

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de un sistema de biopurificación a campo para la biorremediación del paquetes tecnológicos usados en agricultura extensiva.

Código de proyecto ANII: FMV_1_2017_1_136757

31/05/2021

CESIO CESCOINI, María Verónica (Responsable Técnico - Científico)

RODRIGUEZ CERAOLO, Cecilia (Investigador)

ARCHONDO, Lucas (Investigador)

REZENDE OLAIZOLA, Sofía (Investigador)

BESIL ARISMENDI, María Natalia (Investigador)

FERNANDEZ CHILDS, Grisel Mariom (Investigador)

GEREZ GARCIA, Natalia (Investigador)

HEINZEN GONZALEZ, Horacio (Investigador)

HLADKI, Ricardo (Investigador)

JESÚS GILES, Florencia (Investigador)

NIELL MENEGAZZI, María Silvina (Investigador)

PALLADINO ALMADA, María Cintia (Investigador)

PÉREZ PARADA, Andrés (Investigador)

RIVERO MACHADO, Anisleidy (Co-Responsable Técnico-Científico)

Resumen del proyecto

La contaminación ambiental provocada por las aguas de lavados generadas por la aplicación de pesticidas es conocida y preocupante. En los últimos años se han estudiado diferentes opciones para su tratamiento, Uruguay, como solución, sugiere en la Guía de Buenas Prácticas Agrícolas el uso de biocamas en horti-fruticultura. Pero para la producción extensiva no existe una solución recomendada para los pesticidas utilizados en la agricultura de secano. Considerando que la agricultura extensiva es uno de los sectores productivos más desarrollados en el país, basados en la experiencia de investigaciones anteriores exitosas del grupo de trabajo, se propuso el estudio de la biodegradación de pesticidas aplicados en cultivos de soja utilizando Lechos Biológicos en condiciones ambientales a escala de semicampo y campo. En el primer experimento se diseñó un cronograma de aplicación convencional de 15 agroquímicos empleados en el cultivo de soja. Se instalaron siete contenedores con 15 y 10 kg de biomezcla (afrechillo, turba y tierra en 2:1:1% v) en un invernadero. Los biolechos instalados biodegradaron en un 75-98% los pesticidas aplicados. Luego se instaló un lecho biológico en un campo productivo diseñado con cuatro tanques de 1000L: uno con las aguas de lavado, 2 con biomezcla y uno enterrado para recoger por gravedad los lixiviados y recircularlos al biorreactor.

La degradación en todos los experimentos se evaluó con metodologías analíticas desarrolladas y validadas para este fin, utilizando HPLC-MS/MS, GC-MS/MS e IC-MS/MS. Se comprobó que las biocamas son una herramienta útil como solución a la contaminación puntual generada a lo largo del ciclo productivo de soja. Se logró un vínculo estrecho con los productores involucrados que manifestaron entusiasmo con la utilización del biorreactor. Se realizaron instancias de divulgación con otros agricultores, mostrando la aplicabilidad de los Biolechos como herramientas de remediación.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias de la Tierra y relacionadas con el Medio Ambiente / Ciencias Medioambientales (los aspectos sociales van en "Geografía Económica y Social" / Bioremediación

Palabras clave: Mitigación / Sistema de Biopurificación / Paquetes tecnológicos /

Introducción

La producción agrícola actual se soporta en el uso de cantidades importantes de herbicidas por hectárea. La información relativa a los totales de fitosanitarios utilizados en el país, en la que destacan los altos valores para herbicidas (DGSA; 2015) tiene relación con esta realidad. Este uso masivo de herbicidas supone riesgos de efectos tóxicos al ser humano e impactos al ambiente. Los pesticidas, (herbicidas, fungicidas e insecticidas) son xenobióticos, compuestos químicos que no pertenecen a la composición natural de los organismos vivos. Aunque los xenobióticos pueden degradarse a través de la oxidación o de la radiación solar, sus características estructurales hacen que muchos se mantengan inalterables durante periodos muy extensos, ante la imposibilidad de biodegradarse, y sean contaminantes. La biorremediación, o sea la eliminación por medio de agentes biológicos de los contaminantes ambientales en sitios impactados constituye una alternativa biotecnológica "verde" interesante. La eliminación de éstos contaminantes, particularmente de pesticidas recalcitrantes de una manera amigable es una necesidad actual debido al uso masivo de agroquímicos en la agricultura (Weir, Sutherland et al. 2006), (Mukherjee and Mittal 2005), (Kwon, Sohn et al. 2005). Para obtener una herramienta adecuada a estos fines, los contaminantes deben ser transformados metabólicamente, a productos inocuos sin causar efectos secundarios adversos (Andreoni and Gianfreda 2007). Existen puntos críticos relacionados con el manejo de agroquímicos en pasos previos y posteriores a la aplicación como el llenado de los equipos de aplicación, ya sea aviones, mosquitos, tanques de pulverización y hasta mochilas de aspersión y luego su posterior y necesario lavado. En estas etapas se producen vertidos de concentrados de pesticidas al realizar las diluciones, así como por un mal manejo de los residuos de pesticidas que quedan dentro y fuera del tanque de almacenamiento y especialmente cuando se realiza el lavado de los equipos, generando la llamada "contaminación puntual". La posibilidad de escurrimientos y/o la lixiviación de éstos contaminantes pueden constituir una importante forma de contaminación de aguas superficiales y profundas. Inclusive la persistencia de herbicidas en suelos agrícolas puede tener importantes implicancias ecotoxicológicas, afectando el crecimiento vegetal, la microbiota del suelo y los ecosistemas en general. Numerosas investigaciones demuestran que la contaminación por escurrimiento desde las áreas agrícolas contribuye significativamente en la descarga de pesticidas en aguas superficiales (Antonious 2012). También existe contundente evidencia respecto al riesgo particular que suponen las zonas de carga de fitosanitarios en las chacras, consideradas como sitios "fuentes de contaminación" al punto de haberse propuesto y adoptado en algunos países estrategias específicas para la prevención y minimización de ésta contaminación. La consideración conjunta de los aspectos recién comentados respecto a los riesgos

