R. (2021). Microbial degradation of recalcitrant pesticides: a review. In *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3209-3228. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01236-5>
- Briceño, G., Tortella, G., Rubilar, O., Palma, G. & Diez, C. (2014). Advances in Chile for the Treatment of Pesticide Residues: Biobeds Technology. In A. Alvarez & M. Polti (Eds.), *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives* (pp. 1–308). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5>.
- Broznić, D. & Milin, Č. (2013). Mathematical prediction of imidacloprid persistence in two Croatian soils with different texture, organic matter content and acidity under laboratory conditions. *Journal of Environmental Science and Health-Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(11), 906–918. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.816561>.
- Buivyditė, Ž., Lilja, M., Sapkota, R., Hansen, B., Ellegaard-Jensen, L., Hendriksen, N., Krogh, P. & Winding, A. (2023). Earthworms shape prokaryotic communities and affect extracellular enzyme activities in agricultural soil. *European Journal of Soil Biology*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2023.103474>.
- Cáceres, R., Magrí, A. & Marfà, O. (2015). Nitrification of leachates from manure composting under field conditions and their use in horticulture. *Waste Management*, 44, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.039>.
- Cai, X., Sheng, G. & Liu, W. (2007). Degradation and detoxification of acetochlor in soils treated by organic and thiosulfate amendments. *Chemosphere*, 66(2), 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.011>.
- Casadinho, J. (2018). Informe sobre los plaguicidas altamente peligrosos en la Argentina. In *IPEN; RAP-AL*.
- Castillo Diaz, J., Martin-Laurent, F., Beguet, J., Nogales, R. & Romero, E. (2017). Fate and effect of imidacloprid on vermicompost-amended soils under dissimilar conditions: Risk for soil functions, structure, and bacterial abundance. *Science of the Total Environment*, 579, 1111–1119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.082>.
- Castillo, M., Stenstrom, J. & Ander, P. (1994). Determination of Manganese Peroxidase Activity with 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone and 3-(Dimethylamino)benzoic Acid. *Analytical Biochemistry*, 218, 399–404.

- Castillo, M. & Torstensson, L. (2007). Effect of Biobed Composition, Moisture, and Temperature on the Degradation of Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5725–5733. <https://doi.org/10.1021/jf0707637>.
- Cessna, A., Knight, J., Ngombe, D. & Wolf, T. (2017). Effect of temperature on the dissipation of seven herbicides in a biobed matrix. *Canadian Journal of Soil Science*, 97(4), 717–731. <https://doi.org/10.1139/cjss-2017-0017>.
- Chao, H., Balcazar, J., Wu, Y., Cai, A., Ye, M., Sun, M. & Hu, F. (2023). Phages in vermicomposts enrich functional gene content and facilitate pesticide degradation in soil. *Environment International*, 179. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108175>.
- Chen, X., Hossain, M., Duan, C., Lu, J., Tsang, Y., Islam, M. & Zhou, Y. (2022). Isotherm models for adsorption of heavy metals from water - A review. *Chemosphere*, 307(P1), 135545. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135545>.
- Chin-pampillo, J., Ruiz-hidalgo, K., Masís-Mora, M., Carazo-rojas, E. & Rodríguez-rodríguez, C. (2015). Design of an optimized biomixture for the degradation of carbofuran based on pesticide removal and toxicity reduction of the matrix. *Environmental Science Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5093-3>.
- Chu, B. & Eivazi, F. (2016). Enhanced Dissipation of Selected Herbicides in a Simulated Organic Matrix Biobed: A System to Control On-Farm Point-Source Pollution. *Journal of Environmental Quality*, 47(2), 221–227. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.04.0124>.
- Córdova-Méndez, E., Góngora-Echeverría, V., González-Sánchez, A., Quintal-Franco, C., Giacomán-Vallejos, G. & Ponce-Caballero, C. (2021). Pesticide treatment in biobed systems at microcosms level under critical moisture and temperature range using an Orthic Solonchaks soil from southeastern Mexico amended with corn husk as support. *Science of the Total Environment*, 772, 145038. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145038>.
- Crini, G., Lichtfouse, E., Wilson, L., Morin-Crini, N., Crini, G., Lichtfouse, E., Wilson, L. (2019). Adsorption-oriented processes using conventional and non-conventional adsorbents for wastewater treatment. *Green Adsorbents for Pollutant Removal*, 23–71. Springer Nature. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-92111-2\\_2](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-92111-2_2).
- Dasgupta, R., Sanyal, S. & Chakravorty, P. (2015). Chronic Toxicity of Cypermethrin, A Pyrethroid Insecticide to Epigeic Earthworm *Eisenia fetida*. *International Journal of Current Research*, 7, 17693–17696. <https://www.researchgate.net/publication/280641159>.

