



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



INFORME FINAL

(Período Junio 2018- Diciembre 2019)

Este informe fue generado en el marco del Acuerdo entre la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) y la Fundación para el Progreso de la Química (FUNDAQUIM), asociado al proyecto *Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas incluyendo COPs GCP/URU/031/GFF* y su aporte a la instalación y evaluación de una cama biológica para la bio-remediación del paquete de plaguicidas empleado en la producción hortifrutícola.

Técnicos que aportaron al desarrollo de este documento:

María Verónica Cesio¹

Horacio Heinzen¹

Cecilia Rodríguez¹

Sofía Rezende

Técnicos que colaboraron en el desarrollo del proyecto

Natalia Besil.²

Ricardo Hladki²

Lucas Archondo²

Sofía Rezende²

Cecilia Rodríguez¹

Natalia Gérez¹

Nora Ehrlich³

Luján Banchemero³

Nelson Rodríguez⁴

Margarita Pastori⁵

¹ Facultad de Química/GACT

² CENUR Litoral Norte /DQL/GACT

³ Dirección General de la Granja, (DIGEGRA), MGAP

⁴ Junta Nacional de la Granja, (JUNAGRA), MGAP

⁵ Sociedad de Fomento de Valdense, SOFOVAL

OBJETIVO DE LA CONSULTORÍA

A través del presente acuerdo, se busca contribuir a generar información que permita implementar el uso de los lechos biológicos a nivel de campo, asegurando un correcto desenvolvimiento de los procesos que permiten reducir los riesgos de contaminación ambiental. Los productos y los resultados planteados en el proyecto son definidos como sigue:

Producto 1 - *Ensayo de degradación a escala de laboratorio.*

Determinación, a nivel de laboratorio, del porcentaje de degradación de los pesticidas usados en la producción hortofrutícola, aplicados en una cama biológica siguiendo un modelo sueco.

Producto 2 - *Instalación a campo de una cama biológica.*

Realización de una experiencia de instalación a campo de una cama biológica, en un predio comercial con producción de tomate en invernáculo.

Producto 3 - *Evaluación de la capacidad de degradación de la cama biológica.*

Evaluación de la capacidad de degradación de plaguicidas de la cama biológica instalada, en condiciones de campo en un predio comercial: seguimiento de la cama instalada a través del análisis de muestras de la biomezcla, tomadas periódicamente, para comprobar la degradación transcurrida un periodo luego de la aplicación de los plaguicidas.

Producto 4 - *Informe Final.*

A partir de la información generada en los productos anteriores se redactará un informe final consolidando todo el estudio, complementado por un resumen ejecutivo de máximo tres (3) páginas.

ENSAYO DE DEGRADACIÓN A ESCALA LABORATORIO

Al comienzo del presente proyecto se realizó una serie de reuniones entre los equipos de trabajo de Facultad de Química, de FAO/DINAMA y DIGEGRA, para poder definir los diferentes puntos planteados como objetivos específicos importantes de la propuesta, antes de comenzar el trabajo experimental que fue desarrollado en los laboratorios de Paysandú y Montevideo.

1. Lista de los plaguicidas

Se confeccionó una lista de plaguicidas para el estudio en base a información administrada por los técnicos de DIGEGRA y a la selección que ellos realizaron de los posibles productores donde trabajar con los ensayos piloto. Por lo tanto en enero, luego de firmada la carta de acuerdo, se comenzó a trabajar en el ajuste de la metodología con los plaguicidas definidos; se evaluó y ajustó una metodología ya utilizada por el grupo de trabajo, pero no con este mismo grupo de compuestos. Se determinaron todas las cifras de mérito según la Guía Internacional para el Análisis de Residuos de Plaguicidas en alimentos y piensos de la Unión Europea (SANTE) ⁽¹⁾ para los compuestos seleccionados, validándose así el método.

Posteriormente, luego de seleccionar el productor donde se instalaría la cama biológica, se realizó una visita-entrevista al productor Fernando de Amores y se pudo concluir que en su predio se aplicaban otros productos que no habían sido contemplados en primera

instancia. Por lo tanto se realizó nuevamente toda la evaluación de la metodología con los 36 compuestos definidos, incluidos los nuevos, y se determinaron nuevamente todas las cifras de mérito para la validación. A continuación se muestra la lista final de compuestos seleccionados que fueron evaluados y validados analíticamente para poder luego controlar la eficiencia de la cama biológica (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos seleccionados para desarrollar la metodología analítica.

#	<i>Compuestos seleccionados</i>
1	<i>Abamectina</i>
2	<i>Acetamiprid</i>
3	<i>Alaclor</i>
4	<i>Azoxystrobin</i>
5	<i>Benomilo</i>
6	<i>Boscalid</i>
7	<i>Bromacil</i>
8	<i>Carbendazim</i>
9	<i>Clorantraniliprole</i>
10	<i>Clorotalonil</i>
11	<i>Clorprifos</i>
12	<i>Ciprodinil</i>
13	<i>Cyhalothrin</i>
14	<i>Cypermethrin</i>
15	<i>Difenoconazol</i>
16	<i>Epoxiconazol</i>
17	<i>Etion</i>
18	<i>Fludioxonil</i>
20	<i>Imidacloprid</i>
21	<i>Metalaxyl</i>
22	<i>Metolaclor</i>
23	<i>Metoxyfenocide</i>
24	<i>Metribuzin</i>
25	<i>Permethrin</i>
27	<i>Propaquizafop</i>
28	<i>Propiconazole</i>
29	<i>Pyraclostrobin</i>
31	<i>Pyriproxyfen</i>
32	<i>Spinosad</i>
33	<i>Spirotetramat</i>

34	<i>Tebuconazole</i>
35	<i>Tiamethoxam</i>
36	<i>Tiocyclam</i>

2. Metodología analítica

Se realizó una ampliación del protocolo desarrollado durante la tesis de doctorado de la Dra. Anisleidy Rivero Machado.⁽²⁾⁽³⁾

Este método de preparación de la muestra es una modificación del trabajo anteriormente publicado por el grupo⁽⁴⁾ para la determinación de la disipación de clorpirifós y su principal metabolito (TCP).

