



**UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA**

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS

**DISEÑO DE UN SISTEMA DE BIOCAMA PARA ELIMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
UTILIZADOS EN CULTIVOS DE CAFÉ**

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de

LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y DE BIOSISTEMAS

ÁLVARO FERNANDO OVIEDO MATAMOROS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

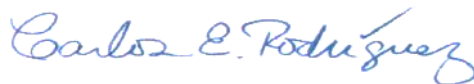
San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica

2022

Trabajo Final de Graduación sometido a revisión por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas



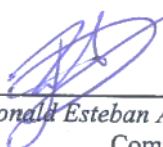
Alvaro Fernando Oviedo Matamoros
Postulante




Dr. Carlos Rodríguez Rodríguez, Ph.D.
Director del proyecto




Marta Pérez Villanueva, M.Sc.
Comité Asesor



Ronald Esteban Aguilar Álvarez, Ph.D.
Comité Asesor



Marta Montero Calderón, Ph.D.
Directora de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas y Miembro del tribunal Examinador



María José Rodríguez Vásquez, Ph.D.
Miembro del tribunal examinador y Lectora adicional

Dedicatoria

A mis padres,

A mis hermanos,

A mi Comunidad Neocatecumenal.

Agradecimientos

Al Padre, por concederme la virtud de ingresar a la Universidad, salir adelante en mi carrera: por darme un Shemá que me sostuvo en los tiempos más difíciles.

A mi comunidad, por haber estado conmigo en todo momento escuchándome y dándome una palabra cuando más lo necesité.

Al Dr. Carlos Rodríguez Rodríguez, por todo el conocimiento transmitido, el soporte y asesoría de este proyecto. Por su paciencia y dedicación conmigo.

A la Máster Marta Pérez Villanueva, por apoyarme con mis ensayos, por enseñarme nuevas metodologías y por su disposición a colaborar siempre.

A Didier, Mario, Michael y Chin, por toda su colaboración, ayuda y apoyo a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Ronald Aguilar Álvarez, por su colaboración en el diseño del sistema de biopurificación.

Al Centro de Investigación en Contaminación Ambiental - CICA, por abrirme las puertas y apoyarme con mi proyecto.

A la escuela de Ingeniería de Biosistemas por su colaboración en cada uno de los requisitos necesarios para finalizar este proyecto.

A la Universidad de Costa Rica, por convertirse en mi alma mater a la que estaré infinitamente agradecido.

A Vale, Rigui, Junior, Diego y Nacho por todo su apoyo en estos años y su amistad.

RESUMEN

Costa Rica se identifica en el mercado del café como uno de los productores de mayor calidad e importancia por sus propiedades, sabor e historia, de tal forma que su producción y comercialización ha tenido un impacto significativo en la economía nacional durante las últimas décadas. No obstante, el impacto de la producción de este “grano de oro” se ha externalizado al medio ambiente, teniendo consecuencias negativas debido, especialmente, a la contaminación por uso de plaguicidas para el control fitosanitario. Uno de los principales focos de atención es la contaminación puntual, originada especialmente por el manejo inadecuado de residuos de lavados de equipos de aplicación y frascos de los plaguicidas formulados, llegando, incluso a comprometer biosistemas de alto valor ambiental como cuerpos de agua y la capa orgánica del suelo.

Como una estrategia para mitigar el efecto de contaminación por esta actividad agrícola, en este estudio se diseñó un sistema de biopurificación de tipo biocama (o lecho biológico), específicamente para biodegradación de plaguicidas utilizados en café. Un lecho biológico es un sistema semiconfinado que contiene dentro de sí una biomezcla compuesta por 3 componentes principales en distintas proporciones: *material lignocelulósico* como principal fuente de carbono para los microorganismos dentro del sistema, *suelo* (que opera como inóculo aportando la carga microbiana que degradará las moléculas contaminantes) y algún material que sirva para dar estructura y retención de humedad en la biomezcla, como *compost* o *turba*.