- Dastgheib, S., Karanfil, T. & Cheng, W. (2004). Tailoring activated carbons for enhanced removal of natural organic matter from natural waters. *Carbon*, 42(3), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2003.12.062>.
- De Wilde, T. (2009). *Sorption and degradation of pesticides in Biopurification Systems*. Universiteit Gent. ISBN: 978-90-5989-297-2. [Accedido el 28 de Julio de 2025].
- Delgado-Moreno, L., Bazhari, S., Nogales, R. & Romero, E. (2019). Innovative application of biobed bioremediation systems to remove emerging contaminants: Adsorption, degradation and bioaccessibility. *Science of the Total Environment*, 651, 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.268>.
- Delgado-Moreno, L., Nogales, R. & Romero, E. (2017a). Biodegradation of high doses of commercial pesticide products in pilot-scale biobeds using olive-oil agroindustry wastes. *Journal of Environmental Management*, 204, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.032>.
- Delgado-Moreno, L., Nogales, R. & Romero, E. (2017b). Wastes from the olive oil production in sustainable bioremediation systems to prevent pesticides water contamination. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(11), 2471–2484. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1335-x>.
- Delgado-Moreno, L., Nogales, R. & Romero, E. (2020). Vermiremediation of biomixtures from biobed systems contaminated with pesticides. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/app10093173>.
- Dias, 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. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126038>.
- Dias, L. de A., Itako, A., Gebler, L., Tolentino Júnior, J. B., Pizzutti, I., Fontana, M., Janisch, B. & Niemeyer, J. (2021). Pine Litter and Vermicompost as Alternative Substrates for Biobeds: Efficiency in Pesticide Degradation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 232(7). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05231-y>.
- Dirección Nacional de Desarrollo Foresto Industrial. (2020). *Relevamiento de la Industria de Aserrado 2020*.
- Domingues, V., Priolo, G., Alves, A., Cabral, M. & Delerue-Matos, C. (2007). Adsorption behavior of  $\alpha$ -cypermethrin on cork and activated carbon. *Journal of Environmental*

- Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42(6), 649–654. <https://doi.org/10.1080/03601230701465635>.
- Dubova, L., Cielava, N., Vibornijs, V., Rimkus, A., Alsiņa, I., Muter, O., Strunnikova, N. & Kassien, O. (2020). Evaluation of suitability of treated sewage sludge for maize cultivation. *Key Engineering Materials*, 850, 159–165. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.850.159>.
- Ečimović, S., Velki, M., Mikuška, A., Bažon, J., Kovačić, L., Kristek, S., Jović, J., Nemet, F., Perić, K. & Lončarić, Z. (2022). How the Composition of Substrates for Seedling Production Affects Earthworm Behavior. *Agriculture (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/agriculture12122128>.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V. & Featherstone, R. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7. Pergamon Press Ltd.
- Enebe, M. & Erasmus, M. (2023). Vermicomposting technology-A perspective on vermicompost production technologies, limitations and prospects. In *Journal of Environmental Management*, 345. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118585>.
- Ettiene, G., Bauza, R., Medina, D., Silva, N., Raga, J., Sandoval, L., Quiros, M., Petit, Y., Dorado, I. & Poleo, N. (2013). Validación de un método para la determinación de imidacloprid en frutos de guayabo (*Psidium guajava L.*) empleando dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 30(2), 193–216.
- Feng, J., Sun, J., Xu, J. & Wang, H. (2023). Degradation of acetochlor in soil by adding organic fertilizers with different conditioners. *Soil and Tillage Research*, 228, 105651. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105651>.
- Fernandez, M., Morel, M., Clebot, A., Zalazar, C. & Ballari, M. (2022). Effectiveness of a simple biomixture for the adsorption and elimination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide and its metabolite, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), for a biobed system. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 106877. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106877>.
- Fernández-Bayo, J., Nogales, R. & Romero, E. (2007). Improved retention of imidacloprid (Confidor®) in soils by adding vermicompost from spent grape marc. *Science of the Total Environment*, 378(1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.019>.

- FOCUS, Boesten, J., Aden, K., Beigel, C., Beulke, S., Dust, M., Dyson, J., Fomsgaard, S., Jones, R., Karlsson, S., Van Der Linden, A., Richter, O., Magrans, J. & Soulas, G. (2006). *Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. The Final Report of the Work Group on Degradation Kinetics of FOCUS (FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their USe)*.
- Fossen, M. (2006). Environmental Fate of Imidacloprid. *Departamet of Pesticide Regulationesticide Regulation*, 1–16.
- Fu, X., Huang, K., Chen, X., Li, F. & Cui, G. (2015). Feasibility of vermistabilization for fresh pelletized dewatered sludge with earthworms *Bimastus parvus*. *Bioresource Technology*, 175, 646–650. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.007>.
- Fuentes Godo, P. (2023). *Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo* (1era.ed.) M. Castelán, M. Hack, M. Porta & C. Sotelo (Eds.) EDUENE. [www.eudene.unne.edu.ar](http://www.eudene.unne.edu.ar) [Accedido el 8 de Octubre de 2025].
- Gange, J. (2016). *Cama de pollo en Entre Ríos: Aportes para su uso y manejo* (1era.ed.) INTA Ediciones. [Accedido el 23 de Octubre de 2025].
- Gange, J., Mórtola, N., Almada, N. & Bernigaud, I. (2024). *Aportes para el manejo y uso agronómico de la cama de pollo*. ISSN: 2683-8494. Informes especiales INTA [Accedido el 23 de octubre de 2025].
- Gao, W., Liang, J., Pizzul, L., Feng, X., Zhang, K. & Castillo, M. (2015). Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.008>.
- Georgi, K., Ekaterina, S., Alexander, P., Alexander, R., Kirill, Y. & Andrey, V. (2022). Sewage sludge as an object of vermicomposting. *Bioresource Technology Reports*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101281>.
- Giles, C., MacEwan, T., Nakhwa, S. & Smith, D. (1960). Studies in Adsorption. Part XI.\* A System. *Journal of the Chemical Society*, 846, 3973–3993.
- Gondek, M., Weindorf, D., Thiel, C & Kleinheinz, G. (2020). Soluble Salts in Compost and Their Effects on Soil and Plants: A Review. *Compost Science and Utilization*, 28(2), 59–75). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2020.1772906>.