El método está basado en una extracción de la biomezcla con acetato de etilo y una limpieza dispersiva con sales específicamente evaluadas, de acuerdo con los posibles componentes de la mezcla que pudieran extraerse con nuestros compuestos de interés, empleando cromatografía de alta resolución, tanto líquida como gaseosa acoplada a masas en tándem, para una correcta e inequívoca identificación y cuantificación de los plaguicidas del estudio.

Para todas las evaluaciones de los métodos y las validaciones posteriores se siguieron los lineamientos de la Guía SANTE, 2017.

Es de hacer notar que, si bien se realiza una única preparación de muestra, el análisis instrumental para la determinación de las concentraciones de los principios activos se realiza empleando dos sistemas analíticos. De acuerdo con sus características fisicoquímicas, un grupo se analiza por Cromatografía Gaseosa acoplada a masas (GC-MS/MS) y el otro por cromatografía líquida (LC-MS/MS). En el **ANEXO I** se presentan las condiciones analíticas optimizadas para cada uno de estos sistemas, con los analitos estudiados.

Se realizaron recuperaciones a dos niveles distintos de concentración por quintuplicado para evaluar las cifras de méritos exigidas por la Guía SANTE: precisión, exactitud, efecto matriz, límite de cuantificación y linealidad del método. La precisión y la linealidad se evaluaron a través del cálculo de residuales por inspección visual, coeficiente de correlación, r^2 y BCC (Back Calculated Concentration, por sus siglas en inglés).

Se chequeó la linealidad en el rango 10-120 $\mu\text{g/L}$ para las determinaciones por cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (LC-MS/MS) y 30-300 $\mu\text{g/kg}$ para cromatografía gaseosa acoplada a masas en tándem (GC-MS/MS).

Se testeó la robustez del método, realizando ensayos espejo de toda la metodología de preparación de muestra, determinando los porcentajes de recuperación a los niveles definidos, las desviaciones relativas, estándares, linealidad, y efecto matriz, cumpliendo con los límites establecidos por la Guía SANTE.

Se llevaron, como de rutina, cartas de control para el QA/QC de la performance de los instrumentos y del método, durante el periodo de desarrollo del proyecto.

En el **ANEXO I** se detallan las condiciones instrumentales ajustadas y la optimización de los parámetros para la identificación inequívoca de los compuestos y su cuantificación, y el protocolo de preparación de muestra.

La matriz del estudio es la matriz biológicamente activa, que es la misma para los diferentes diseños de cama biológica, por lo general llamada **biomezcla**; se compone de afrechillo (o paja), turba y suelo del lugar y se integran los componentes en una

proporción volumétrica de 2: 1: 1 (respectivamente), de la forma más homogénea posible.

Cada componente en el sistema tiene una función específica. El afrechillo estimula el crecimiento de microorganismos ligninolíticos tales como hongos de podredumbre blanca y por lo tanto la producción de enzimas extracelulares del sistema ligninolítico, tales como peroxidasas y fenoxidasas.⁽⁵⁾ La turba contribuye a aumentar capacidad de sorción y regula la humedad del sistema; la tierra proporciona capacidad de sorción en la cama biológica y los microorganismos que degradan pesticidas, incluyendo actinobacterias que pueden actuar sinérgicamente con los hongos.⁽⁶⁾ Una capa de pasto que cubre la superficie de la biomezcla aumenta la eficiencia, conservando los pesticidas a ser degradados en la parte superior de la cama biológica y controlando la lixiviación; ayuda a mantener el sistema húmedo, favorece la evapotranspiración y la degradación de los pesticidas a nivel de las raíces. Una capa de grava en el fondo actúa como un filtro para evitar que los orgánicos pasen fuera de la biomezcla. La impermeabilización del sistema consiste en el revestimiento de las paredes y el fondo de la cama, para impedir el contacto de los pesticidas con el suelo adyacente.

3. Validación

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Asegura que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado y sus resultados son precisos y confiables. En el **ANEXO II** se detallan los resultados de la validación con las correspondientes cifras de mérito de aquellos compuestos que cumplieron con las exigencias analíticas de veracidad y precisión en las condiciones de laboratorio, y a las concentraciones estudiadas. Estas validaciones se realizan siguiendo guías analíticas internacionales; en el presente trabajo se utilizó la Guía SANTE de la Unión Europea.

4. Construcción de las camas a escala de laboratorio

Para la construcción de las camas biológicas se realizó la biomezcla (sustrato que realizará la biorremediación) que consta de tres componentes: turba, tierra y afrechillo de arroz o trigo en proporción (1:1:2), que fueron homogéneamente mezcladas con una mezcladora rotatoria clásica. Se armaron los dispositivos piloto en contenedores de plástico idénticos con un 1 kg de biomezcla cada uno, 5 repeticiones y sus blancos correspondientes para poder realizar posteriormente la evaluación estadística de los resultados. La tierra utilizada fue sacada del predio del productor Fernando de Amores, por ser un suelo que ha sido impactado por el uso de los plaguicidas que éste utiliza habitualmente, donde la biota que vive en él está adaptada a estos principios activos. Se trabajó con los formulados comerciales de los compuestos definidos para el estudio, se aplicaron todos los principios activos simultáneamente, al nivel de concentración recomendado por la etiqueta comercial, asumiendo que si se siguen las Buenas Prácticas Agrícolas, estas serán las concentraciones utilizadas. Las razones para aplicarlos simultáneamente son dos: por un lado se quiere reproducir la situación real de campo, con la cama biológica funcionando a pleno y por otro, razones de cronograma de ejecución nos impedían el estudio de la disipación individual de cada uno de ellos o agregándolos según el calendario de producción. Los principios activos evaluados a escala piloto fueron aquellos que el productor disponía y los que se pudieron adquirir en plaza, que se detallan en Tabla 2.

Tabla 2. Lista de compuestos evaluados a escala de laboratorio.

Pesticida	Conc preparado comercial (mg/L)	Conc mezcla (mg/L)	Conc mg/kg en cada cama
Piriproxifen	150	75	7
Espirotetramat	405	201	20
Azoxistrobin	200	99	10
Clorotalonil	499	248	25
Difenoconazol	344	171	17
Metribuzin	648	322	32
Propaquizafop	472	235	23
Espinosad	817	406	41
Glifosato	727	361	36
Clorpirifos	874	434	43
Cipermetrina	200	99	10
Metolaclor	830	413	41

Sin embargo, a pesar de ser un número menor de principios activos estudiados en la cama biológica a escala de laboratorio, se mantuvo el alcance analítico original, en todo el periodo de evaluación a campo, para poder cubrir posibles aplicaciones de plaguicidas cuya degradación no fue evaluada, por lo antes expuesto, en el laboratorio.