de contaminación y las cantidades de herbicidas hoy utilizados en la agricultura de secano resultan razones suficientes para profundizar los estudios en estrategias de mitigación como potencial herramienta en nuestra agricultura. Muy recientemente, el aumento de los problemas con malezas resistentes ha llevado a incorporar la utilización de herbicidas en ocasiones de alta persistencia y/o con perfiles toxicológicos y ecotoxicológicos menos amigables agudizando la necesidad de ampliar las investigaciones en el tema. Particularmente la legislación en Uruguay exige luego de la aplicación de agroquímicos el triple lavado para los envases de pesticidas como parte del cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y así mismo se debe cumplir con el Decreto N° 152/013 del 21/5/2013, que establece el marco para la gestión ambientalmente adecuada de los residuos derivados del uso de productos químicos o biológicos en la actividad agropecuaria, hortifrutícola y forestal (MGAP 2014). Ese triple lavado es vertido a la maquinaria nuevamente. Actualmente en Uruguay existen organizaciones que procesan los envases, pero además por situaciones imponderables los envases pueden contener importantes cantidades del concentrado si no fue todo utilizado. Esta situación hace que el mismo tenga que ser tratado en el lugar de acopio, generando nuevos efluentes que contienen altas concentraciones de los agroquímicos, sin una solución inmediata. Unas pocas gotas de ese pesticida concentrado equivalen a 1 g de la sustancia activa. Si estas gotas caen al suelo ocupan 1 dm² de sustancia en el suelo, teniendo una dosis final de 1g/dm² que es equivalente a 1 tonha-1. Las dosis normales de pesticidas en la actualidad presentan valores permisibles alrededor de kg/ha-1 o g/ha-1. Sumado a esto las aguas del lavado obligatorio de la maquinaria así como las pérdidas por errores o mal mantenimiento de las mismas son también fuente de esta "contaminación puntual" independientemente de la difusa generada durante la aplicación. Por ello la contaminación causada por estas fuentes es un riesgo que debe ser considerado y resuelto. La persistencia de los pesticidas aumentan con el aumento de la concentración (Fogg, Boxall et al. 2003) y este fenómeno ha sido comúnmente atribuido a la actividad inhibitoria sobre los microorganismos del suelo. Más aun, la persistencia de un grupo de pesticidas puede verse alterada con el uso de combinaciones de pesticidas (Vischetti, Marini et al. 1996), o por repetidas aplicaciones (Edwards 2013). Estas tareas en el campo siempre se realizan en el mismo lugar, cerca de un cuerpo de agua y encima de grava y arena. Altas concentraciones de residuos de pesticidas se han encontrado en estos sitios y según los estudios realizados en Dinamarca (Spliid, Helweg et al. 2006), Alemania (Fischer, Hartmann et al. 1998); (Frede, Fischer et al. 1998) y Suecia (Kreuger 1999) se demuestra que cada uno de los puntos anteriormente expuestos son una de las causas de la contaminación de suelo y agua por pesticidas (Cooper, Fitt et al. 2016). El manejo inadecuado de estos procedimientos constituye un riesgo para las aguas subterráneas y superficiales. Los derrames accidentales, los enjuagues de los aplicadores y la producción de formulados contribuyen significativamente a la contaminación de los ecosistemas, situación que precisa una repuesta, pues por acumulación en una zona afectan aún más la vitalidad de los ecosistemas (Cooper, Fitt et al. 2016); (De Wilde, Spanoghe et al. 2007). Los lechos biológicos son sistemas biopurificadores desarrollados en Suecia en respuesta a la necesidad de un método sencillo y eficaz para minimizar la contaminación anteriormente descrita (Castillo, Torstensson et al. 2008) (Torstensson Lennart 1997). Los Lechos o Camas Biológicas (Biobeds) son una alternativa de bajo costo para el tratamiento de los residuos provenientes de la contaminación puntual. Ellos constan de una matriz que absorbe los pesticidas y promueve su biodegradación. La matriz biológicamente activa clásica, biomezcla, se compone de paja, turba, y tierra en una proporción volumétrica de 2: 1: 1 (respectivamente), donde cada componente presenta una función específica en el sistema, promoviendo la degradación. (Castillo, Torstensson et al. 2008); (Torstensson Lennart 1997). El sistema se puede modificar de acuerdo con la cantidad de residuos de pesticidas a tratar, la tierra, las condiciones ambientales, la ubicación geográfica y las características climáticas. Existen variados bioreactores que están funcionando en el mundo y que son eficientes en la reducción de la contaminación puntual por pesticidas evitndo su llegada a los cuerpos de agua. (Castillo, Torstensson et al. 2008); (De Wilde, Spanoghe et al. 2007). Las biocamas como sistemas de biopurificación (Karanasios, Tsiropoulos et al. 2012); (Verhagen, De Gelder et al. 2013) adaptados a las condiciones y aplicaciones locales (Antonious 2012) instaladas y evaluadas en el Reino Unido, Italia, Bélgica, Francia, Grecia y los EE.UU., donde su aplicación ha llevado a modificaciones del original (Antonious 2012); (Castillo, Torstensson et al. 2008); (Marinozzi, Coppola et al. 2013). El uso de lechos biológicos se ha expandido a América Latina, en países como Perú, Guatemala y Ecuador, donde se están desarrollando algunos estudios piloto. Las biocamas pueden retener y degradar con eficacia una amplia gama de pesticidas, ya sea solos o en mezclas (Castillo and Torstensson 2007); (Fogg, Boxall et al. 2003); (Torstensson and Castillo 1997); (Vischetti, Capri et al. 2004); (Vischetti, Monaci et al. 2008). Varios factores afectan el rendimiento de los lechos biológicos, así se ha adaptado o modificado el Biobed original de Suecia estudiado por diferentes autores (Castillo, Torstensson et al. 2008); (Karanasios, Tsiropoulos et al. 2012). Estudios en la composición de la biomezcla mostraron que las mezclas de residuos del suelo orgánico pueden degradar inclusive mezclas complejas de pesticidas (Castillo and Torstensson 2007); (Fogg, Boxall et al. 2004). Se observó que paja, turba, y la proporción suelo recomendada: 50:25:25% v/v para la composición de la biomezcla, propicia un pH bajo en la mezcla favoreciendo el crecimiento de los hongos degradadores de lignina y productores de actividad fenoloxidasas, principales responsables degradadores dentro del consorcio que actúa. Karanasios, Tsiropoulos

et al. 2010 ha centrado su investigación en la identificación de subproductos de la práctica agrícola local, como alternativas a la turba o incluso paja. Vischetti, Capri et al. 2004 compararon el comportamiento de clorpirifós en dos sistemas: un biobed sueco y uno italiano modificado, la vida media del clorpirifós fue similar; pero el contenido de biomasa microbiana se redujo en un 25% y 50% respectivamente. (Coppola, Castillo et al. 2007) y (Vischetti, Coppola et al. 2007) estudiaron el efecto de la concentración inicial, co-aplicación y aplicaciones repetidas de clorpirifós, y metalaxil, concluyeron que los pesticidas se degradan con relativa rapidez debido a la comunidad microbiana presente. Un biobed cerrado con recirculación y para su uso en climas más fríos, reportó buenos resultados con la consideración que en dichos climas se requieren precauciones especiales para evitar problemas con el excedente de agua por poca evapotranspiración. (Husby 2010). En Bélgica, (De Wilde, Spanoghe et al. 2010) estudiaron los procesos de sorción y la degradación. La composición del biobed sueco ha sido eficaz para degradar pesticidas (Castillo and Torstensson 2007); (Vischetti, Capri et al. 2004), sin embargo, la biomezcla ha debido ser adaptada según las realidades de algunos países. (Urrutia, Rubilar et al. 2013). Se mostró que una mezcla con cáscara de avena, como sustituto parcial, era altamente eficaz en la degradación, con una vida media ($t_{1/2}$) valores de 28, 58, y 26 días, para la atrazina, clorpirifós, e isoproturón. Por el contrario, altos valores de $t_{1/2}$ (más de 100 días) se obtuvieron en mezclas con la sustitución total de paja con aserrín o cáscara de cebada. Una actividad biológica alta y estable se observó en las mezclas compuestas por cáscara de avena. Así, se observó que la paja puede ser parcial o totalmente sustituido por cáscara de avena, pero que la paja puede ser sólo parcialmente reemplazada por la cáscara de la cebada y el aserrín en el biomezcla para permitir eficazmente la degradación de pesticidas. Recientemente, (Diez, Tortella et al. 2013) evaluaron materiales lignocelulósicos alternativos (aserrín de pino) como sustitutos parciales de la paja en una biomezcla para la degradación de seis pesticidas aplicadas repetidamente (atrazina, isoproturón, iprodion, clorpirifós, diazinon, y carbendazim). Los resultados mostraron que la mayor eficiencia en la degradación se obtuvo en mezclas que contenían paja y cáscara de cebada. Es de destacar que nuestro grupo pudo comprobar que tanto afrechillo de arroz como de trigo en las proporciones clásicas de un lecho tipo sueco como sustituto de la paja y con dos tipos diferentes de suelos del país pueden bioconvertir: clorpirifós, su metabolito el triclorpridinol, endosulfán y sus metabolitos (Rivero, Niell et al. 2012; Rivero, Niell et al. 2016). Estos antecedentes, junto con experiencias a campo y de laboratorios con paquetes hortofrutícolas del grupo, sirven de sustento del presente proyecto que busca ampliar y dar versatilidad al primer sistema de biorremediación ya instalado en Uruguay por el grupo proponente aumentando el alcance de compuestos a remediar, fundamentalmente en agricultura de secano como herbicidas e insecticidas y buscando dar versatilidad a los diseños a campo para obtener una herramienta útil al sistema productivo del país. A través de este proyecto se buscó contribuir a las BPAs de la agricultura extensiva comprobando de forma inequívoca la eficacia de los Biobeds para el paquete utilizado en este sistema productivo en las condiciones del país, así como a la caracterización del microbiota responsable de la actividad y la búsqueda de ensayos sencillos para que los productores puedan determinar el rendimiento y la vida útil de sus dispositivos de forma sencilla y rápida.