Mediante la comparación de 3 biomezclas distintas, diferenciadas por el material lignocelulósico (Fibra de coco, cascarilla de café y cascarilla de arroz) se determinó, mediante ensayos de degradación, ecotoxicología y mineralización, que la biomezcla con fibra de coco en una relación 50:25:25 (fibra de coco:compost:suelo) presentó mayor eficiencia de detoxificación del medio, alcanzando degradación de plaguicidas por debajo del límite de cuantificación en moléculas como fluazifob-p-butyl, metil-tiofanato y oxamilo, en los primeros 2, 8 y 15 días, respectivamente. Además, esta misma biomezcla alcanzó a mineralizar hasta un $17,65 \pm 6,20\%$ al insecticida clorpirifós. Por otro lado, la matriz evaluada mostró

resultados muy favorables en la estimación del impacto ecotoxicológico al detoxificar el sistema, como se demostró en dos bioindicadores: La reducción de la toxicidad se observó tanto en *Daphnia magna* (pasando de una concentración efectiva media $EC_{50} = 0,767 \pm 0,022\%$ en el día 0 a $EC_{50} = 6,566 \pm 0,073\%$ en el día 30), como en el ensayo de germinación con semillas de lechuga *Lactuca sativa*, donde se incrementó en un 53% el índice de germinación luego de 30 días de tratamiento, con respecto al día 0.

Una optimización de las proporciones de los componentes de la biomezcla fue realizada resultando en una composición de 81,7:11:7,3 (fibra de coco:compost:suelo), la cual, logró reducir al 50% la concentración acumulada de los plaguicidas en un tiempo de 7,83 d. Estos resultados de degradación se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial de 3 parámetros para ser utilizados en el diseño dimensional de la biocama. Finalmente se diseñó una biocama de $0,8 \text{ m}^3$, de geometría rectangular, con un área superficial $a \times b = 1 \text{ m}^2$ y una profundidad de $h = 0,8 \text{ m}$.

ÍNDICE GENERAL

1.	CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	<i>Justificación</i>	1
1.2.	<i>Planteamiento y delimitación del problema</i>	3
1.3.	<i>Objetivos</i>	5
1.3.1.	<i>Objetivo General</i>	5
1.3.2.	<i>Objetivos Específicos</i>	5
2.	CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	6
2.1.	<i>Plaguicidas en suelos, agua y aire</i>	6
2.1.1.	<i>Suelo</i>	6
2.1.2.	<i>Agua</i>	7
2.1.3.	<i>Aire</i>	8
2.2.	<i>Biodegradación y mineralización de plaguicidas</i>	8
2.3.	<i>Sistemas de Biopurificación: Biocamas</i>	9
3.	CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	13
3.1.	<i>Plaguicidas en estudio</i>	13
3.2.	<i>Diseño experimental</i>	13
3.2.1.	<i>Objetivo 1: Evaluar el potencial de tres biomezclas de distinto material lignocelulósico (cascarilla de café, fibra de coco y cascarilla de arroz) para degradar, mineralizar y detoxificar plaguicidas utilizados en café.</i>	13
3.2.1.1.	<i>Screening (Fase 0)</i>	13
3.2.1.1.1.	<i>Respiración las biomezclas</i>	15

3.2.1.1.2. Ensayo de mineralización	17
3.2.1.1.3. Ensayo de degradación.....	19
3.2.1.1.4. Ensayo de ecotoxicidad.....	21
3.2.2. Objetivo 2: Optimizar la composición de la biomezcla para maximizar el rendimiento de eliminación de plaguicidas.	25
3.2.2.1. Selección de biomezcla para optimización	25
3.2.2.2. Optimización de la biomezcla.	25
3.2.2.3. Análisis ponderado de factores.....	27
3.2.2.4. Degradación post-optimización.....	28
3.2.3. Objetivo 3: Realizar un diseño dimensional de un sistema de biopurificación de tipo biocama, ajustado a un modelo de decaimiento exponencial.....	29
3.2.3.1. Diseño del biobed.....	29
4. CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Fase 0.....	31
4.1.1. Respiración de las biomezclas	31
4.2. Fase 1.....	32
4.2.1. Mineralización de Clorpirifós.....	32
4.2.1.1. Análisis de varianza.....	33
4.2.2. Degradación de Plaguicidas.....	34
4.2.2.1. Análisis de varianza.....	38
4.2.3. Ecotoxicidad	40
4.2.3.1. Ensayo de ecotoxicología en <i>D. magna</i>	40