- Góngora-Echeverría, V., 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. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 9741–9753. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8643-z>.
- Grasserová, A., Hanc, A., Innemanová, P. & Cajthaml, T. (2020). Composting and vermicomposting used to break down and remove pollutants from organic waste: A mini review. *European Journal of Environmental Sciences*, 10(1), 9–14. <https://doi.org/10.14712/23361964.2020.2>.
- Gupta, R. & Garg, V. (2011). Potential and possibilities of vermicomposting in sustainable solid waste management: a review. In *International Journal of Environment and Waste Management*, 7.
- Hackenberger, B., Velki, M., Stepić, S. & Hackenberger, D. (2012). The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. *European Journal of Soil Biology*, 50, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.02.002>.
- Hernández-Soriano, M., Mingorance, M. & Peña, A. (2009). Dissipation of insecticides in a Mediterranean soil in the presence of wastewater and surfactant solutions. A kinetic model approach. *Water Research*, 43(9), 2481–2492. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.016>.
- Hickman, Z. & Reid, B. (2008). Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International*, 34, (7), 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.02.01>.
- Hu, Q., Lan, R., He, L., Liu, H. & Pei, X. (2023). A critical review of adsorption isotherm models for aqueous contaminants: Curve characteristics, site energy distribution and common controversies. *Journal of Environmental Management*, 329, 117104. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117104>.
- Huang, K., Li, F., Wei, Y., Chen, X. & Fu, X. (2013). Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology*, 150, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.006>.
- Hund-Rinke, K. & Wiechering, H. (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *Journal of Soils and Sediments*, 1(1), 15–20. <https://doi.org/10.1065/jss2000.11.004>.

- Ighalo, J., Adeniyi, A. & Adelodun, A. (2021). Recent advances on the adsorption of herbicides and pesticides from polluted waters: Performance evaluation via physical attributes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 93, 117–137). The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.10.011>.
- Inglezakis, V., Pouloupoulos, S. & Kazemian, H. (2018). Insights into the S-shaped sorption isotherms and their dimensionless forms. *Microporous and Mesoporous Materials*, 272, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.06.026>.
- INTA. (2018). *Biorremediación de los Recursos Naturales*. M. Beltrán, L. Brutti & I. De Salamone (Eds.). Ediciones INTA [Accedido el 7 de Noviembre de 2025].
- Jones, D. (1995). Environmental Fate of Cypermethrin. *Environmental Monitoring and Pest Management Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, California, USA*, 249, 390–397. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/cyperm.pdf>
- Jyoti, K., Ganguly, P., Goon, A., Kumar, M., Roy, R., Kumar, A., Ghosh, M. & Rakshit, R. (2025). Effective Biomixture for Preventing Pesticide Point Source of Contamination. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-024-02180-3>
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N., Karpouzias, D. & Ehaliotis, C. (2010a). Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in southern Europe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9147–9156. <https://doi.org/10.1021/jf1011853>.
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N., Karpouzias, D. & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010). Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere*, 80(8), 914–921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.003>.
- Kaur, T. (2020). Vermicomposting: An effective Option for Recycling Organic Wastes. In S. K. Das (Ed.), *Organic Agriculture* (p. 17). IntechOpen. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91892>.
- Khan, N., Yaqub, G., Hafeez, T. & Tariq, M. (2020). Assessment of Health Risk due to Pesticide Residues in Fruits, Vegetables, Soil, and Water. *Journal of Chemistry*, 2020, 5497952. <https://doi.org/10.1155/2020/5497952>.
- Kharel, K., Bardsley, C., Appolon, C., Dunn, L., Kumar, G., Prabha, K., Sharma, M., Danyluk, M. & Schneider, K. (2025). The Effect of Heat-treated Poultry Pellets and Composted

- Poultry Litter on *E. coli* Survival in Southeastern US Soils: Florida and Georgia. *Journal of Food Protection*, 88(1). <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100439>.
- Kholodov, V., Kulikova, N., Perminova, I., Eremin, S. & Lebedeva, G. (2005). Adsorption of the Herbicide Acetochlor by Different Soils Types. *Eurasian Soil Science*, 38(5), 600–607.
- Khovarnagh, N. & Seyedalipour, B. (2021). Antioxidant, histopathological and biochemical outcomes of short-term exposure to acetamiprid in liver and brain of rat: The protective role of N-acetylcysteine and S-methylcysteine. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.02.004>.
- Knight, J., Cessna, A., Ngombe, D. & Wolfe, T. (2016). Mineralisation and degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt in a biobed matrix and in topsoil. *Pest Management Science*, 72(10), 1965–1976. <https://doi.org/10.1002/ps.4238>.
- Kumar, C. (2013). Analytical Method Development and Validation of Dimethoate Pesticide using HPLC Method. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000127>.
- Kumari, A., Kumari, U., Gupta, S. & Singh, N. (2021). Azoxystrobin and imidacloprid degradation in biobed setup under laboratory conditions. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 103(10), 2292–2299. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1890065>.
- Kumari, A., Mandal, A. & Singh, N. (2019). Kinetics and isotherm modeling of azoxystrobin and imidacloprid retention in biomixtures. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(2), 118–128. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1507230>.
- Kumari, A., Singh, N. & Ramakrishnan, B. (2019). Parameters affecting azoxystrobin and imidacloprid degradation in biobed substrates in the North Indian tropical environment. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(10), 843–857. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1633857>.
- L. Roselli, P. Satti, M. & Crego, M. (2017). *Técnicas Para Análisis De Compost*. Grupo De Suelos del CRUB-Univ. Nac. Comahue. p.1-25.