Metodología/diseño del estudio

Durante la ejecución del proyecto, se siguió el diseño experimental y metodología de trabajo planteados en la postulación. Se incorporaron mejoras/ajustes, en discusión con todo el equipo de trabajo basados en resultados obtenidos por el grupo de investigación luego de la postulación y antes de la ejecución de este proyecto, fundamentalmente en hortifruticultura.

El primer punto definido fueron los compuestos para evaluar su bioconversión, basados en el paquete tecnológico convencional para un cultivo extensivo de soja. Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica de los reportes de uso, la mayor frecuencia de hallazgos y la significancia ambiental de los compuestos utilizados en el cultivo de soja, con el asesoramiento de Ing. Agrónomos especialistas en agricultura de secano. Se seleccionaron 15 compuestos y se planificó su aplicación acompañando cronológica y estacionalmente el ciclo del cultivo de soja. Los compuestos seleccionados fueron: 2,4 D, dicamba, sulfentrazone, saflufenacil, metolaclor, clorpirifós, triflumuron, abamectina, clorantraniliprole, tiametoxam, cialotrina, epoxiconazol y pyraclostrobin, glifosato y AMPA. Estos se clasificaron teniendo en cuenta sus características fisicoquímicas para optimizar los parámetros de análisis en los 3 sistemas instrumentales: LC-MS/MS, GC-MS/MS e IC-MSMS.

Se definieron los componentes de la matriz de trabajo (biomezcla) para la construcción del biorreactor y el ajuste analítico. Se seleccionó como desecho inductor del sistema ligninolítico el afrechillo de arroz, con turba y suelo impactado por los agroquímicos en estudio en las proporciones 50:25:25, sin agregado de inóculo.

Se ajustaron y validaron las metodologías analíticas para la determinación inequívoca de los compuestos seleccionados. Dentro del paquete de analitos seleccionados estaba el glifosato, imposible de determinar por métodos multirresiduos. Se ajustó un método Multirresiduo (MRM) para todos los compuestos del estudio con cromatografía gaseosa y líquida acoplada a masas en tándem (QqQ) y un método Monorresiduo (SRM) específico para analizar glifosato y AMPA. Se evaluaron diferentes ajustes metodológicos empleando metodologías modernas de preparación de muestra basadas en el esquema de QuEChERS. La metodología MRM que fue seleccionada fue una extracción con acetonitrilo con salting-out y un clean-up dispersivo y cumplió con los parámetros de validación rindiendo extractos limpios analizables por los dos sistemas instrumentales, alcanzando valores de detección de $\mu\text{g}/\text{kg}$ permitieron evaluar la eficiencia del biopurificador.

MRM: 2 g de biomezcla previamente liofilizada, se adicionan 8 g de agua ultra pura y se agita manualmente. Se agregan 10 mL de acetonitrilo y se agita manualmente. Luego se agregan las sales de salting-out (4 g MgSO_4 anhidro y 3 g de NaCl). Agitación vigorosa durante 3 minutos y centrifugación a 3500 rpm. Del sobrenadante se toman 7 mL y purifican con 1050 mg de MgSO_4 anhidro y se agita en vortex durante 30 segundos, se centrifuga a 5000 rpm, Se filtra el extracto y almacena en vial de 12 mL, se realizan las diluciones correspondientes para inyectar en LC-MS/MS. Para el análisis en GC-MS/MS, se evapora a sequedad una alícuota de la muestra bajo corriente de nitrógeno y se retoma en AcOEt .

Para la determinación de glifosato y AMPA, al comienzo del proyecto se realizó utilizando LC-MS/MS, con condiciones específicas de extracción como es el método QuPPE y columnas diseñadas especialmente. Las condiciones instrumentales trabajadas no resultaron para la determinación de estos compuestos. Posteriormente en diciembre de 2019 con un proyecto ANII-PEC el grupo incorporó un cromatógrafo iónico acoplado a espectrometría de masas tándem, y utilizando una columna de intercambio iónico Dionex IonPac AS11, una precolumna Dionex IonPac AG11 con una temperatura de horno de 40°C y como fase móvil agua con KOH , se volvió a ajustar la técnica para determinar Glifosato y AMPA utilizando por primera vez una preparación de muestra novedosa.

SRM: 2g de biomezcla liofilizada, se extraen con 10mL agua ultrapura y 10mL de MeOH acidificado con 1% HCOOH . Agitación axial con shaker, centrifugación y filtración del extracto para análisis con IC-MS/MS. (Herrera et al 2019).

En paralelo con los ajustes de las metodologías analíticas, se trabajó en el diseño de los biopurificadores a escala de semi campo. Los componentes del lecho biológico fueron una variación de modelo sueco utilizando afrechillo de arroz en lugar de paja. El proyecto planteaba inicialmente la utilización de inóculos de microorganismos provenientes de una colección de más de 120 basidiomicetos nativos aislados e identificados por técnicas tradicionales, y de biología molecular en la Cátedra de Microbiología de la FQ, que se había demostrado que eran capaces de bioconvertir compuestos clorados recalcitrantes.

Como anteriormente los resultados a escala de laboratorio con y sin inóculo no tuvieron diferencia significativa, se definió trabajar en el ensayo en condiciones de campo sin incorporación de inóculo sobre la biomezcla, facilitando su aplicación por los productores.

La capacidad de crecer y biotransformar los compuestos modelos evaluados previamente llevó a la caracterización de consorcios microbianos nativos responsables de la bioconversión del grupo de analitos en estudio.

Se montó, en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) una estructura, invernadero, donde se instalaron los biopurificadores a escala de semi campo. Se utilizaron bandejas de diferentes geometrías: 3 bandejas rectangulares y 3 bandejas cilíndricas, conteniendo 15 y 10 kg de biomezcla respectivamente y blancos. Se evaluaron dos geometrías, con el objetivo de estudiar la influencia de la misma y poder plantear la herramienta adaptable a la disponibilidad de cada productor, en condiciones de evitar procesos de anaerobiosis. Una vez instaladas, se procedió a la aplicación de los formulados comerciales de acuerdo con el cronograma para la agricultura de secano (Tabla 1). La aplicación se realizó emulando el ciclo de aplicación agrícola, respetando los tiempos productivos entre adiciones y buscando que el sistema de aspersión fuera tal que se asemejara lo más posible a una aplicación a campo (Figura 1).