5.1.1.1.1. Análisis de varianza	42
5.1.1.2. Ensayo de germinación en semillas de <i>Lactuca sativa</i>	43
5.1.2. Análisis de correlación	45
5.2. Fase 2.....	46
5.2.1. Optimización: Análisis por pesos	47
5.2.2. Degradación post-optimización.....	47
5.2.2.1. Análisis de varianza	51
5.3. Fase 3.....	53
5.3.1. Estimación de los parámetros de diseño.....	53
5.3.2. Estimación de las condiciones de diseño	54
5.3.3. Diseño final de la biocama	58
6. CONCLUSIONES	61
7. RECOMENDACIONES	62
8. REFERENCIAS.....	65
9. ANEXOS	73
9.1. Código fuente para procesamiento de datos. Degradación. Python 3.9	73
9.2. Código fuente para procesamiento de datos. Mineralización. Python 3.9	74
9.3. Código fuente para procesamiento de datos. Ecotoxicología (<i>Daphnia magna</i>). Python 3.9	76
9.4. Código fuente para procesamiento de datos. Ecotoxicología (<i>Lactuca sativa</i>). Python 3.9	77
9.5. Código fuente para procesamiento de datos. Optimización - Degradación. Python 3.9.....	78
9.6. Anexo A. Resultado de cálculos de plaguicidas para preparación de coctel (Python 3.9)	81

9.7.	<i>Anexo B. Detalle de accesorios de la biocama</i>	82
9.8.	<i>Anexo C. Optimización: Resultados Generales</i>	84

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
UCR	Universidad de Costa Rica
CICA	Centro de Investigación en Contaminación Ambiental
BPS	Sistema de Biopurificación
CCD	Diseño Central Compuesto
CC	Cascarilla de café
CA	Cascarilla de arroz
FC	Fibra de coco

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biocamas de uso común en fincas agrícolas. Fuente: (FAO, 2016).....	10
Figura 2. Biomezclas para la ejecución del proyecto. B1- Cascarilla de café, B2- Fibra de coco y B3- Cascarilla de arroz.....	15
Figura 3. Sistema biométrico para cuantificación de CO ₂ en ensayo de respiración y mineralización.	17
Figura 4. Etapas de la ejecución del ensayo de mineralización, extracción y lectura de muestras.....	19
Figura 5. Muestras de biomezclas en tubos para centrifuga y coctel de plaguicidas.....	20
Figura 6. Elutriados para ensayos de ecotoxicidad.....	21
Figura 7. Neonato 24 horas D. magna. Fuente: (Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2021).....	22
Figura 8. Viales de 20 mL de medio contaminado con 10 individuos de Daphnia cada uno para estimación de EC ₅₀	22
Figura 9. Bioensayo de germinación de semillas de lechuga Lactuca sativa.....	24
Figura 10. Distribución espacial del CCD.	26
Figura 11. Respiración basal de las biomezclas determinado en un plazo de 24 h. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.....	31
Figura 12. Mineralización acumulada porcentual de ¹⁴ C-Clorpirifós en cada biomezcla sin presencia de otros plaguicidas (derecha) y clorpirifós aislado (izquierda).....	32
Figura 13. Análisis de varianza del porcentaje de mineralización entre biomezclas para el día 45 por tratamiento. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.	33
Figura 14. Análisis de varianza entre tasa media de mineralización entre ensayos por tipo de biomezcla, Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes	33
Figura 15. Resultado de degradación comparativa por biomezcla para las 12 moléculas de los ingredientes activos de plaguicidas de café en estudio. Parte 1	35