Tabla 3. Calendario de muestreo y foto del ensayo a escala piloto realizado en las instalaciones de la Estación Experimental Mario Cassinoni, Paysandú (izquierda).



Muestreo sin inóculo		Muestreo con inóculo	
Fecha	Día	Fecha	Día
21 Abril	0	9 Agosto	0
27 Abril	6	16 Agosto	7
4 Mayo	13	23 Agosto	14
11 Mayo	20	30 Agosto	21
18 Mayo	27	6 Setiembre	28
25 Mayo	34	13 Setiembre	35
8 Junio	48	27 Setiembre	49
22 Junio	62	11 Octubre	63
-	-	25 Octubre	77

De acuerdo con la literatura, a veces no es posible que la flora nativa del suelo sea autosuficiente para degradar los pesticidas aplicados. En estos casos, es necesario el agregado de otros microorganismos capaces de degradar xenobióticos, generalmente basidiomicetes. Por esta razón, para completar el diseño conceptual de la cama biológica, en paralelo se evaluaron camas biológicas con adición de *Abortiporus biennis* como inóculo para la mejor degradación de los compuestos del estudio. Este microorganismo fue estudiado por el grupo de trabajo, que ya había realizado una investigación del poder de degradación de la colección de basidiomicetes nativos pertenecientes a la Cátedra de Microbiología y se demostró su capacidad para degradar xenobióticos, como agente bioconversor externo. Por lo tanto, se realizó un ensayo igual pero con agregado de inóculo a la biomezcla de manera de bioaumentar la mezcla y evaluar si esta bioaumentación es más efectiva que trabajando solo con la biomezcla y la microbiota nativa presente en ella.

5. Seguimiento de la cinética de degradación en condiciones de laboratorio

Se instalaron dos ensayos a escala de laboratorio, con y sin bioaumentación. En este marco, se realizaron los muestreos como establecidos. Se realizaron las cuantificaciones con las técnicas validadas y con los resultados en ambas condiciones se construyeron las curvas.

El muestreo se realizó de acuerdo con el plan previamente diseñado, y las muestras se congelaron para luego ser liofilizadas para su posterior análisis. Todas las muestras fueron analizadas y con los resultados obtenidos en cada fecha de muestreo, como se muestra en la Tabla 3, se construyeron las curvas de degradación de los analitos del estudio. La comparación de la capacidad de degradación de la flora microbiológica nativa sin y con inóculo a escala de laboratorio, realizada para los compuestos disponibles se presenta en el **ANEXO III**.

Los resultados de las curvas en el ensayo de laboratorio fueron prometedores: todos los analitos evaluados degradaban alrededor del 80 % del compuesto a cabo de 74 días. En lo que respecta a la degradación con el sistema con agregado de inóculo las diferencias no fueron significativas ni en tiempo ni en porcentaje de degradación por lo que considerando que las camas biológicas deben ser sencillas, de fácil armado y manipulación para el productor, se decidió realizar los ensayos a campo sin el agregado de inóculo a la biomezcla.

Al comparar para un mismo compuesto, el tiempo que tarda en llegar a una misma concentración, para inóculo y sin inóculo las diferencias están dentro del error experimental. Clorpirifós tarda 76 días en llegar a una concentración de 2,58 mg/kg, mientras que con inóculo se logra una concentración de 2,95 mg/kg en el mismo tiempo. Lo mismo ocurrió para los demás compuestos estudiados. Las diferencias en las concentraciones finales fueron mínimas, incluso mejores en las camas biológicas sin inocular. Por esta razón, se decidió trabajar sin inóculo porque es mucho más práctico para las realidades de pequeños productores no incluir un nuevo insumo a la cama biológica.

Como no hubo una diferencia significativa entre las mismas para los plaguicidas evaluados, se decidió, para la realización del experimento a escala de campo con el productor, trabajar sin bioaumentación por inoculación con un agente externo, por considerarlo más fácilmente adaptable a las condiciones de los pequeños productores.

Estos resultados alentaron a seguir con el trabajo a escala de campo.

6. Evaluación de posibles materiales sustitutos en la biomezcla

Se intentó lograr un nuevo diseño de cama biológica que fuera construida con una biomezcla adaptada a las realidades del país (materiales locales para formar el substrato y flora microbiológica nativa).

Variaciones en los componentes de la biomezcla degradadora fueron ensayadas, buscando sustituir la turba, que es el componente de mayor costo y de más complicada obtención en nuestro país, y/o el afrechillo. Una mezcla que los productores usan frecuentemente conocida como “cama de pollo” y desechos de la industria vitícola como escobajo y orujo, son ejemplo de variaciones que fueron probadas a escala piloto. La cama de pollo, si bien aparece como un insumo barato para el productor, debe considerarse que es uno de los abonos más utilizados, por lo que nuestra atención se derivó a otros materiales, como los desechos de la industria vitivinícola.

Los resultados no fueron buenos en este ensayo puntual, debido a que no se observó el crecimiento necesario de la microbiota como para que esa mezcla se constituyera en una posible mezcla biodegradadora. Sin embargo, debe realizarse más trabajo para descartarla definitivamente, ya que es posible disponer de material con distinto nivel de “envejecimiento” que parece ser una mejor alternativa.

7. Evaluación eco-toxicológica

Se consideró necesario poseer además una herramienta para evaluar la toxicidad de las camas biológicas luego de que los compuestos ya no se pudieran detectar analíticamente debido a que su concentración estaba por debajo del límite de cuantificación del método. Para ello, se ajustó y validó la metodología para la evaluación del grado de toxicidad utilizando un ensayo OECD: test de letalidad y ganancia de peso con *Eisenia fétida*⁽⁷⁾, ensayo que estaba establecido en el laboratorio de eco-toxicología del Polo “Abordaje holístico al impacto del uso de plaguicidas” para otras matrices. Se detalla el protocolo de trabajo OECD en el ANEXO IV. Este ensayo se realizó para las camas piloto y luego para las camas instaladas a campo.