Posteriormente se tomaron muestras siguiendo el plan de muestreo propuesto: una vez por semana para asegurar el correcto estudio de biodegradación hasta que se termine el periodo de aplicación, pasando luego a muestrear cada 15 días. Durante cada toma de muestra, se realizó también el control de humedad (40%). Las muestras tomadas se almacenaron en freezer, se liofilizaron y se prosiguió con la determinación analítica para evaluar degradación.

El seguimiento del proceso de biopurificación (toma de muestras y análisis de las biocamas) se realizó de acuerdo al cronograma de adiciones planificado (Tablas 1 y 2). Cada punto de muestreo consistió en una muestra compuesta de 5 puntos de cada cama, tomados con taladro holandés y homogenizadas para lograr representatividad y homogeneidad. Todas las muestras fueron liofilizadas en las mismas condiciones que la biomezcla blanco usada para ajuste y validación de la metodología analítica. De cada muestra compuesta se realizaron 2 repeticiones de análisis por cama, haciendo un total de 15 análisis por cada fecha de muestreo, esto sin considerar las diluciones sucesivas que fueron necesarias según

la concentración de cada compuesto en cada muestreo. Es de destacar que el grupo de compuestos estudiados debió ser analizado trabajando con ionización por electrospray en modo positivo y negativo, duplicándose el número de análisis instrumentales en cada muestra. Luego se trabajó en el procesamiento y tratamiento de datos. Se realizó el re-análisis de aquellas muestras cuyos valores de concentración quedaban por fuera del rango lineal de trabajo. Finalmente se realizó el ajuste del comportamiento de los pesticidas a un modelo de disipación de cinética de primer orden.

La segunda gran etapa del proyecto fue instalar una cama biológica a nivel de campo. La misma fue instalada en un predio de un productor rural, que presentaba una problemática relacionada con la deposición final de los efluentes generados durante el lavado de su equipo de aspersión y demás prácticas agrícolas. Evaluando los volúmenes generados en un período de 6 meses, se decidió construir una cama con una capacidad de 2 m³. La cama constó, de 2 tanques de 1000L (uno encima del otro) donde se distribuyó la biomezcla. Conectado a estos dos tanques había un tanque donde se vertían todas las aguas generadas y se asperjaba la cama con bomba de manera controlada. La distribución espacial permitía que desde el primer tanque con biomezcla pasaran los lixiviados por gravedad a la segunda biocama. Donde había una conexión a otro tanque enterrado, que por gravedad recogía los últimos lixiviados, recirculándolos con la misma bomba a la biocama nuevamente. Los tanques fueron conectados a través de un sistema de caños de PVC de forma de controlar el pasaje de efluente. Se destaca del montaje de la biocama, la instalación del tanque de contención de efluentes previo a la biocama. Esto permitió controlar la humedad del sistema y el volumen de adición de los efluentes. La construcción de la cama se realizó en octubre de 2019, con el fin de adicionar los efluentes generados durante el barbecho de la soja y las aguas de lavado que se generaran durante el ciclo del cultivo (Figura 3). Es de señalar que el predio de la Familia Gorla, donde se instaló la biocama es un predio experimental, donde se sembraban otros cultivos como el maíz por lo que se evaluaron los detectados. El periodo de control de la biocama duró 196 días, muestreándose a los 15, 35, 61, 84 y 196 días contemplando un período previo de un mes donde se realizó la adaptación de los microorganismos al sistema. Los compuestos aplicados: glifosato, paraquat, metolaclor, flumioxacin, acetoclor, y s-metolaclor, además se detectaron clorpirifós y captán provenientes del material usado para la biomezcla.

Al finalizar la evaluación analítica, se estudió la toxicidad de la biomezcla resultante mediante dos bioensayos. Los organismos seleccionados fueron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y *Eisenia foetida*.

Ensayo de *L. sativa*: colocar dentro de una placa de Petri un papel de filtro, añadir sobre el papel 5 mL de muestra (3 réplicas por muestra) y con una pinza se colocan 20 semillas. Tapar las placas y colocarlas en bolsas de plástico para evitar la pérdida de humedad, luego incubarlas por 120 días 22 ± 2 °C en completa oscuridad. Retirar las placas de las bolsas y destaparlas; con la ayuda de una pinza retirar las plántulas. Medir las raíces e hipocótilos, para luego calcular los porcentajes de recuperaciones (Sobrero & Ronco, 2004).

Ensayo con *Eisenia foetida*: pesar dentro de bollones de vidrio 300 g de biomezcla (triplicado por cada biocama) y agregar 10 juveniles de *E. foetida* limpias y pesadas. Incubar las por 15 días a 22°C con 12 horas de fotoperíodo. Finalizado este período, evaluar el porcentaje de supervivencia y el peso final de los organismos vivos (OECD 207:1984).

La caracterización microbiológica se realizó a partir de muestras tomadas de los biorreactores. Con el objetivo de aislar los microorganismos y conocer la densidad microbiana de microorganismos cultivables, se realizó el recuento de aerobios mesófilos y el recuento de hongos y levaduras presentes en cada una de las muestras tomadas: 2/12/2019, 18/01/2020, 10/02/2020 y 04/07/2020, liofilizadas y conservadas hasta su análisis. Para la determinación de cantidad de microorganismos cultivables presente se realizó: recuento de aerobios utilizando el medio Plate Count Agar (PCA) y recuento de Hongos y Levaduras con medio Potato Dextrosa Agar (PDA). El ensayo se realizó a través del método de siembra incorporada en placas de Petri, que contenían el medio PCA se incubaron por 48 h a 37 ± 2 °C y las del medio PDA 5 días a 22 ± 3 °C. Paralelamente, se realizó la búsqueda en la muestra de microorganismos capaces de tolerar algunos de los compuestos evaluados: avermectina, metolaclor, pyraclostrobina, tiametoxam, lambda-cihalotrina. Fueron adicionados a los medios PCA y PDA para tener una concentración final en placa de 10 mg/kg y se incubaron en las condiciones antes descritas. Se aislaron los microorganismos capaces de crecer en estas condiciones, y luego se realizó un proceso de identificación.

Para la identificación microbiana se realizaron pruebas bioquímicas a partir de cultivos puros con 24h de crecimiento. Se utilizó un sistema miniaturizado de pruebas bioquímicas API® de Biomerieux. Los sistemas identificados como API20E® y API20NE® permiten la identificación de microorganismos pertenecientes a enterobacterias y otros bacilos Gram- no exigentes, fermentadores o no de glucosa (www.biomerieux.es).

Resultados, análisis y discusión

Desarrollo y validación de metodologías analíticas:

La metodología multiresiduo se desarrolló para la biomezcla y los analitos definidos para el estudio, fue validada según el Documento SANTE 2019/XX para validación de métodos en análisis de residuos de pesticidas. Se evaluó veracidad, precisión, linealidad, efecto matriz, y límite de cuantificación. Los valores obtenidos para la validación por LC y GC-MS/MS se presentan (tablas 4 y 5). El pesticida flumioxazin se intentó incorporar al método posteriormente dado que el productor lo utilizaba, pero no cumplió con los criterios establecidos para su validación. Esto se explica por la inestabilidad del compuesto en acetonitrilo, que es el solvente de extracción. Los parámetros del método fueron informados en el informe de avance.