- Lammertyn, S., Magni, F., Durán, A., Repetti, M., Godoy, J. & Zalazar, C. (2024). Earthworm injury test for in-situ biomonitoring of pesticides in biobeds. *Chemosphere*, 363. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142923>.
- Lammertyn, S., Masín, C., Zalazar, C. & Fernandez, M. (2021). Biomarkers response and population biological parameters in the earthworm *Eisenia fetida* after short term exposure to atrazine herbicide. *Ecological Indicators*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107173>.
- Laos, F., Mazzarino, M., Walter, I., Roselli, L., Satti, P. & Moyano, S. (2002). Composting of fish offal and biosolids in northwestern Patagonia. *Bioresource Technology*, 81, 179–186.
- Leconte, M., Mazzarino, M., Satti, P., Iglesias, M. & Laos, F. (2009). Co-composting rice hulls and/or sawdust with poultry manure in NE Argentina. *Waste Management*, 29(9), 2446–2453. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.006>.
- Lengyel, Z. & Földényi, R. (2003). Acetochlor as a soil pollutant. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(1), 13–18. <https://doi.org/10.1065/espr2001.12.103>.
- Lepesteur, M. (2022). Human and livestock pathogens and their control during composting. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(10), 1639–1683. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1862550>.
- Lescano, M., Fussoni, N., Vidal, E. & Zalazar, C. (2022). Biodegradation of pesticide-contaminated wastewaters from a formulation plant employing a pilot scale biobed. *Science of the Total Environment*, 807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150758>.
- Lescano, M., Masin, C., Rodríguez, A., Godoy, J. & Zalazar, C. (2020). Earthworms to improve glyphosate degradation in biobeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(21), 27023–27031. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09002-w>.
- Lescano, M., Pizzul, L., Castillo, M. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.009>.
- Leskovic, A. & Petrović, S. (2023). Pesticide Use and Degradation Strategies: Food Safety, Challenges and Perspectives. *Foods*, 12(14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods12142709>.
- Liew, C., Yunus, N., Chidi, B., Lam, M., Goh, P., Mohamad, M., Sin, J., Lam, S., Lim, J. & Lam, S. (2022). A review on recent disposal of hazardous sewage sludge via anaerobic

- digestion and novel composting. *Journal of Hazardous Materials*, 423. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126995>.
- Lim, S., Wu, T., Sim, E., Lim, P. & Clarke, C. (2012). Biotransformation of rice husk into organic fertilizer through vermicomposting. *Ecological Engineering*, 41, 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.011>.
- Lin, Z., Zhen, Z., Liang, Y., Li, J., Yang, J., Zhong, L., Zhao, L., Li, Y., Luo, C., Ren, L. & Zhang, D. (2019). Changes in atrazine speciation and the degradation pathway in red soil during the vermiremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, 364, 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.037>.
- Liu, Y., Fang, K., Zhang, X., Liu, T., & Wang, X. (2021). Enantioselective toxicity and oxidative stress effects of acetochlor on earthworms (*Eisenia fetida*) by mediating the signaling pathway. *Science of the Total Environment*, 766. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142630>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.147>.
- López, A., Coll, A., Lescano, M. & Zalazar, C. (2018). Advanced oxidation of commercial herbicides mixture: experimental design and phytotoxicity evaluation. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21393–21402. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9041-2>.
- Luzzi, J., Aparicio, V., De Geronimo, E., Ledda, A., Sauer, V. & Costa, J. (2024). Degradation of atrazine, glyphosate, and 2,4-D in soils collected from two contrasting crop rotations in Southwest Chaco, Argentina. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 59(3), 98–111. <https://doi.org/10.1080/03601234.2024.2305596>.
- Ma, H., Zhao, S., Hou, J., Feyissa, T., Duan, Z., Pan, Z., Zhang, K., & Zhang, W. (2022). Vermicompost Improves Physicochemical Properties of Growing Medium and Promotes Plant Growth: A Meta-analysis. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(3), 3745–3755. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00924-7>.
- Maggi, F., Tang, F. & Tubiello, F. (2023). Agricultural pesticide land budget and river discharge to oceans. *Nature*, 620(7976), 1013–1017. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06296-x>.