Tabla 4. Masas y cantidad de individuos de *E. fétida* para tratamientos de camas biológicas con y sin inóculo (ensayo de laboratorio).

Ensayo sin inóculo	Peso inicial	Unidades <i>Eisenia fétida</i>	Peso Final	Unidades <i>Eisenia fétida</i>
Blanco S/I	2,010	10	3,758	10
FAO S/I 1	2,925	10	0	-----
FAO S/I 2	2,537	10	2,076	9
FAO S/I 3	2,784	10	2,626	9
Ensayo con inóculo	Peso inicial	Unidades EF	Peso Final	Unidades EF
Blanco C/I	2,092	10	3,706	10

FAO C/I 1	2,211	10	3,760	10
FAO C/I 2	2,188	10	3,706	10
FAO C/I 3	2,096	10	3,315	10

En el tratamiento sin inóculo se observó la muerte de algunos organismos de prueba, siendo en una de las réplicas la pérdida total de los organismos.

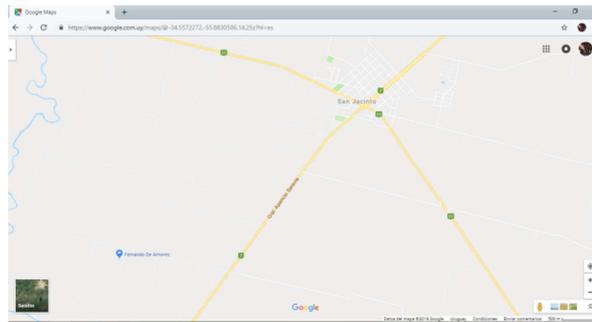
Para los otros tratamientos con inóculo y los blancos de ambos tratamientos no se registraron muertes de los organismos y siempre se registró una ganancia de peso. Esto permitiría inferir que ya no había actividad tóxica para *E. fétida* luego del tiempo transcurrido en los Lechos con inóculo. Esto indicaría que la presencia del hongo produciría una degradación de los compuestos, en el mismo tiempo, hacia metabolitos más inocuos. De todas maneras como la mezcla sin inóculo tiene igualmente una rápida y buena respuesta se recomendó a los productores el armado de los Lechos biológicos sin agregado de hongo ya que este paso involucra una tecnología no disponible fácilmente en los predios.

CONSTRUCCIÓN DE LAS CAMAS A CAMPO.

CAMA BIOLÓGICA INSTALADA EN PREDIO DE PRODUCTOR HORTÍCOLA (SAN JACINTO).

Se realizó la primera experiencia en el país de instalación a campo de una cama biológica, en un predio comercial con producción de tomate en invernáculo, en San Jacinto departamento de Canelones.

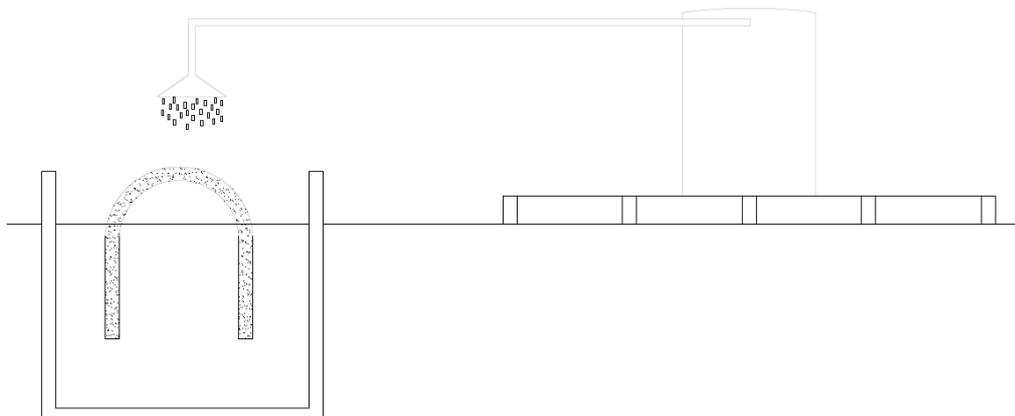
Figura 1. Georreferenciación de la finca del productor seleccionado por DIGEGRA.



Diseño del lecho biológico, adaptado a las condiciones específicas de aplicaciones con mochilas, principalmente en invernadero.

Luego de acordado el productor con quien trabajar se discutió con él de acuerdo a sus posibilidades las diferentes geometrías que podría tener la cama a instalar. Y se llegó a un esquema similar a algunos reportados, el productor seleccionó el lugar dentro del predio que según su logística de trabajo era el que mejor le parecía, se le dieron algunos de los insumos necesarios para la construcción, se compraron los tanques y él se encargó de realizar el techo de protección así como la colocación de los dos tanques que constituían la cama.

Figura 2. Plano elaborado para la construcción de la cama biológica en el predio de la familia De Amores.



Luego, el proceso de instalación, preparación de la biomezcla, llenado de la cama biológica y prueba fue realizado por todo el grupo. Para el armado de la cama biológica se empleó **Afrechillo de arroz o trigo, tierra del lugar, turba**, un balde, mezcladora u hormigonera, nylon grande, pala, césped, malezas o gramilla para plantar luego en la capa superior del reactor.

Procedimiento:

Previo a la preparación de la mezcla se debe tener preparado el lugar donde se colocará la misma.

Lugar: Si la cama biológica se instala en el suelo se debe realizar un pozo de aproximadamente de 100 cm de profundidad, el mismo debe quedar completamente aislado, se pueden utilizar materiales como nylon, geomembrana o cemento impermeabilizado por ejemplo con pintura epoxi para lograr el **aislamiento**. La profundidad máxima de llenado de la cama con biomezcla recomendada es de 60 cm pero debe considerarse el espacio para el drenaje, un pequeño margen de seguridad y considerar un espacio para el crecimiento del pasto, componente fundamental para asegurar un buen intercambio tanto gaseoso como hídrico.

Preparación de la biomezcla:

Medir todos los componentes: afrechillo, tierra y turba; para ello utilizar como instrumento de medida un balde.