La metodología monoresiduo para glifosato, que no se pudo ajustar en el primer año del proyecto, se realizó utilizando un cromatógrafo iónico acoplado a espectrometría de masas en tándem. Este sistema instrumental, permitió solucionar los inconvenientes presentados en el informe de avance para determinar Glifosato y AMPA con LC-MS/MS. Se evaluaron 2 metodologías analíticas para su determinación en la biomezcla: el método QuPPE utilizado para compuestos polares, y una modificación de éste reportado por Herrera et al. Diferenciándose en la masa de muestra utilizada (5g en QuPPE vs 2g) y en el tiempo de agitación. Se validó la metodología con mejor performance.

El IC-MS/MS, permitió realizar el ajuste de glifosato obviando los inconvenientes planteados respecto a la reproducibilidad de tiempo de retención, uso de buffers no volátiles y tiempos muy largos de acondicionamiento del sistema cromatográfico. Se presentan los parámetros instrumentales para glifosato y AMPA y la veracidad, reproducibilidad y rango lineal para glifosato por IC-MS/MS (Tablas 3 y 6). Es de destacar que fue la primer metodología validada con este nuevo equipo.

Si bien los porcentajes de recuperación son menores al rango exigido, (80-120%), por presentar baja dispersión, se lo considera aceptable (SANTE).

Degradación de pesticidas a escala de semi-campo.

En el Anexo 2 se presentan las curvas con el comportamiento de cada pesticida en los biolechos. Los resultados están expresados en base seca de biomezcla.

Las curvas de degradación presentadas fueron realizadas utilizando el promedio de 3 réplicas genuinas para cada una de las geometrías evaluadas. Fue calculada la desviación estándar para cada muestra tomada. Además, en caso de ser posible, se ajustó la curva a un modelo exponencial para comparar los $t_{1/2}$ (tiempo de vida media) obtenidos, con los $t_{1/2}$ reportados a campo.

Herbicidas

Para glifosato, los resultados muestran diferencias significativas entre la concentración el día de aplicación y el día 21. Se observa que una segunda aplicación aumenta la cantidad de herbicida en la cama pero a los 56 días post-aplicación las concentraciones son menores al LOQ, evidenciando nuevamente su disipación. No se detectó su presencia en los restantes días de muestreo, pero si trazas de AMPA, su principal metabolito.

El 2,4-D fue aplicado el día 0, por única vez. Las curvas de degradación obtenidas para ambas geometrías se muestran hasta el día 72, cuando los niveles de concentración quedaron por debajo del LOQ del método. Para ambas geometrías las curvas presentaron un ajuste exponencial. Se calcularon las $t_{1/2}$: para la geometría rectangular fue de 21,7 días, y para la circular de 15,1 días. El 2,4-D es un herbicida de persistencia moderada, con una vida media a campo de 59,3 días. Bajo las condiciones ensayadas, se obtuvo una vida media menor a la mitad de la reportada en suelo, confirmando que la vía principal de degradación de este compuesto es microbiana (Chali 2019; Walters, 2019.). Los niveles de degradación obtenidos a lo largo de los 72 días de ensayo fueron de 92 y 94% para la geometría rectangular y circular, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas.

Dicamba fue aplicado el día 0 del experimento, a partir del día 72, las concentraciones encontradas fueron menores al LOQ. Las curvas de degradación siguieron un ajuste exponencial, con valores de $t_{1/2}$ para la geometría rectangular de 28,9 días y para la circular de 21 días. Los porcentajes de degradación fueron 74% en geometría rectangular y 91% en la circular, observándose diferencias significativas entre ambos. Dicamba es un herbicida persistente en suelos, con una vida media en campo entre 7,9 a 592 días bajo diferentes condiciones siendo la biodegradación su principal vía de disipación.

Los herbicidas saflufenacil y sulfentrazone, fueron aplicados en noviembre 2018. Se estudió su degradación para ambas geometrías hasta el día 384 del ensayo.

Para el saflufenacil se obtuvo una degradación de 84% para la geometría rectangular y 90% para la circular al día 384. Este compuesto se lo considera no persistente, tiene alta movilidad en suelo y posee vías de degradación tanto bióticas como abióticas. En estudios realizados reportan que tiene una vida media en campo en condiciones aeróbicas de 1 a 5 semanas (US EPA).

Los resultados de degradación obtenidos para sulfentrazone fueron de 89% en geometría rectangular y de 80% en la circular. Las vías de degradación del sulfentrazone son mayormente microbianas y según estudios reportados presentan una vida media a campo de 18 meses a 500 días, según el tipo de suelo y las condiciones ambientales (Gerhke, et al., 2020).

Metolaclor fue aplicado en noviembre, como saflufenacil y sulfentrazone. Este posee persistencia de moderada a alta, degradándose en suelo por la biota. Su $t_{1/2}$ en suelo varía de 2,5 a 289 días dependiendo de las condiciones ambientales y el tipo de suelo (Zemolin et al, 2014)

En ambos biobeds se obtuvo el 98% de degradación. En la geometría circular se alcanza este valor al día 126 y en la rectangular al día 159. A partir de entonces las concentraciones obtenidas fueron menores al LOQ.

2) Insecticidas

Abamectina y clorantniliprole fueron aplicados en abril 2019. Su degradación fue monitoreada durante 241 días. Los porcentajes de degradación de abamectina fueron de 71% en la geometría circular y 80% en la rectangular. Para este compuesto se ha reportado una biodegradación lenta y $t_{1/2}$ de 15 a 81 días en suelo.

Para clorantniliprole no se observa degradación hasta el día 205. En el último muestreo, el día 241, se observó una degradación de 59% para la geometría circular y 65% para la rectangular. Clorantniliprole está catalogado como un pesticida persistente, reportándose vidas medias en suelo mayores a 100 e incluso 1000 días. Este compuesto es fuertemente retenido en el suelo y no está disponible para su degradación. Los datos concuerdan con la lenta degradación observada en los biobeds.

Clorpirifos se incluyó en el estudio, presentó un comportamiento muy heterogéneo, distinto al obtenido en otros experimentos anteriores. Fallas en el sistema de detección o en una retención diferencial por el suelo usado pueden ser las causas de este comportamiento.

Lambdacialotrina, tiametoxam y triflumuron fueron aplicados en dos oportunidades a lo largo del ensayo: abril-mayo y febrero-marzo 2019. Su comportamiento fue evaluado durante 241 días desde la primera aplicación (342 días para triflumuron). Para lambdacialotrina se obtuvieron porcentajes de degradación de 66% y 81% para la geometría rectangular y circular respectivamente. En el caso de tiametoxam, ambas geometrías presentaron perfiles de degradación similares: 72% para la geometría rectangular y 65% para la circular. Para triflumuron, se observó al día 54 de la primera aplicación una notoria disminución de la concentración en ambas geometrías. Aumenta la concentración luego de la segunda aplicación y es degradado un 91% para la geometría circular y 87% para la rectangular.

Los fungicidas piraclostrobina y epoxiconazol fueron monitoreados por 241 días, obteniéndose perfiles de degradación similares en las curvas realizadas para ambas geometrías. Durante todo el experimento se observaron porcentajes de degradación de 73 y 61% en la geometría circular y 74 y 66% en la rectangular para el caso de piraclostrobina y 61 y 66% para epoxiconazole.

Curvas decaimiento a escala de campo:

El productor aplicó 3 compuestos: Flumioxazin, Acetoclor, y Metolaclor. Flumioxazin, no fue evaluado y se deberá desarrollar otro método de análisis.