Figura 16. Resultado de degradación comparativa por biomezcla para las 12 moléculas de los ingredientes activos de plaguicidas de café en estudio. Parte 2	36
Figura 16. Análisis de varianza con prueba de Tukey para la concentración total promedio en un periodo de 30 días por biomezcla. $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.	39
Figura 17. Análisis de varianza de biomezclas por plaguicida para la concentración final obtenida en un periodo de eliminación de 30 días. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.....	40
Figura 18. EC_{50} calculada por día de estudio por biomezcla, ajustada según el modelo de Hills.	41
Figura 19. Concentración efectiva media para los días 0, 15 y 30.....	42
Figura 20. Análisis de varianza de la EC_{50} por día entre biomezclas. Prueba de Tukey $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.....	43
Figura 21. Análisis de varianza de la EC_{50} por biomezcla entre días. Prueba Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.....	43
Figura 22. Efecto del medio contaminado sobre la germinación de semillas de lechuga según el tiempo de degradación en el sistema.	44
Figura 23. Análisis de varianza para el índice de germinación de semillas de lechuga por día entre biomezcla. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes	45
Figura 24. Análisis de varianza para el índice de germinación por biomezcla entre días. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.	45
Figura 25. Análisis de varianza de las soluciones resultantes de la optimización por pesos con prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.....	47
Figura 27. Resultados de degradación de plaguicidas en un tiempo de 20 días por plaguicida. Parte 1 ...	48

Figura 28. Resultados de degradación de plaguicidas en un tiempo de 20 días por plaguicida. Parte 2 ...	49
Figura 27. Análisis de varianza para la degradación máxima alcanzada en un tiempo de 20 días (máximo de estudio) por cada plaguicida. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.....	52
Figura 28. Análisis de varianza con prueba de Tukey para la concentración total promedio en un periodo de 20 días por biomezcla según tipo de suelo usado y arreglo proporcional de los componentes en estudio. $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.	53
Figura 29. Concentraciones sumadas: curva de eliminación en un periodo de 20 días.	54
Figura 30. Prototipos preliminares para sistema de biorremediación de plaguicidas.	56
Figura 33. Diseño final del sistema de biopurificación (BPS) para eliminación de plaguicidas utilizados en café.....	60
Figura 32. Superficies de respuesta de degradación por plaguicida. Parte 1.	84
Figura 33. Superficies de respuesta de degradación de por plaguicida. Parte 2.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingredientes activos en estudio de plaguicidas de uso en café.....	13
Tabla 2. Densidades aparentes calculadas en laboratorio para la conformación de las biocamas.	15
Tabla 3. Concentraciones utilizadas para el ensayo de ecotoxicología con <i>Daphnia magna</i>	23
Tabla 4. Composición de las biomezclas según el CCD.....	26
Tabla 5. Pesos Asignados según categoría e impacto o peligro asociado.....	28
Tabla 6, Vida media (DT50) estimada en días para cada plaguicida según la biomezcla en estudio.	38
Tabla 7. Correlación con índice de Pearson en la biomezcla "Cascarilla de Arroz".....	46
Tabla 8. Correlación con índice de Pearson en la biomezcla "Cascarilla de Café".	46
Tabla 9. Correlación con índice de Pearson en la biomezcla "Fibra de Coco".....	46
Tabla 10, Comparación de vidas medias obtenidas para la biomezcla no optimizada de FC y las biomezclas optimizadas.	50
Tabla 11. Estimaciones de diseño para los cálculos dimensionales de la biocama.....	55
Tabla 12. Resultados de los cálculos dimensionales de la biocama en 2 escenarios.	56
Tabla 13. Análisis de ventajas y desventajas de los prototipos propuestos para el sistema de biopurificación.	57
Tabla 14. Detalle de accesorios del sistema de biopurificación. Parte 1.....	82
Tabla 15. Detalle de accesorios del sistema de biopurificación. Parte 2.....	83

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

Costa Rica se ha posicionado a nivel mundial como un productor de café de alta calidad, tanto para consumo local como de exportación; para el 2014 el VI Censo Nacional Agropecuario identificó 26527 fincas cafetaleras en un total de 84133,1 ha. De acuerdo con este mismo censo, la producción de café se encuentra entre las actividades que comprenden la mayor extensión de área dedicada, destacándose entre otros cultivos de alta relevancia como palma aceitera, caña de azúcar, banano y piña (INEC, 2015).