Medir dos baldes llenos de afrechillo de trigo o arroz, un balde de la tierra del lugar y un balde de turba, adicionarlos en la mezcladora para la correcta homogenización de la mezcla. En caso de no tener mezcladora adicionar todos los componentes en un nylon grueso y mezclarlos manualmente hasta su perfecta homogenización. Adicionar la biomezcla encima del filtro no más de 60 cm de profundidad, dejando un espacio libre (1/5 del tanque que, por ejemplo, serian para un tanque de 1000 litros 20 cm). Sembrar pasto en la superficie para generar flujo de agua en el sistema a través de la absorción de las raíces de la planta.

La cama biológica debe tener un techo para protegerla de la lluvia.

Además aquellas que manejan volúmenes grandes por aplicación, más de 500 L, deben contener un tanque para recolectar los lixiviados, este tanque puede estar enterrado y debe estar conectado cercano al fondo de la cama construida para facilitar el traspaso del efluente.

Nota: Hay que tener en cuenta que las dimensiones de la cama biológica dependerán del equipo que se emplea para la adición de los plaguicidas en el campo y del volumen de agua a tratar.

Filtro:

Se debe colocar un filtro en la parte inferior de la cama biológica. Este se puede confeccionar con una capa de grava y otra capa de arena encima, antes de agregar la biomezcla.

Puesta en funcionamiento:

Una vez que la cama biológica está instalada, hay que verificar que el sistema no tenga fugas que provoquen pérdidas de los pesticidas sin degradar.

Humectar la cama biológica con el agua de riego utilizada habitualmente para favorecer el crecimiento microbiano, este proceso se debe realizar al menos 7 días antes de su puesta en funcionamiento.

La adición del agua con plaguicidas debe realizarse con mucho cuidado de manera de producir la menor cantidad de lixiviado durante el proceso. Es importante que no se adicione el agua de golpe si no que se produzca una adición paulatina, preferentemente con aspersores que permiten una mejor distribución del agua en todo el sistema.

Se pueden ir adicionando efluentes con pesticidas a medida que el sistema permita la adición de agua buscando generar el mínimo lixiviado, después de cada aplicación se debe dejar que los microorganismos produzcan la degradación de los pesticidas. Esto depende del compuesto y de los microorganismos presentes en el suelo y su capacidad de degradación de estos compuestos.

En verano la degradación generalmente se da más rápido que en invierno cuando los microorganismos tienen una menor velocidad de crecimiento debido a las temperaturas.

Control:

Se debe realizar el control de la cama biológica en funcionamiento al menos 2 veces por año para verificar su poder de degradación de los compuestos que utiliza cada productor y así evitar una acumulación mayor de las concentraciones de compuestos sin degradar.

Se debe llevar un registro de las adiciones realizadas a la cama biológica, así como las diluciones preparadas y los principios activos utilizados.

En caso de generarse efluentes se deben recircular nuevamente en la cama para asegurar la correcta biotransformación; si se sospecha que el efluente no contiene plaguicidas, este puede ser descartado, si previamente se realizó un análisis de residuos o un ensayo eco-toxicológico que lo avale.

Todas las indicaciones para el armado de una cama fueron plasmadas en una cartilla de promoción, elaborada en conjunto con Técnicos de FAO/DINAMA y se adjunta en el **ANEXO V** como un insumo más del proyecto.

REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA CONSTRUCCIÓN DE LA CAMA BIOLÓGICA (SAN JACINTO).

Fecha de construcción del lecho biológico: 03 de setiembre de 2018.
Productor: Fernando de Amores (mochila)

Figura 3. Fotografías del día de la construcción del lecho biológico en San Jacinto.



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE LA CAMA BIOLÓGICA EN PREDIO HORTÍCOLA (SAN JACINTO).

Se realizó un muestreo por mes durante un año como se muestra en la Tabla 5 y se analizaron todas las muestras para construir las curvas de degradación. Para el muestreo se utilizó un muestreador de suelo tipo holandés (calador) tomando de 6 puntos distintos en la cama para construir una muestra compuesta. En paralelo el productor llevaba un cuaderno de sus aplicaciones, fechas de lavado y volúmenes volcados en la cama biológica. A continuación se presentan los resultados de las curvas de degradación de los principios activos evaluados en San Jacinto (Familia De Amores) durante el año del proyecto (Figura 4)

Tabla 5. Calendario de muestreo de la cama biológica instalada en San Jacinto, en predio hortícola.

Fecha	
11/9/18	Muestreo
23/11/18	Muestreo
12/12/18	Muestreo
25/1/19	Muestreo
25/2/19	Muestreo
17/6/19	Muestreo
10/7/19	Muestreo
18/9/19	Muestreo

Las curvas obtenidas luego de analizados todo los muestreos realizados en ambos Lechos instalados se presentan en el **ANEXO VI**.

Las curvas de disipación no siguen el patrón observado en el laboratorio. Esto se debe fundamentalmente a que el productor aplica sobre la cama en más de una oportunidad durante el periodo de cultivo. Esa es la causa por la que se observan los abruptos ascensos en la concentración de los principios activos. Sin embargo, en todos los casos, luego de un incremento al ser adicionado el producto a la cama, continúa su degradación. Analizando una a una las degradaciones, podemos ver que los máximos de concentración se corresponden con re-aplicaciones por el esquema de trabajo del productor o por alguna decisión de urgencia que se debió tomar debido a plagas imponderables que se presentan. Esto muestra también como la cama biológica es un control adicional independiente del seguimiento del plan de trabajo del productor, ya que permite corroborar los registros que este lleva; pero se puede observar también que esos máximos, producto de la acumulación responden positivamente y al cabo de 10 meses todas las compuestas presentan una degradación de más de 80 %. Dado que durante el período de invierno las aplicaciones son mínimas o casi nulas, eso permite al consorcio microbiológico generado en la cama trabajar sin el stress adicional que genera el continuo agregado de productos y mostrar una eficiencia mayor.