El Acetoclor en el primer muestreo se encontraba en $92,9 \pm 40,5 \text{ ?g/kg}$, y en el segundo muestreo la concentración fue menor al LOQ (50 ?g/kg), pudiéndose informar su concentración solo en 2 muestreos de los 5 realizados. Cabe destacar que en el quinto muestreo la concentración de acetoclor es mayor a la del día cero, debido a una re-aplicación del herbicida por parte del productor.

El metolaclor en el último muestreo a los 216 días, mostró una degradación del 96%. La degradación de metolaclor fue más lenta que en el ensayo a semi campo, pudiendo adjudicarse a las altas concentraciones detectadas.

Durante el monitoreo de la cama, se muestrearon los lixiviados. Los resultados mostraron la presencia de residuos de los pesticidas utilizados evidenciando su percolación. Esto indica la importancia de recoger el lixiviado e incorporarlo nuevamente al biorreactor. Es de destacar, para metolaclor, que la concentración del pesticida en el lixiviado, también decae en el tiempo, acompañando su comportamiento en el biolecho.

Caracterización biológica:

El ensayo demostró una alta densidad microbiana en las condiciones evaluadas. Se observó una diferencia entre 2 y 4 órdenes entre el recuento de aeróbicos y el recuento de hongos y levaduras cultivables (Tabla 6). Esta proporción obtenida establece un equilibrio en el sistema como sucede naturalmente en muestras de suelo, lo que demuestra que los compuestos evaluados no estarían afectando directamente la densidad microbiana, pero si favorecen una selección por competencia hacia los microorganismos con tolerancia a agroquímicos.

Del recuento obtenido en los medios fortificados con los pesticidas ensayados se aislaron microorganismos cultivables. Se obtuvo mayor recuento de microorganismos aeróbicos del orden de $10E+4$ y $10E+06$, se observó un total de 14 colonias con características fenotípicas diferentes que continuaron la etapa de identificación. En paralelo se pudieron aislar 2 levaduras y 5 hongos. Con las colonias obtenidas se realizó un proceso de aislamiento y purificación (Figura 3).

Para las bacterias se realizó la observación microscópica y la tinción de gram. A partir de los cuales se seleccionaron los bacillus Gram – para continuar su proceso de identificación fenotípica a través de pruebas bioquímicas. Finalmente se seleccionaron 8 cepas y se utilizó los sistemas miniaturizados API (BioMérieux). Se avanzó en el proceso de caracterización bioquímica de las bacterias a través de 39 pruebas (Tabla 8). Dada las limitaciones propias del sistema de identificación fenotípica, se necesita la confirmación de la identidad de las cepas a través de técnicas de biología molecular mediante el análisis de ARNr 16S a modo de complementar el proceso y lograr una identificación más precisa. (Widada, J.et al.).

Las cepas puras de microorganismos fueron conservadas a 5°C en glicerol, para futuras aplicaciones y se construyeron fichas de seguimiento para generar un cepario para la investigación.

Se realizó la evaluación eco-toxicológica, los resultados obtenidos para el ensayo semi campo con las muestras de las biocamas al finalizar se presentan en Tabla 9. Se observa la muerte de las Eisenia foetida expuestas a las ambas muestras. con supervivencia menor al 30% en todos los casos, lo que impidió evaluar la diferencia de pesos en los organismos expuestos. En el sustrato blanco y el control negativo, con suelo artificial, se obtuvo un 100% de sobrevivencia, condición necesaria para la aceptación del ensayo.

Para el ensayo de toxicidad aguda con semillas de Lactuca sativa se realizó un análisis de varianza mediante el test de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los resultados se muestran en el gráfico 10, observándose diferencias significativas entre las muestras y el blanco, con notoria inhibición del crecimiento de las radículas expuestas a las muestras problema.

Cabe destacar que los resultados observados en ambos ensayos, concuerdan en la presencia de residuos que afectan la supervivencia y desarrollo de los organismos testeados. Los recipientes rectangulares, son los que mostraron un menor grado de toxicidad. Las camas estaban aún contaminadas al momento de este informe final, debiéndose seguir el control ecotoxicológico a pesar de la finalización del proyecto

Conclusiones y recomendaciones

*Se ha demostrado la capacidad degradadora de las camas biológicas para este tipo de producción intensiva. Los desafíos que se planteaban para el desarrollo de un sistema con este tipo de producción eran varios: el uso intensivo de herbicidas, compuestos los que, o bien poseen un alto grado de movilidad en suelos o pueden ligarse al mismo dificultando su degradación, así como los grandes volúmenes de efluentes que se generan en el lavado de la maquinaria específica que eran totalmente nuevos para el grupo de trabajo y fueron satisfactoriamente solucionados.

*La metodología analítica desarrollada para el propósito específico resultó ser una herramienta fundamental para monitorear la degradación de los pesticidas del estudio y la vida útil de la cama.

*Se comprobó por primera vez que las camas biológicas son una respuesta para la remediación del paquete de herbicidas utilizados en agricultura extensiva.

*Los resultados mostraron que las camas biológicas son una herramienta efectiva para degradar simultáneamente los distintos tipos de pesticidas utilizados en el cultivo de soja.

*Los experimentos realizados, tanto a escala piloto a campo como real, resultaron adecuados para evaluar el desempeño de los biobeds en condiciones reales.

*En general no se encontraron diferencias significativas entre las dos geometrías ensayadas en el experimento a escala piloto.

* Se diseñó una cama biológica adecuada a las necesidades de un productor sojero en un campo experimental. Como diferencia al ensayo a semi campo, se incorporo un sistema de recirculación de lixiviados para asegurar la retención y la degradación de los pesticidas.

*Se estudiaron otros compuestos además de los testeados a semi-campo. La degradación del metolaclor fue similar en la escala piloto y en el experimento a campo.

*Para todos los compuestos estudiados en ambos experimentos se observó una degradación mayor al 80% en el período de estudio.

*Se evaluó la densidad microbiana en el sistema a campo, y se pudieron aislar microorganismos con probada capacidad biotransformado.

*Se comenzó la confección de un cepario perteneciente al Polo Holístico de Paysandú, con el objetivo de contar con microorganismos con probada capacidad bioconversora de xenobióticos para futuras aplicaciones.

*Se corroboró una vez más, que la degradación de las moléculas se corresponde con su naturaleza química, sus características fisicoquímicas y el tipo de microbiota de la biomezcla.

*Como aspecto relevante, por primera vez en el país, se ajustó una metodología nueva para la determinación de glifosato utilizando cromatografía iónica acoplada a masas en tándem, comprobándose su degradación bajo las condiciones del estudio.

*Para aquellos compuestos que son aplicados más de una vez en el ciclo del cultivo, si bien se evidencia degradación, no es posible aplicar los modelos de regresión usuales.

Las conclusiones obtenidas y experiencia adquirida en estos casi 3 años de proyecto, nos plantea el desafío de realizar algunas recomendaciones:

A nivel de montaje y monitoreo de la cama desde un punto de vista analítico:

*El tiempo de adaptabilidad de los microorganismos previo a la adición de las aguas de lavado es fundamental, por lo que se recomienda el armado de la cama y la espera de 15 días al menos para la primer aplicación de manera de permitirle a los organismos bioconversores desarrollar su sistema enzimático.

* Los análisis temporales del contenido de pesticidas en las camas biológicas durante el tiempo de aplicación son útiles para estudiar la degradación de aquellos compuestos que se aplican sólo una vez.