- Mandal, A. & Singh, N. (2016). Kinetic and isotherm error optimization studies for adsorption of atrazine and imidacloprid on bark of *Eucalyptus tereticornis* L. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(3), 192–203. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1108817>.
- Manga, M., Camargo-Valero, M., Anthonj, C., & Evans, B. (2021). Fate of faecal pathogen indicators during faecal sludge composting with different bulking agents in tropical climate. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 232. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113670>.
- Mansee, A., Ebrahim, A. & Koreish, E. (2024). Sustainable indigenous bio-mixture for restoration the soil point source pollution with special reference to chlorpyrifos. *Environmental Monitoring and Assessment*, 196(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-024-12494-5>.
- Mantzou, N., Karakitsou, A., Hela, D. & Konstantinou, I. (2016). Environmental fate of the insecticide cypermethrin applied as microgranular and emulsifiable concentrate formulations in sunflower cultivated field plots. *Science of the Total Environment*, 541, 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.117>.
- Masin, C., Duran, A., Zalazar, C. & Fernandez, M. (2025). Composting-vermicomposting of pigeon dropping waste. A contribution to the reduction of urban contamination. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 14(3). <https://doi.org/10.57647/ijrowa-bg19-nr15>.
- Masin, C., Fernandez, M., Lescano, M. & Zalazar, C. (2020). Bioconversion of agro-industrial wastes: Combined compost and vermicompost processes using *Eisenia fetida* for stabilization of poultry litter. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 9, 107–118.
- Masin, C., Lescano, M., Rodríguez, A., Godoy, J. & Zalazar, C. (2018). Earthworms to assess the innocuousness of spent biomixtures employed for glyphosate degradation. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 53(8), 519–525. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1462922>.
- Masin, C. & Rut Rodríguez, A. (2012). Evaluación preliminar de dos tipos de dieta en la especie endogea *aporrctodea trapezoides* (Duguès, 1828) (Oligochaeta: Lumbricidae). *Megadrilologica*, 15(10).
- Masis-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Tortella, G., Beita-Sandí, W. & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2019). Removal of triazines, triazoles and organophosphates in biomixtures and

- application of a biopurification system for the treatment of laboratory wastewaters. *Chemosphere*, 233, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.001>.
- Miglani, R. & Bisht, S. (2020). World of earthworms with pesticides and insecticides. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(2), 71–82. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0008>.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Argentina. (2021). *Informe Técnico-Científico sobre el uso e impactos del herbicida acetoclor en Argentina*.
- Ministerio de Economía Argentina. (2023). *Santa Fe Informe productivo provincial*.
- Montoya, J., López, S., Salvagiotti, F., Mitidieri, M., Cid, R., Sasal, C., Martens, S., Carrancio, L., Aparicio, V., Acciaresi, H., Carlos Papa, J., Vigna, M., Volante, J., Irurueta, M. & Trumper, E. (2023). *Los productos fitosanitarios en los sistemas productivos de la Argentina. Una mirada desde el INTA. Mesa de análisis y propuestas para el abordaje integral del uso de productos fitosanitarios* (INTA Ediciones).
- Morillo, E. & Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. In *Science of the Total Environment*, 586, 576–597. Elsevier <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
- Mukherjee, S. (2016). *Analysis of biomixtures to determine the fate of pesticides*. <https://user.fz-juelich.de/record/811744>.
- Mupambwa, H., Ravindran, B. & Mnkeni, P. (2016). Potential of Effective micro-organisms and *Eisenia fetida* in enhancing vermicomposting and nutrient release of fly ash incorporated into cow dung-paper waste mixture. *Waste Management*, 48, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.001>.
- Murphy, J. & Riley, J. (1962). Architecture, Materiality and Society: Connecting Sociology of Architecture with Science and Technology Studies. *Analitica Chimica Acta*, 27, 31–36. <https://doi.org/10.1057/9781137461131>.
- Mussali-Galante, P., Castrejón-Godínez, M., Díaz-Soto, J., Vargas-Orozco, Á., Quiroz-Medina, H., Tovar-Sánchez, E. & Rodríguez, A. (2023). Biobeds, a Microbial-Based Remediation System for the Effective Treatment of Pesticide Residues in Agriculture. In *Agriculture*, 13(7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agriculture13071289>.
- Nahidan, S. & Ghasemzadeh, M. (2022). Biochemical phosphorus transformations in a calcareous soil as affected by earthworm, cow manure and its biochar additions. *Applied Soil Ecology*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104310>.

- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. & Renella, G. (2011). *Role of Phosphatase Enzymes in Soil*, 215–243. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9).
- Nayak, A. & Kalamdhad, A. (2014). Feasibility of composting combinations of sewage sludge, cattle manure, and sawdust in a rotary drum reactor. *Environmental Engineering Research*, 19(1), 47–57. <https://doi.org/10.4491/eer.2014.19.1.047>.
- Nikaeen, M., Nafez, A., Bina, B., Nabavi, B. & Hassanzadeh, A. (2015). Respiration and enzymatic activities as indicators of stabilization of sewage sludge composting. *Waste Management*, 39, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.028>.
- Njoku, K., Ogwara, C., Adesuyi, A. & Akinola, M. (2018). Vermiremediation of Pesticide Contaminated Soil Using *Eudrilus euginae* and *Lumbricus terrestris*. *Environment Asia*, 11(3), 133–147. <https://doi.org/10.14456/ea.2017.43>.
- Nobili, S., Masin, C., Zalazar, C. & Lescano, M. (2022). Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using local organic materials and earthworms. *Environmental Pollution*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120169>.
- Nugnoes, R., Russo, C., Orlo, E., Lavorgna, M. & Isidori, M. (2023). Imidacloprid: Comparative toxicity, DNA damage, ROS production and risk assessment for aquatic non-target organisms. *Environmental Pollution*, 316. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120682>.
- Nyoka, N., Ogbeide, O. & Otomo, P. (2021). Reproduction and biomarker responses of *Eisenia fetida* after exposure to imidacloprid in biochar-amended soil. *Biochar*, 3(4), 615–624. <https://doi.org/10.1007/s42773-021-00103-4>.
- Odukkathil, G. & Vasudevan, N. (2020). Bacteria amended clay biochar composite biobed system to treat agriculture runoff. *Journal of Environmental Management*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110694>.
- OECD. (1984). Earthworm, Acute Toxicity Tests. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, 1, 1–9.
- Omirou, M., Dalias, P., Costa, C., Papastefanou, C., Dados, A., Ehaliotis, C. & Karpouzias, D. (2012). Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution*, 166, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.001>.
- Oviedo-Matamoros, F., Pérez-Villanueva, M., Masís-Mora, M., Aguilar-Álvarez, R., Ramírez-Morales, D., Méndez-Rivera, M. & Rodríguez-Rodríguez, C. (2024). Biological treatment