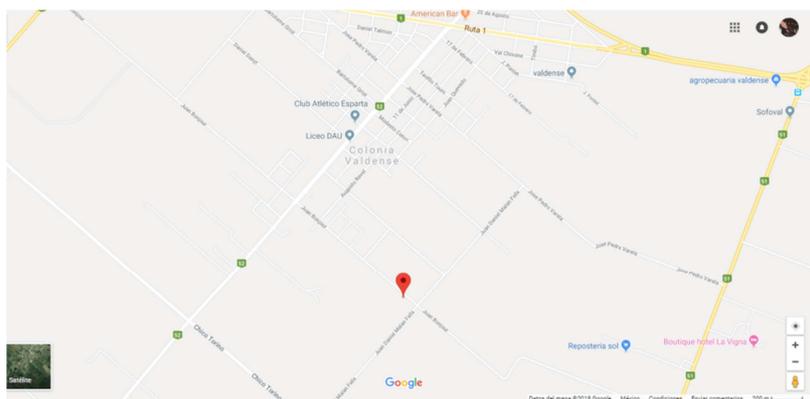
Como conclusión de esta experiencia particular podemos decir que este control preliminar de un año realizado ha mostrado la eficiencia de la cama biológica instalada en las condiciones del productor con el diseño seleccionado. Entre las consideraciones positivas del productor para el trabajo diario que ha tenido la instalación de la cama biológica se observa que no solamente se mejoraron problemas ocasionados por el manejo de plaguicidas a los que era necesario darle respuesta, remediando los sobrantes de aplicación y lavado sino que ordenó el trabajo del productor en torno a estos procedimientos y lo llevó a disminuir sus volúmenes de aguas de lavado economizando un recurso siempre valioso. En resumen, la cama biológica globalmente es una buena herramienta para evitar contaminaciones puntuales en cultivos de invernáculo y remediar aquellas fracciones de producto que habitualmente se derramaban incontroladas al ambiente.

CAMA BIOLÓGICA INSTALADA EN PREDIO DE PRODUCTOR FRUTÍCOLA (COLONIA VALDENSE)

Como consecuencia de la experiencia que se estaba llevando adelante y del interés de otros productores también dedicados a la producción frutícola, se planteó el diseño y la instalación de una nueva cama biológica. Es de destacar en este caso la colaboración inter-institucional que hizo posible la concreción de esta iniciativa, ya que la construcción de la cama biológica se financió con aportes de SOFOVAL y del programa Más Tecnologías (MGAP-DGDR, INIA), mientras que las economías generadas en el proyecto original, permitieron costear los análisis para la evaluación del comportamiento de la cama en esta nueva escala y modalidad productiva, a pesar de no estar incluida esta experiencia en el proyecto original.

Se instaló así una cama biológica en Colonia Valdense, Departamento de Colonia, a 120 km de Montevideo, en el predio de la familia Malán. Se discutió con ellos el diseño, y luego la cama fue construida por personal calificado.

Figura 5. Georreferenciación de la finca del productor seleccionado por DIGEGRA. Fecha de la visita: 07 de setiembre de 2018.



Se elaboró la biomezcla, se llenó la cama y se acompañó la evolución realizando el control analítico y eco-toxicológico del comportamiento de la misma. En este caso, la cama instalada recibió el paquete de plaguicidas usados en cultivos de Duraznos y Ciruelas, cultivos predominantes en la región. Es de destacar que no hubo que realizar ningún ajuste extra a la metodología analítica, ya que todos los principios activos

aplicados en esta cama biológica, estaban incluidos en el alcance del método ya ajustado y validado.

Figura 6. Plano elaborado para la construcción de la cama biológica en el predio de la familia Malán.

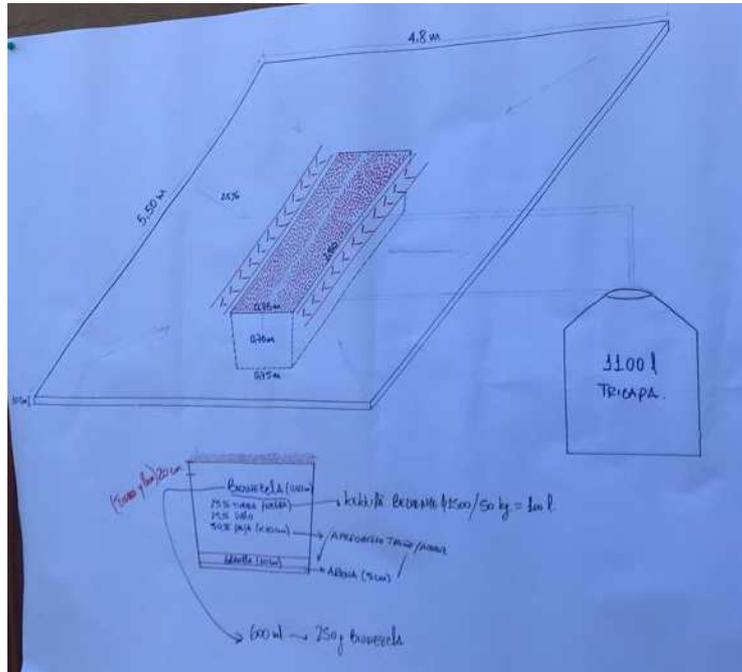


Figura 7. Registro fotográfico de la instalación de la cama biológica de Colonia Valdense



Es de destacar que son diferentes los sistemas de aplicación y los diseños de las camas biológicas. Los resultados que se obtengan son un excelente complemento a los productos obtenidos en la propuesta del productor hortícola en invernadero.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE LA CAMA BIOLÓGICA INSTALADA EN PREDIO FRUTÍCOLA (COLONIA VALDENSE).

En este producto al igual que el anterior se registró el calendario de aplicaciones de productos fitosanitarios en el predio y de muestreo.

Los momentos de muestreo se detallan en el calendario de aplicación en la Tabla 6 (muestreos mensuales). Para el muestreo se utilizó un muestreador de suelo tipo holandés (calador) tomando de 6 puntos distintos en la cama para construir una muestra compuesta.

Tabla 6. Cronograma de muestreo de la cama biológica instalada en C. Valdense, en predio frutícola.

Fecha	
26/11/2018	Muestreo
28/12/2018	Muestreo
4/2/2019	Muestreo
11/3/2019	Muestreo
18/4/2019	Muestreo
15/5/2019	Muestreo
13/11/19	Muestreo
8/7/2019	Muestreo
26/7/2019	Muestreo
6/9/2019	Muestreo

En el **ANEXO VI** también se presentan los resultados de los análisis realizados, para los muestreos en la producción de duraznos y ciruelas y para los compuestos utilizados y vertidos en la cama biológica instalada en Colonia Valdense en el predio de la familia Malán.