Este tipo de actividades agrícolas incrementan el riesgo de contaminación ambiental, comprometiendo matrices productivas como el suelo y reservorios hídricos (Morillo & Villaverde, 2017). No solo se ve afectada la vida presente dentro de estos cuerpos, sino también, los ciclos bioquímicos que tienen lugar en el suelo (Chawla et al., 2013). Mateo-Sagasta et al. (2018) indican que más de 4,5 millones de toneladas de plaguicidas son esparcidas al medio ambiente en actividades agrícolas (contaminando suelos, agua y aire), este tipo de contaminación puede ocurrir de forma difusa, en la que su origen no está espacialmente definido y ocurre en focos muy difíciles de identificar (Schaaf, 2015) o bien, puede acaecer de forma puntual, en donde sí se conoce su origen, por ejemplo, derrames en las zonas de llenado de los equipos de aplicación fitosanitaria por lavado de los tanques y descarte de residuos de aplicación, entre otros (Chin-Pampillo et al., 2015; Soares et al., 2013).

En el ámbito nacional, la problemática por contaminación difusa es tal que, en regiones de alta producción agrícola, como lo es la subcuenca Maravilla-Chiz y Quebrada Honda, se han hallado concentraciones moderadas de plaguicidas en manantiales para consumo humano (Fonseca-Sánchez et al., 2019). A pesar de que la evidencia en este caso mostró ser que la contaminación fue causada por contaminantes de uso agrícola, incluido producción de café, no se conoce a ciencia cierta el origen de la contaminación (Fonseca-Sánchez et al., 2019). En Costa Rica, estudios han reportado el uso de 30 plaguicidas en café a una demanda equivalente de 3,69 kg_{ia}/ha/año entre los que se destacan 16 fungicidas, 3 herbicidas, 6 insecticidas y 5 nematicidas; de los cuales, los ingredientes activos mayormente empleados

pertenecen a la familia de los fungicidas triazoles e insecticidas organofosforados (Durán et al., 2013). Además, de la concentración equivalente anual, un 34% corresponde a moléculas de toxicidad aguda alta-extrema (Durán et al., 2013; Ministerio de Ambiente y Energía, 2000).

Insecticidas organofosforados como el clorpirifós (CLP) afectan directamente el sistema endocrino, inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa y provocando la muerte de insectos, incluidos algunos polinizadores (Abraham & Silambarasan, 2016; Chen et al., 2012). A pesar de la corta vida media reportada (30-60 días), este plaguicida se identifica por el fabricante como altamente tóxico con una concentración letal media (CL_{50}), o concentración a la cual morirá el 50% de los organismos expuestos, menor a los 0,025 mg/L para especies acuáticas en bases agudas (Lewis et al., 2016), es decir, tras una exposición de corta duración (Naciones Unidas, 2006).

Este tipo de plaguicidas organofosforados se caracterizan por el alto potencial de acumulación en el suelo debido a su polaridad, sin embargo, si la interacción de fuerzas de adhesión entre las partículas del suelo y el plaguicida son débiles, aunque la molécula sea de carácter lipófilo, existirá un riesgo de contaminación hacia cuerpos de agua (Suddaby et al., 2016). En este sentido, Huete-Soto et al. (2017) detallan que la afinidad de la molécula de CLP hacia los lípidos es una ventaja, porque los mantos subterráneos corren poco riesgo de ser contaminados, empero, estudios han demostrado concentraciones de CLP en aguas superficiales utilizadas para riego agrícola de hasta 0.3029 ± 0.0009 mg/L (Molina-Morales et al., 2012).