- of pesticide-containing wastewater from coffee crops: selection and optimization of a biomixture and biobed design. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1357839>.
- Owagboriaye, F., Dedeke, G., Bamidele, J., Aladesida, A., Isibor, P., Feyisola, R. & Adeleke, M. (2020). Biochemical response and vermiremediation assessment of three earthworm species (*Alma millsoni*, *Eudrilus eugeniae* and *Libyodrilus violaceus*) in soil contaminated with a glyphosate-based herbicide. *Ecological Indicators*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105678>.
- Owojori, O. J. & Reinecke, A. J. (2009). Avoidance behaviour of two eco-physiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere*, 75(3), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.051>.
- Pandey, P., Cao, W., Wang, Y., Vaddella, V., Castillo, A., Souza, A. & Rio, N. (2016). Simulating the effects of mesophilic anaerobic and aerobic digestions, lagoon system, and composting on pathogen inactivation. *Ecological Engineering*, 97, 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.047>.
- Papazlatani, C., Karas, P., Tucac, G. & Karpouzias, D. (2019). Expanding the use of biobeds: Degradation and adsorption of pesticides contained in effluents from seed-coating, bulb disinfection and fruit-packaging activities. *Journal of Environmental Management*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.122>.
- Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M. & Vandenbulcke, F. (2014). Pesticides and earthworms. A review. In *Agronomy for Sustainable Development*, 34 (1), 199–228). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>.
- Peterson, M., McMaster, S., Riechers, D., Skelton, J. & Stahlman, P. (2016). 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology*, 30(2), 303–345. <https://doi.org/10.1614/wt-d-15-00131.1>.
- Pizarro, M., Céccoli, G., Muñoz, F., Frizzo, L., Daurelio, L. & Bouzo, C. (2019). Use of raw and composted poultry litter in lettuce produced under field conditions: microbiological quality and safety assessment. *Poultry Science*, 98(6), 2608–2614. <https://doi.org/10.3382/ps/pez005>.
- Poornima, S., Dadi, M., Subash, S., Manikandan, S., Karthik, V., Deena, S., Balachandar, R., Kumaran, S. & Subbaiya, R. (2024). Review on advances in toxic pollutants remediation

- by solid waste composting and vermicomposting. *Scientific African*, 23. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02100>.
- Rani, S. & Sud Sant, D. (2014). Time and temperature dependent sorption behaviour of dimethoate pesticide in various Indian soils. *International Agrophysics*, 28(4), 479–490. <https://doi.org/10.2478/intag-2014-0038>.
- Rasool, S., Rasool, T. & Gani, K. (2022). A review of interactions of pesticides within various interfaces of intrinsic and organic residue amended soil environment. *Chemical Engineering Journal Advances*, 11. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100301>.
- Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X. & Trinsoutrot-Gattin, I. (2014). Effects of pesticides on soil enzymes: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 12 (2), 257–273. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2>.
- Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J., Auclair, E. & Larondelle, Y. (2007). In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, 98(9), 1812–1821. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.015>.
- Rodríguez-Campos, J., Dendooven, L., Alvarez-bernal, D. & Contreras-Ramos, S. (2014). Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: A review. *Applied Soil Ecology*, 79, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.010>.
- Rodríguez-Liébana, J. , Mingorance, M. & Peña, A. (2011). Sorption of hydrophobic pesticides on a Mediterranean soil affected by wastewater, dissolved organic matter and salts. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.009>.
- Rodríguez-Rodríguez, C. Castro-Gutiérrez, V. & Lizano-Fallas, V. (2018). Alternative approaches to determine the efficiency of biomixtures used for pesticide degradation in Biopurification Systems. *Methods in Pharmacology and Toxicology* (9781493974245, 57–73). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7425-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7425-2_3).
- Rodríguez-Rodríguez, C. & Rodríguez-Saravia, S. (2023). On-Farm Removal of Pesticides: Current Insights on Biopurification Systems. In *ACS Agricultural Science and Technology*, 3 (8), 601–615. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00337>.