*Cuando se da más de una aplicación de un compuesto, no tiene sentido estudiar su degradación temporal. Incluso la influencia de la incorporación de los nuevos compuestos aplicados influye en la flora microbiana presente y se altera el proceso de degradación. Es aconsejable estudiar la performance de la biocama, realizando la toma de muestras analíticas en forma periódica después de aplicados todos los pesticidas., en el período de no aplicación o descanso del cultivo.

*Si se trata de una rotación invierno-verano para darle un periodo de asentamiento y mejora de la productividad a la flora microbiana en la biocama, sería una buena herramienta contar con dos sistemas en paralelo e intercalar su uso.

*Establecer un sistema de muestreo que asegure una mayor representatividad, debido a que por ser un sistema biológico y dinámico el crecimiento de los microorganismos y por tanto la capacidad degradadora no son constantes ni parejas en todo el sistema

A nivel de productores:

* Conocer de antemano los volúmenes que quien busque instalar la cama genere de todas las manipulaciones que realiza para poder dimensionar el diseño de la mejor manera.

*Llevar un registro de aplicaciones y de volúmenes de lavado de la maquinaria.

*Establecer un tiempo de adaptabilidad de los microorganismos previo a la adición de las aguas de lavado.

*Disponer de un tanque de acopio donde lleguen todas las aguas de lavado antes de verterlas a la cama, de manera de regular el volcado de las aguas a biorremediar para no exigir el sistema microbiano.

*Disponer de un reservorio para recolectar los lixiviados de forma de evitar la anaerobiosis de la cama y por lo tanto la baja en la eficiencia de la misma por inundación. Se comprobó que en el campo hay generación de lixiviados, los que varían con las condiciones climáticas y los volúmenes a biorremediar.

*Racionalizar la toma de muestras analíticas: Una serie al momento de la construcción de la cama y otra después de haber aplicado todos los pesticidas. Al finalizar el ciclo se deben realizar muestreos quincenales o mensuales para apreciar la biodegradación en el tiempo de los contaminantes. Una vez demostrada su degradación, el control puede realizarse antes de comenzar cada ciclo productivo para evaluar su viabilidad y encarar, de ser necesario las medidas de mantenimiento que sean pertinentes.

*En caso de realizarse lavados del sistema recircular el agua de lixiviado para la correcta transformación del lixiviado.

*Los biobeds pueden ser una práctica complementaria dentro de las buenas prácticas agrícolas para asegurar la seguridad alimentaria y la sustentabilidad ambiental.

Actividades complementarias: Divulgación y Difusión de los resultados obtenidos.

*Es de destacar que se participó como grupo de Biorremediación en la semana EXPO-ACTIVA 2019, Soriano. En dicha instancia, se construyeron lechos biológicos como demostración y todos los integrantes del grupo estuvieron presentes en el local de Buenas Prácticas Agropecuarias (RED BPA) respondiendo preguntas y explicando el funcionamiento de estos dispositivos a todo el público en general, así como a las autoridades que participaron del evento.

*Una actividad similar a ésta, en cuanto a explicación y demostración del montaje de una cama a escala de laboratorio, se realizó en las Jornadas de ERRO realizadas en diciembre de 2019 en Dolores, Soriano.

*También, parte del equipo de investigación ha participado en charlas puntuales de divulgación y transferencia de conocimiento con las empresas ERRO (2020) y AMBEV (2020), en estos casos se visitó los predios, se discutió los volúmenes que utilizan, los grupos de compuestos que cada empresa busca mitigar, y también posibles lugares en el predio donde realizar la instalación de la cama biológica.

En particular con AMBEV, se está tramitando la firma de un convenio con Facultad de Química-GACT para el apoyo en el agrado y la evaluación analítica por un año de la cama que instalen. Ya en experiencias informales la empresa colaboró el mes pasado con el grupo aportando los formulados de los compuestos que aún no hemos evaluado con la biomezcla del estudio para realizar el ajuste analítico específico y ensayos a escala de laboratorio del porcentaje de bioconversión.

*Durante el año 2020, el grupo se preparó para el montaje de un stand en la EXPO Melilla 2020 que fue suspendida por la pandemia. Asimismo, los técnicos del proyecto FAO plaguicidas con los Profs. Cesio y Hienzen visitaron la cama biológica instalada en el marco del proyecto FMV 136757 en el predio del Ing. Gorla en Fray Bentos donde realizaron tomas y filmaciones para difundir en conjunto con las camas montadas en predios hortofrutícolas con el fin de dar amplio conocimiento de la aplicabilidad de esta herramienta. Esto se presentó en diferentes jornadas virtuales realizadas durante el año 2020.

Congresos y eventos:

Los resultados de avance de investigación han sido presentados en distintos eventos científicos a nivel nacional e internacional:

Presentaciones orales:

1. "Implementación y experiencias a campo de diferentes lechos biológicos instalados en Uruguay". M.V. Cesio, N. Besil, S. Rezende, L. Archondo, S. Niell, R. Hladki, N. Gerez, C. Rodriguez, H. Heinzen, A. Rivero. IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Argentina y Ambiente, 2019
2. "Assessment of the Safe and Efficient Use of Biobeds through Analytical Control." A. Rivero. Latin American Pesticide Residues Workshop (LAPRW), Brasil, 2019
3. "Mitigation: Experiences in Uruguay". María Verónica Cesio. 3er Meeting RALACA, Brasil, mayo, 2019.
4. Implementación y experiencias de la instalación de camas biológicas en Uruguay. En el marco del proyecto FAO Plaguicidas, marzo 2020.
5. "Camas biológicas: un producto biotecnológico comprobado para la remediación de diferentes paquetes tecnológicos". Anisleidy Rivero. 4to. Taller Latinoamericano de Lechos Biológicos. modalidad virtual, 3-4 diciembre 2020. Es de destacar que este Taller fue enteramente organizado por el grupo de trabajo del presente proyecto, se dictaron 10 conferencias de primer nivel y participaron profesionales y estudiantes de más de 15 países con los que se realizó un fructífero intercambio de resultados y experiencias.
6. "Evaluation of a biobed performance during the simulated application of pesticides used in soybean crops and the subsequent scaling to field". S. Rezende, N. Besil, L. Archondo, C. Rodriguez, A. Rivero, S. Niell, R. Hladki, H. Heinzen, M.V. Cesio. Latin America Pesticide Residues Workshop (LAPRW), modalidad virtual, 18-20 mayo, 2021, seleccionado para presentación oral por el Comité Científico evaluador.

Posters:

"Adecuación de un lecho biológico en condiciones de campo para el estudio de degradación de pesticidas utilizados en el paquete tecnológico de soja" S. Rezende, N. Besil, L. Archondo, A. Rivero, S. Niell, R. Hladki, H. Heinzen, M.V. IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Argentina y Ambiente, 2019.

La presentación fue realizada por Sofia Rezende, quien hiciera usufructo de la beca de maestría asociada al proyecto durante 6 meses, renunciando luego por haber ganado un concurso de grado 2 efectivo en el Cenur del Litoral, Sofia continúa trabajando en el proyecto, ya realizó su defensa oral intermedia, con la dirección de las Dras. Besil y Cesio, para el pasaje a los estudios de posgrado con el tema de su tesis enmarcada en el presente proyecto. Se encuentra actualmente

realizando una pasantía en Viena en los Laboratorios del Organismo Internacional de Energía Atómica, donde se busca desarrollar la metodología analítica para los posibles metabolitos de degradación de los compuestos del proyecto que en Uruguay no están disponibles y luego adaptar la metodología y evaluarlos en las muestras de campo que se conservarán liofilizadas para tal fin.,

Trabajos científicos:

De los resultados totales de este proyecto, el grupo de trabajo pretende sacar dos publicaciones que están siendo preparadas, una con la metodología analítica, destacándose el ajuste de Glifosato y AMPA por cromatografía iónica y otra con los excelentes resultados en condiciones reales que se han obtenido tanto a escala de semi campo como campo, durante todo el proyecto.