Actualmente, la implementación de biocamas, también conocidas como biobeds (por su traducción en inglés) y lechos biológicos, se ha presentado como una solución alternativa para minimizar los riesgos de exposición del suelo a concentraciones puntuales de plaguicidas, debido a su bajo costo y alta eficiencia de degradación (Huete-Soto et al., 2017; Karanasios, Karpouzias, et al., 2012). Una biocama es un sistema de biopurificación (BPS, por sus siglas en inglés) que busca eliminar las concentraciones de plaguicidas residuales del lavado o derrames de los equipos de aplicación. La degradación de las moléculas contaminantes ocurre en la biomezcla contenida en la biocama, la cual, es una mezcla de tres sustratos

principales: 1) *material lignocelulósico* como fuente de carbono (fibra de coco, cascarilla de arroz, paja y otros) que favorece la proliferación de hongos lignolíticos y reacciones de oxidación que promueven la degradación de plaguicidas, 2) *material de retención* del contaminante (por ejemplo, compost) y 3) *inóculo de microorganismos* preexpuestos al plaguicida como, por ejemplo, el suelo del campo donde se aplica el formulado; el mismo garantiza que las poblaciones microbianas tendrán la capacidad de metabolizar los compuestos orgánicos en un periodo más corto (Castillo et al., 2008).

Este trabajo busca implementar un sistema de tipo biocama para eliminación de plaguicidas residuales de uso en café, que provea al caficultor de una herramienta sencilla, para la gestión responsable de las aguas de lavados de tanques y equipos de aplicación, de forma tal que, en el tiempo, se reduzca el riesgo de contaminación puntual de suelos y cuerpos de agua bajo el marco de buenas prácticas agrícolas. El proyecto se desarrolló bajo la dirección del Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) de la Universidad de Costa Rica, para productores de fincas cafetaleras en la región occidental del Valle Central: Naranjo y Palmares.

1.2. Planteamiento y delimitación del problema

Esta investigación nació a raíz de la necesidad en el sector cafetalero por contar con un sistema para el manejo responsable de las aguas contaminadas de lavado. Actualmente el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social (2006) en su “Reglamento de Salud Ocupacional en el Manejo y Uso de Agroquímicos” indica los pasos para realizar el triple lavado de los frascos de formulados y los equipos de aplicación, sin embargo, no se indica explícitamente una metodología para deshacerse del agua residual resultante. Esto es principalmente un problema en el caso del triple lavado de las bombas fumigadoras de espalda o estacionarias: normalmente el residuo del lavado de los frascos se vierte sobre el contenedor de la mezcla que se fumigará en el cultivo, empero, para el caso de estos equipos ya la mezcla inicial fue distribuida, y reaplicar estos residuos diluidos nuevamente sobre las plantas no se recomienda porque podría generar un efecto de lavado foliar en plaguicidas de contacto (no sistémicos). A este punto se requiere contar con un depósito controlado que permita verter los residuos del triple lavado de forma segura para el ambiente.

Se propuso realizar un trabajo de investigación para diseñar un sistema de tipo biocama capaz de eliminar los plaguicidas en el corto o mediano plazo de forma natural, un sistema que el productor pueda construir e instalar en su finca sin incurrir en gastos elevados, utilizando materiales reutilizados o de fácil adquisición.

Este trabajo se centra en las fincas cafetaleras de la zona de occidente como parte del esfuerzo que realiza la Universidad de Costa Rica y el CICA por acercarse y llevar soluciones científicamente probadas a productores del país y ayudar a una gestión ambiental responsable.

Para el diseño experimental preliminar se evaluó tres tipos de biomasa de alto contenido lignocelulósico, una de ellas fue la cascarilla de café (pergamino seco) donada por el beneficio Café de Altura para este propósito. Estas se utilizaron en el tamaño de partícula que se encuentran disponibles (sin un procesamiento previo de molienda). De la fase preliminar se determinó la biomezcla con mayor rendimiento y, una vez optimizada, se realizó un diseño dimensional de la biocama final. Se detalló cada uno de los componentes del diseño con sus respectivos materiales, cantidad y dimensiones. Se busca que este trabajo pueda ser utilizado como un referente para la construcción del sistema propuesto en las condiciones acá estudiadas.