Al igual que lo observado en la producción en invernadero, las cinéticas de degradación de los principios activos utilizados en el cultivo de durazno y ciruela, fueron buenas, llegando en el período de control a menos de un 80 % de los compuestos aplicados en la cama biológica.

Estas curvas presentan máximos en períodos intermedios que se pueden deber a las mismas consideraciones que para el productor anterior pero además en el caso de este diseño, como los volúmenes de lixiviado eran mayores se instaló un tanque de recolección de los líquidos lixiviados y una bomba de recirculación para asegurarse que esas aguas están exentas de principios activos. Finalmente al cabo del año y luego del periodo invernal se pudo confirmar analíticamente que los principios activos utilizados se degradaban, confirmando la eficiencia de la cama biológica en las condiciones de instalación.

ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS REALIZADOS PARA LAS CAMAS INSTALADAS A CAMPO.

En los bioensayos realizados con *Eisenia fétida*, se determinó la sobrevivencia de los organismos de prueba y la ganancia de peso, expuestos a biomezclas provenientes de biobeds con tratamiento de pesticidas; se siguió el procedimiento recomendado por la OECD, 1984, a pesar de ser un bioensayo para suelo artificial, es tomado como guía por otros trabajos. La exposición a suelos-problemas corresponde a adaptaciones de este protocolo.

Este ensayo consiste en la exposición de 10 ejemplares de *E. fétida* con clitelo desarrollado y aproximadamente con un peso individual de 300 mg, registrando el peso total de 10 organismos para cada tratamiento, tal como se describe en el ANEXO IV. Luego de 14 días se registró la sobrevivencia de los organismos y se masaron nuevamente, registrando el peso total de los organismos y porcentaje de sobrevivencia.

Además de las observaciones en cambio de peso, o la muerte de las lombrices, que la mayoría de las veces se registran por la ausencia de las mismas, es importante registrar anomalías que se observen en los organismos, ya sea en lo físico o comportamental (OECD, 1984). Dentro de los distintos grados de daño en los organismos se considera la aparición de lesiones a nivel de ADN, celular, necrosis tisular, así como la escisión de un fragmento del organismo que se encuentre dañado. ^(8, 9, 10)

Figura 9. Organismos mostrando lesiones y secreción de mucosidad como respuesta al contacto con los biobeds, efecto de las altas conductividades medidas.



Efecto de conductividad en lombrices

La conductividad del sustrato de prueba, es un parámetro relevante en la sobrevivencia de los organismos de prueba (OECD, 1984). En este caso al observar una anomalía en el comportamiento, y presentar en algunos casos conductividades muy elevadas se suspendieron estos ensayos y si se decidió realizarlos en los lixiviados, a los que se le

aplicará el bioensayo de germinación de semillas de lechuga para evaluar su toxicidad⁽¹¹⁾ (Tablas 7 y 8).

Debido a estos resultados que se observaron cuando se realizó el estudio de las camas instaladas a campo y no en las de laboratorio es que se buscó un ensayo alternativo con semillas de *Latuca sativa* como se presenta en el ANEXO IV para evaluar la posible disposición de la biomezcla y su inocuidad al ambiente.

Tabla 7. Resultados de los ensayos ecotoxicológicos por la biomezcla de San Jacinto

San Jacinto	Réplica	N Inicial	N Final	% Supervivencia	Peso Inicial	Peso final	pH	Conducti vidad	% Germinación
Octubre	1	5	5	100	1.000	2.293			
Octubre	2	5	5	100	1.119	2.427			
Diciembre	1	10	0	0	3.107	0	8,6	810	51,67
Diciembre	2	10	0	0	2.949	0			
Enero	1	10	0	0	2.430	0			
Enero	2	10	0	0	2.636	0			
Junio	1	10	0	0	2.924	0	7,9	1970	15,00
Junio	2	10	0	0	3.147	0	7,5	fuera de rango	23,33
Agosto	1	10	0	0	3.141	0	5,8	fuera de rango	88,33
Agosto	2	10	0	0	2.896	0	7,4	1520	38,33

Tabla 8. Resultados de los ensayos ecotoxicológicos por la biomezcla de C. Valdense

Valdense	Réplica	Nº inicial	Nº final	% Supervivencia	Peso inicial	Peso final	pH	Conductividad	% Germinación
Diciembre	1	10	0	0	2.929	0	7,9	1030	31,67
Diciembre	2	10	0	0	3.515	0	7,8	900	40,00
Enero	1	10	8	80	2.867	2.485			
Enero	2	10	10	100	2.586	3.225			
Marzo	1	10	0	0	2.904	0	8,8	1330	26,67
Marzo	2	10	0	0	2.862	0	8,5	1420	25,00
Abril	1	10	10	100	2.875	3.091	7,3	580	43,33
Abril	2	10	10	100	2.896	3.374	7,3	580	
Junio	1	10	10	100	3.109	3.552	7,3	420	98,33
Junio	2	10	10	100	3.048	3.564	7,3	420	
Julio	1	10	10	100	3.860	3.562	7,2	1090	78,33
Julio	2	10	5	50	3.475	1.705	7,4	1260	90,00
Agosto	1	10	10	100	3.041	3.084	7,2	490	76,67
Agosto	2	10	10	100	2.854	3.320	7,2	490	
Setiembre	1	10	10	100	2.881	3.062	7,1	510	51,67
Setiembre	2	10	10	100	2.827	2.928	7,1	510	

ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN VINCULADAS AL PROYECTO

-Se realizaron 2 jornadas de divulgación en ambos predios con productores de la zona donde se presentaron los resultados obtenidos y se participó con todos los invitados a una muestra de los pasos realizados y la rutina de los productores al utilizar las camas biológicas.

-Se presentaron resultados en Congresos de regionales e internacionales (Congreso SETAC Argentina 2018 y Congreso de Argentina y Ambiente 2019 como comunicación oral).

-Se realizó una presentación conjunta entre los investigadores y los productores en el marco de las actividades generales de divulgación de resultados del proyecto general “Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas incluyendo COPs”.

-Se está preparando un trabajo científico para ser considerado para su publicación con las validaciones analíticas realizadas para el seguimiento de este proyecto.