- Román, P., Martínez, M. & Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor: experiencias en América Latina* (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).
- Romero, E., Delgado-Moreno, L. & Nogales, R. (2019). Pesticide Dissipation and Enzyme Activities in Ungrassed and Grassed Biomixtures, Composed of Winery Wastes, Used in Biobed Bioremediation Systems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(2).  
<https://doi.org/10.1007/s11270-019-4093-1>.
- Romero, I. A., van Dillewijn, P., Nesme, J., Sørensen, S. & Romero, E. (2019). Improvement of pesticide removal in contaminated media using aqueous extracts from contaminated Biopurification Systems. *Science of the Total Environment*, 691, 749–759.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.087>.
- Saadi, R., Saadi, Z., Fazaeli, R. & Fard, N. (2015). Monolayer and multilayer adsorption isotherm models for sorption from aqueous media. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32 (5), 787–799. Springer New York LLC.  
<https://doi.org/10.1007/s11814-015-0053-7>.
- Sabzevari, S. & Hofman, J. (2022). A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils. In *Science of the Total Environment*, 812, Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152344>.
- Sadia, M., Hossain, M., Islam, M., Akter, T. & Shaha, D. (2020). Growth and reproduction performances of earthworm (*Perionyx excavatus*) fed with different organic waste materials. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7(2), 331–337.  
<https://doi.org/10.5455/JAVAR.2020.G426>.
- Saez, J., Bigliardo, A., Raimondo, E., Briceño, G., Polti, M. & Benimeli, C. (2018). Lindane dissipation in a biomixture: Effect of soil properties and bioaugmentation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 97–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.011>.
- Saez, J., González, S., Ocante, T., Bigliardo, A., Briceño, G. & Benimeli, C. (2022). Actinobacteria bioaugmentation and substrate evaluation for biobeds useful for the treatment of atrazine residues in agricultural fields. *Journal of Environmental Management*, 320. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115870>.
- Saleem, A., Irshad, M., Ping, A. & Haroon, B. (2018). Loss of phosphorus by runoff from soils after amendment with poultry litter co-composted with crop waste. *International Journal*

- of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 7(3), 211–215.  
<https://doi.org/10.1007/s40093-018-0207-9>.
- Samal, K., Dash, R., & Bhunia, P. (2017). Performance assessment of a *Canna indica* assisted vermifilter for synthetic dairy wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.07.027>.
- Sánchez-Hernández, J., Andrade, X. & Domínguez, J. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Exploring the potential enzymatic bioremediation of vermicompost through pesticide-detoxifying carboxylesterases. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, 109586. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109586>.
- Sánchez-Hernández, J., Martínez Morcillo, S., Notario del Pino, J. & Ruiz, P. (2014). Earthworm activity increases pesticide-sensitive esterases in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.04.015>.
- Sánchez-Hernández, J., Ro, K., Szogi, A., Chang, S. & Park, B. (2021). Earthworms increase the potential for enzymatic bio-activation of biochars made from co-pyrolyzing animal manures and plastic wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 408. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124405>.
- Sández, F. (2016). *La Argentina Fumigada: agroquímicos, enfermedad y alimentos en un país envenenado* (Planeta). Espejo de la Argentina.
- Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Kavitha, D., Selvakumar, R., Jayabalan, R., Choi, J. & Yun, S. (2009). Adsorption potential of maize cob carbon for 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions: Equilibrium, kinetics and thermodynamics modeling. *Chemical Engineering Journal*, 147(2–3), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.07.020>.
- Semitela, S., Pirra, A. & Braga, F. (2019). Impact of mesophilic co-composting conditions on the quality of substrates produced from winery waste activated sludge and grape stalks: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*, 289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121622>.
- SENASA. (2019). *Anexo I - Marco Normativo Para La Producción, Registro Y Aplicación De Compost*.
- Şevik, F., Tosun, İ. & Ekinci, K. (2018). The effect of FAS and C/N ratios on co-composting of sewage sludge, dairy manure and tomato stalks. *Waste Management*, 80, 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.051>.

- Sharma, K. & Garg, V. (2018). Vermicomposting: A Green Technology for Organic Waste Management. *Energy, Environment, and Sustainability*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_10).
- Sharma, K. & Garg, V. (2019). Recycling of lignocellulosic waste as vermicompost using earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(14), 14024–14035. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04639-8>.
- Shi, Z., Zhang, F. & Wang, C. (2018). Adsorption of phenanthrene by earthworms - A pathway for understanding the fate of hydrophobic organic contaminants in soil-earthworm systems. *Journal of Environmental Management*, 212, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.079>.
- Singh, J., Singh, S., Vig, A. & Kaur, A. (2018). Environmental Influence of Soil toward Effective Vermicomposting. In *Earthworms - The Ecological Engineers of Soil*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75127>.
- Sinsabaugh, R. (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(3), 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.014>.
- Solé, M. (2021). Biomarkers in earthworms. *Handbook of Environmental Chemistry*, 103, 311–337. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. [https://doi.org/10.1007/698\\_2020\\_628](https://doi.org/10.1007/698_2020_628).
- Sun, M., Chao, H., Zheng, X., Deng, S., Ye, M. & Hu, F. (2020). Ecological role of earthworm intestinal bacteria in terrestrial environments: A review. *Science of the Total Environment*, 740. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140008>.
- Bardiya, S. & Dixit, S. (2024). A review on effect of different pesticides on earthworm. *International Journal of Science and Research Archive*, 11(1), 590–599. <https://doi.org/10.30574/ijsra.2024.11.1.0125>.
- Tagliabue, F., Marini, E., De Bernardi, A., Vischetti, C., Brunetti, G. & Casucci, C. (2025). A Bioremediation and Soil Fertility Study: Effects of Vermiremediation on Soil Contaminated by Chlorpyrifos. *Environments - MDPI*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/environments12050136>.
- Teferedegn, G. & Ayele, C. (2024). Life Cycle Patterns of Epigeic Earthworm Species (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*, and *Dendrobaena veneta*) in a Blend of Brewery Sludge and Cow Dung. *International Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1155/2024/6615245>.