Referencias bibliográficas

- Andreoni, V. and L. Gianfreda (2007). "Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(2): 287-308.
- Antonious, G. F. (2012). "On-farm bioremediation of dimethazone and trifluralin residues in runoff water from an agricultural field." *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 47(7): 608-621.
- Castillo, M. d. P. and L. Torstensson (2007). "Effect of Biobed Composition, Moisture, and Temperature on the Degradation of Pesticides." *Journal of agricultural and food chemistry* 55(14): 5725-5733.
- Castillo, M. D. P., L. Torstensson, et al. (2008). "Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use? A Review." *Journal of agricultural and food chemistry* 56(15): 6206-6219.
- Cooper, R. J., P. Fitt, et al. (2016). "Assessing the effectiveness of a three-stage on-farm biobed in treating pesticide contaminated wastewater." *Journal of environmental management*.
- Coppola, L., M. d. P. Castillo, et al. (2007). "Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to southern Europe conditions." *Journal of agricultural and food chemistry* 55(2): 396-401.
- De Wilde, T., P. Spanoghe, et al. (2007). "Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the occurrence of point source contamination." *Pest Management Science* 63(2): 111-128.
- De Wilde, T., P. Spanoghe, et al. (2010). "Transport and degradation of metalaxyl and isoproturon in biopurification columns inoculated with pesticide-primed material." *Chemosphere* 78(1): 56-60.
- Diez, M. C., G. R. Tortella, et al. (2013). "Influence of novel lignocellulosic residues in a biobed biopurification system on the degradation of pesticides applied in repeatedly high doses." *Electronic Journal of Biotechnology* 16: 11-11.
- Edwards, C. (2013). *Environmental pollution by pesticides*, Springer Science & Business Media.
- Fischer, P., H. Hartmann, et al. (1998). "Gewässerbelastung durch Pflanzenschutzmittel in drei Einzugsgebieten." *Gesunde Pflanzen* 50(5): 142-147.
- Fogg, P., A. B. A. Boxall, et al. (2004). "Degradation and leaching potential of pesticides in biobed systems." *Pest Management Science* 60(7): 645-654.
- Fogg, P., A. B. A. Boxall, et al. (2003). *Pest Manage. Sci.* 59: 537.
- Frede, H. G., P. Fischer, et al. (1998). "Reduction of herbicide contamination in flowing waters." *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 161(4): 395-400.
- Husby (2010). Introduction of the workshop. 3rd European biobed workshop. Piacenza, Italy
- Karanasios, E., N. G. Tsiropoulos, et al. (2012). "On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives." *Biodegradation* 23(6): 787-802.
- Karanasios, E., N. G. Tsiropoulos, et al. (2010). "Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems." *Chemosphere* 80(8): 914-921.
- Kreuger, J. (1999). *Pesticides in the environment - atmospheric deposition and transport to surface waters*. Doctoral thesis.
- Kwon, G.-S., H.-Y. Sohn, et al. (2005). "Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(6): 845-850.
- Marinozzi, M., L. Coppola, et al. (2013). "The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community." *Environmental Science and Pollution Research* 20(4): 2546-2555.
- MGAP (2014). *Guía de buenas prácticas agrícolas para la producción de frutas y hortalizas frescas en Uruguay*. Resolución del MGAP N° 1050.
- Mukherjee, I. and A. Mittal (2005). "Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 75(5): 1034-1040.
- Rivero, A., S. Niell, et al. (2016). "Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale." *Talanta* 153: 17-22.
- Rivero, A., S. Niell, et al. (2012). "Analytical methodology for the study of endosulfan bioremediation under controlled conditions with white rot fungi." *Journal of Chromatography B* 907: 168-172.
- Helweg, et al. (2006). "Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed." *Chemosphere* 65(11): 2223-2232.
- Torstensson, L. and M. d. P. Castillo (1997). *Pestic. Outlook* 8: 27.
- Torstensson Lennart, M. P. d. C. (1997). "Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment." *Pesticide Outlook* 8: 24-27.

Urrutia, C., O. Rubilar, et al. (2013). "Degradation of pesticide mixture on modified matrix of a biopurification system with alternatives lignocellulosic wastes." *Chemosphere* 92(10): 1361-1366.

Verhagen, P., L. De Gelder, et al. (2013). "Inoculation with a mixed degrading culture improves the pesticide removal of an on-farm biopurification system." *Current microbiology* 67(4): 466-471.

Vischetti, C., E. Capri, et al. (2004). "Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination"

Herrera López, S., Scholten, J., Kiedrowska, B., & de Kok, A. (2019). Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1594, 93-104. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.024

M. Anastassiades; D. I. Kolberg; E. Eichhorn; A. Benkenstein; S. Luka?evi?; D. Mack; C. Wildgrube; I. Sigalov; D. Dörk; A. Barth. Marzo 2015. Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method

Chali Abate Jote. A Review of 2,4-D Environmental Fate, Persistence and Toxicity Effects on Living Organisms. *Organic & Medicinal Chem IJ*. 2019; 9(1): 555755. DOI: 10.19080/OMCIJ.2019.09.555755

Walters, Johanna. Environmental fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Monitoring and Pest Management*. Department of Pesticide Regulation. Sacramento, CA 95814-3510.

Cuevas Díaz, M. D., Ferrera Cerrato, R., Roldán Martín, A., & Rodríguez Vázquez, R. (2008). Ensayo de Toxicidad aguda con la lombriz de tierra Eisenia andrei. En P. Ramírez Romero, & A. Mendoza Cantú, *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (pág. 414). Ciudad de México: Instituto Nacional de Ecología.

Infante, C., & Morales García, F. (2012). Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de Lactuca sativa. *INTERCIENCIA*, 782 a 788.

OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development, 1984. *Guideline for the Testing of Chemicals No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests*. OECD, Paris, France.

Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga Lactuca sativa L. En P. R. Cantú, *Libro de Ensayos Toxicológicos para la evaluación de Sustancias Químicas en Agua y Suelo* (pág. 55 a 67). México: IEPSA.

Zemolin C, Avila L, Cassol G, Massey J, Camargo E. Environmental fate of S-Metolachlor – A Review. *Planta daninha* 2014;32(3):655-64.GEHRKE, V.R., CAMARGO, E.R. and AVILA, L.A.

Sulfentrazone: Environmental Dynamics and Selectivity. *Planta Daninha* [online]. 2020, v. 38 [Accessed 27 May 2021] , e020215663. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582020380100032>. Epub 17 Apr 2020. ISSN 0100-8358. https://doi.org/10.1590/S0100-83582020380100032.

Referencias consultadas on-line:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dicamba#section=Environmental-Fate-Exposure-Summary>

<http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/dicamba.pdf>

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-118203_01-Aug-09.pdf

Gerhke, et al., (2020). 10.1016/j.ecolind.2018.12.034

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report08/Chlorantraniliprole.pdf

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation10/Thiamethoxam.pdf

<https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/136041.pdf>

<https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/gama-de-galerias-apir-id>

Widada, J., Nojiri, H., & Omori, T. (2002). Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1), 45-59.

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/1027.htm>

Licenciamiento

Reconocimiento-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-ND)