CONCLUSIONES

- Se realizó la construcción de las dos camas biológicas de acuerdo con la producción y aplicación de cada productor, ambas tienen una geometría diferente.
- Para aquellos dispositivos de aplicación que recogen el agua en un tanque externo (mochila) y luego vierten hacia la cama el agua generada durante el lavado o preparación de las soluciones debe juntarse en un recipiente para luego ser adicionado a la cama biológica. Para ello se debe contar con un dispositivo de riego de manera de poder distribuir uniformemente el agua en toda la superficie.
- Para aquellos dispositivos donde el enjuague se realiza in situ sobre la cama biológica se debe tener definitivamente desagüe por posibles lixiviados y un control del volumen agregado. Así mismo se debe instalar una bomba para la recirculación de los lixiviados a la cama nuevamente.
- Se generó un equipo multidisciplinario integrado por Ingenieros Agrónomos, Químicos y Biólogos, que puede servir como referencia para la instalación de biobeds en nuestro país.
- Se comprobó que las camas biológicas son una herramienta útil y sencilla de mitigación para residuos de plaguicidas en dos sistemas y regiones distintas de producción hortofrutícola del país.
- La única forma de asegurar el correcto funcionamiento del lecho biológico es a través de métodos analíticos “fit for purpose”, para ello se cumplió con uno de los objetivos del proyecto: contar con una metodología analítica simple para evaluar la degradación de los pesticidas aplicados en estos sistemas productivos. Sin embargo, se deben ajustar mejor los ensayos ecotoxicológicos si estos quieren ser empleados por los productores como una herramienta de control a campo sencilla de la efectividad de la cama biológica.
- Se instalaron dos lechos biológicos en diferentes sistemas productivos: además del originalmente planteado en el predio de Fernando de Amores de cultivo en invernáculo, se sumó el de la familia Malán de árboles frutales y sobre el final

del proyecto se asesoró la instalación de un nuevo lecho biológico, en el marco INIA-FPTA 753 en predio vitícola.

- La instalación de ensayos a campo para diferentes sistemas de producción y su seguimiento durante un año ha reforzado la idea de que estos bio-reactores son una respuesta para evitar contaminaciones puntuales generadas por el manejo de plaguicidas en el país, pero que deben adecuarse a las diferentes realidades y paquetes tecnológicos empleados en cada caso.
- Se generaron insumos y recomendaciones para construir una cama biológica, las que fueron plasmadas en una guía y una cartilla para productores.
- Se realizaron charlas demostrativas con productores, donde las camas biológicas instaladas fueron presentadas a éstos, el material elaborado fue distribuido entre los participantes y se realizaron también presentaciones explicativas sobre los resultados obtenidos en la degradación de los compuestos utilizados y de la eficiencia de la cama biológica.
- Productos del proyecto fueron también varias comunicaciones científicas a congresos regionales e internacionales en forma de poster (SETAC2018, LAPRW2019) y conferencias, RALACA Meeting 2019 y Argentina y Ambiente 2019, lo que jerarquiza aun más el conocimiento generado.
- Se realizó una presentación oral, en conjunto con los productores de Valdense, en el marco del Taller sobre avances del “Proyecto Plaguicidas, FAO/DINAMA /GEFF”.
- La composición de la cama biológica diseñada en nuestro país permitió confirmar la degradación de compuestos que según la literatura especializada, no se degradaban en los lechos biológicos “modelo sueco” y sus variantes, como los fungicidas azólicos, uno de los grupos químicos más empleados en Uruguay.
- La experiencia positiva llevó a que una de las empresas viticultoras más grande del país decidiera comenzar con la instalación de camas biológicas en sus predios de producción.
- Del trabajo conjunto del Grupo de Análisis de Compuestos Trazas de la UDELAR /FQ/CENUR litoral, DIGEGRA y FAO/DINAMA se obtuvo un producto final global que servirá de puntapié inicial para que los productores puedan caminar hacia la instalación de este tipo de herramientas de mitigación tal como lo aconsejan las guías de Buenas Prácticas Agrícolas vigentes en el país.
- Se ha comprobado que los lechos biológicos son herramientas fundamentales para el buen cumplimiento de las BPAs, constituyen una opción ambientalmente amigable para minimizar la contaminación puntual en diversos sistemas productivos y aseguran la correcta disposición de los residuos.

CONSIDERACIONES FINALES:

- No hay una receta única para la instalación de una cama biológica.
- Las camas biológicas sirven para contaminaciones puntuales.
- Deben de tenerse en cuenta los volúmenes de agua que se verterán.
- Las camas biológicas no solucionan por si solas los problemas de contaminación.
- Las camas biológicas deben acompañar las BPAs.
- La instalación y evaluación siempre requiere de trabajo conjunto inicial de técnicos y productores que estén concientizados en las BPAs para la protección del ambiente.
- La respuesta de la gente, el interés de diferentes actores privados a raíz de los resultados obtenidos a través de una adecuada divulgación, muestran la gran aceptación que esta herramienta ha tenido en el sector productivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- European Commission. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed (SANTE 11813/2017).
- 2- Rivero, A. et al., 2016. Selección de basidiomicetes nativos con capacidad de degradar xenobióticos usando el endosulfán como modelo. *INNOTEC* 12, 27-33.
- 3- Rivero, A. 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.
- 4- Rivero, A. et al., 2016. Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale. *Talanta* 153, 17-22.
- 5- G. Tortella et al., 2013. Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? *Critical Reviews in Biotechnology* 35, 2, 165-172.
- 6- Castillo, M. del P. et al., 2008. Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use—A Review. *J Agric. Food Chem* 56, 15, 6206-6219.
- 7- OECD – (Organization for Economic Cooperation and Development) 1984. OECD guideline for testing of chemicals No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests.
- 8- Yu, F. et al., 2008. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology* 59, 6, 415-423.
- 9- Stanley, J. et al., 2016. Pesticide Toxicity to Earthworms: Exposure, Toxicity and Risk Assessment Methodologies. *Pesticide Toxicity to Non-target Organisms*, 277-350.
- 10- Acevedo-Barrios, R. et al., 2018. Ecotoxicological assessment of perchlorate using in vitro and in vivo assays. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 13697-13708.
- 11- Castillo, G. (ed), 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, IMTA, 202 pp.