- Tejada, M. & Masciandaro, G. (2011). Application of organic wastes on a benzo(a)pyrene polluted soil. Response of soil biochemical properties and role of *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 668–674. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.018>.
- Teng, M., Zhao, X., Wang, C., Zhou, L., Wu, X. & Wu, F. (2022). Combined toxicity of chlorpyrifos, abamectin, imidacloprid, and acetamiprid on earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(36), 54348–54358. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18025-w>.
- Terrile, R., Martinez, N., Paz, N., Brunotto, F., Costa, M., Budai, N., Ruiz, C., Rizzi, M., Invernizzi, M., Scarpeci, T., Piacentini, R., Winter, K. & Tornaghi, C. (2024). Urban food waste for soil amendment? Analysis and characterisation of waste-based compost for soil fertility management in agroecological horticultural production systems in the city of Rosario, Argentina. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1338451>.
- Tiquia, S., Richard, T. & Honeyman, M. (2002). Carbon, nutrient, and mass loss during composting. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 62.
- Tortella, G., Mella-Herrera, R., Sousa, D., Rubilar, O., Briceño, G., Parra, L. & Diez, M. (2013). Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities. *Chemosphere*, 93(6), 1084–1093. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.084>
- 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(2), 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.072>
- Tran, H., Thanh Trung, N., Lima, E., Bollinger, J., Dat, N., Chao, H. & Juang, R. (2023). Revisiting the calculation of thermodynamic parameters of adsorption processes from the modified equilibrium constant of the Redlich–Peterson model. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 98(2), 462–472. <https://doi.org/10.1002/jctb.7258>.
- Urrutia, C., Rubilar, O., Tortella, G. & Diez, M. (2013). Degradation of pesticide mixture on modified matrix of a Biopurification System with alternatives lignocellulosic wastes. *Chemosphere*, 92(10), 1361–1366. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.088>.
- USEPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. *United States Environmental Protection Agency*, 1–8. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100RF5I.TXT>.

- USEPA. (1994). *Method 200.9, Revision 2.2: Determination of Trace Elements by Stabilized Temperature Graphic Furnace Atomic Absorption*. www.epa.gov [Accedido el 2 de Noviembre de 2025].
- Uthman, Q., Kadyampakeni, D., Leiva, J. A., Judy, J. & Nkedi-Kizza, P. (2024). Sorption and degradation processes of imidacloprid in Florida soils. *PLoS ONE*, 19(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305006>.
- Vagi, M., Petsas, A., Kostopoulou, M. & Lekkas, T. (2010). Adsorption and desorption processes of the organophosphorus pesticides, dimethoate and fenthion, onto three greek agricultural soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90(3–6), 369–389. <https://doi.org/10.1080/03067310903194980>.
- Van Scoy, A., Pennell, A. & Zhang, X. (2016). Environmental fate and toxicology of dimethoate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 237,53–70. Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_3).
- Velki, M., & Hackenberger, B. (2013). Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.09.018>.
- Vicentin, R., Masín, C., Lescano, M. & Zalazar, C. (2021). Poultry litter stabilization by two-stage composting-vermicomposting process: Environmental, energetic and economic performance. *Chemosphere*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130872>.
- Vieira, C., Marcon, C. & Droste, A. (2024). Phytotoxic and cytogenotoxic assessment of glyphosate on *Lactuca sativa L.* *Brazilian Journal of Biology*, 84. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.257039>.
- Villa Amaringo, F. & Hormaza Anaguano, A. (2013). Determinación del punto de carga cero y punto isoeléctrico de dos residuos agrícolas y su aplicación en la remoción de colorantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2), 27–36.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.065>.
- Wang, F., Shen, X., Wu, Y. K., Wang, Y. F., Zhang, H., Ding, Y. & Zhu, W. (2023). Evaluation of the effectiveness of amendments derived from vermicompost combined with modified

- shell powder on Cd immobilization in Cd-contaminated soil by multiscale experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115166>.
- Wang, Y., An, X., Shen, W., Chen, L., Jiang, J., Wang, Q. & Cai, L. (2016). Individual and combined toxic effects of herbicide atrazine and three insecticides on the earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology*, 25(5), 991–999. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1656-4>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.043>.
- Xiao-Zhen, F., Liu, X.-Y., Cui-Hua, Z. & Bao-Jun, X. (2014). Analysis of 50% Acetochlor and Clomazone EC by HPLC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(10), 168–171.
- Yu, H., Xie, B., Khan, R. & Shen, G. (2019). The changes in carbon, nitrogen components and humic substances during organic-inorganic aerobic co-composting. *Bioresource Technology*, 271, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.088>.
- Zagal, E. & Sadzawka, A. (2007). *Protocolo De Métodos De Análisis Para Suelos y Lodos*.
- Zhang, N., Xie, F., Guo, Q. & Yang, H. (2021). Environmental disappearance of acetochlor and its bioavailability to weed: A general prototype for reduced herbicide application instruction. *Chemosphere*, 265. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129108>.
- Zhang, Q., Zhang, B. & Wang, C. (2014). Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(21), 12345–12353. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3178-z>.
- Zhao, C., Wang, Y., Wang, Y., Wu, F., Zhang, J., Cui, R., Wang, L. & Mu, H. (2018). Insights into the role of earthworms on the optimization of microbial community structure during vermicomposting of sewage sludge by PLFA analysis. *Waste Management*, 79, 700–708. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.041>.
- Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M. & Bertoldi, M. (1985). Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *Composting of Agricultural and Other Wastes*, 73–86.