A pesar de que en Costa Rica se registran más de 30 plaguicidas para uso en café, se contempló únicamente aquellos formulados para los cuales se cuenta con capacidad analítica en el CICA. Además, el análisis de las distintas biomezclas planteadas se realizó excluyendo parámetros fisicoquímicos como pH, contenido de humedad, humedad relativa y temperatura. Buscando así obtener un diseño de biosistema simple, fácil de operar y de mantener por los usuarios (de cualquier escolaridad) evitando aumentar su complejidad de operación, y buscando aumentar el interés de los agricultores por implementarlo en sus fincas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Diseñar un sistema de biopurificación de tipo biocama para remover plaguicidas de uso frecuente en cultivos de café.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el potencial de tres biomezclas de distinto material lignocelulósico (cascarilla de café, fibra de coco y cascarilla de arroz) para degradar, mineralizar y detoxificar plaguicidas utilizados en café.
- Optimizar la composición de la biomezcla para maximizar el rendimiento de eliminación de plaguicidas.
- Realizar un diseño dimensional de un sistema de biopurificación de tipo biocama, ajustado a un modelo de decaimiento exponencial.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Plaguicidas en suelos, agua y aire*

El uso de agroquímicos en la actividad agrícola puede representar un riesgo de contaminación puntual cuando no se les da un manejo correcto a los residuos: la incidencia de derrames en las zonas de lavado o recarga de los equipos de aplicación aumenta las concentraciones en el suelo por la adición recurrente de estas sustancias (Soares et al., 2013).

Algunos estudios demuestran que la problemática de contaminación por plaguicidas en suelos es muy compleja debido a la variabilidad en la dinámica que siguen: unas moléculas son más propensas a fijarse en la materia orgánica, mientras que otras de mayor carácter hidrofílico se disuelven en agua con facilidad y abandonan los suelos como lixiviados, o bien, aquellas moléculas más volátiles se movilizan hacia el aire (Sun et al., 2018; Tarcau et al., 2013; Wong et al., 2012).

2.1.1. *Suelo*

Un contaminante que alcanza al suelo puede verse retenido dejando una fracción biodisponible para los microorganismos y otra no biodisponible, la cual, se fija a las partículas del suelo una vez alcanzado el equilibrio de adsorción. Según sean las fuerzas de adhesión, existe el riesgo de que esta fracción se libere al suelo con todo su potencial contaminante. Suddaby et al. (2016) identificaron que se alcanza el equilibrio de adsorción molecular en aproximadamente 4 meses para el hexaconazole (fungicida evaluado en este trabajo), sin embargo, en condiciones abióticas, la reversibilidad de la adsorción es fácilmente alcanzable, representando alto riesgo de contaminación, puesto que, la fracción fijada en el suelo tendería a volverse biodisponible de forma sencilla con todo su potencial tóxico.

Un enfoque interesante con respecto a la retención y degradación de plaguicidas en el suelo es abarcado por Ghafoor et al. (2011), quienes modelaron, matemáticamente, la capacidad de degradación y adsorción de un suelo cualquiera mediante una constante κ , tomando en cuenta parámetros como profundidad, tipo de suelo y otros, obtienen un aproximado de la biodisponibilidad del compuesto y la actividad microbiana sobre este, aplicable a macro-modelos escalados. Véase la ecuación (1).

$$\kappa = \kappa_{ref} F_L^m f_{oc} f_{clay}^p \left(\frac{z_r}{z}\right)^q \quad (1)$$

Donde:

z_r = Profundidad de referencia.

F_L = Factor de biodisponibilidad $[1/(m_g + K_d)]$.

m_g = Contenido de Agua Gravimétrica $[m_{water}^3/kg_{soil}]$.

K_d = Constante de adsorción.

κ_{ref} = Parámetro específico del compuesto $[v_s/K_c]$.

v_s = Tasa de utilización específica máxima del sustrato $[kg/kg]$.

K_c = Constante media de saturación de utilización del sustrato $[kg/m^3_{agua}]$.

f_{oc} = Contenido orgánico de carbono.

n, m = Exponentes empíricos.

f_{clay} = Contenido de arcilla.

2.1.2. Agua

La lixiviación se considera un mecanismo de arrastre de contaminantes de alta relevancia por el riesgo de contaminación a cuerpos de aguas subterráneas; se ha determinado que no solo influye la polaridad de la molécula en fijarse, o no, a las partículas de suelo, sino también, el tipo de formulación comercial: Khan & Brown (2016) encontraron que, para los triazoles evaluados, existe una mayor tendencia a lixiviar los formulados en presentación de concentrados emulsionables (EC), comparados con las suspensiones concentradas (SC) y sustancias puras. Como estrategia para reducir la lixiviación de plaguicidas, se han utilizado acciones preventivas en campo, mediante el uso de enmiendas biomásicas que potencializan la fijación y degradación de las moléculas, por ejemplo, Fenoll et al. (2011) hallaron que aplicar enmiendas de estiércol de oveja compostado y bosorola de café disminuye proporcionalmente, al contenido de materia orgánica de la biomasa y la concentración de los plaguicidas en los lixiviados, entre los que se encontraban triazoles como: tebuconazole, triadimenol y hexaconazole.

2.1.3. Aire

En los últimos años, estudios han demostrado que las personas de países en desarrollo y niños de zonas rurales se exponen a un riesgo de ingesta por vía oral de partículas de suelo contaminadas con plaguicidas, alcanzando consumo no intencional de hasta 200 mg de suelo por día con trazas de plaguicidas (Tao et al., 2011). A pesar de que el potencial de toxicidad del contaminante está ligado a su biodisponibilidad dentro del organismo, se ha determinado que la ingesta involuntaria de estas partículas puede considerarse un riesgo significativo para la salud y no debe ser subestimado (Tao et al., 2011).

2.2. Biodegradación y mineralización de plaguicidas

Investigaciones han concluido que los principales responsables de la eliminación de plaguicidas en el medio ambiente son los microorganismos que se encuentran en los suelos. Estos, de forma natural, son capaces de degradar los plaguicidas por completo o transformarlos en moléculas más sencillas, como consecuencia directa o indirecta de su actividad metabólica (Domínguez Gual, 2015).

La mineralización de contaminantes ocurre cuando estas moléculas son biodegradadas hasta alcanzar una transformación completa a moléculas inorgánicas más simples como H₂O y CO₂ (Lafuente, 2007). Cuando el proceso de transformación no se lleva a cabo en su totalidad, el resultado son moléculas llamadas *subproductos de transformación o metabolitos*, los cuales, en ocasiones pueden tener un mayor potencial de contaminación o toxicidad que la molécula parental (Chai et al., 2013; Valderrama et al., 2012), tal es el caso de algunos compuestos organofosforados, que, bajo una transformación incompleta, sus metabolitos han evidenciado ser más tóxicos que la molécula madre (Vittozzi et al., 2001).

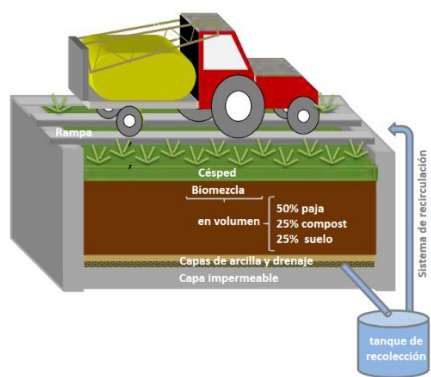
Cuando no se cuenta con información de los metabolitos de transformación producidos, ni el nivel de contaminación en un medio, es prudente realizar análisis ecotoxicológicos. Estos ensayos se determinan utilizando especies indicadoras como *Daphnia magna*, *Eisenia fetida*, entre otras; dichas especies son consideradas como representativas en la cadena trófica, lo cual, permite extrapolar los resultados a mayores escalas, como un indicador final del estado de toxicidad del medio evaluado (Walker et al., 2016). Los ensayos de ecotoxicología consisten en exponer un número limitado de individuos a concentraciones

conocidas, hasta evidenciar un cambio en su comportamiento habitual, ya sea muerte total o algún tipo de inhibición de movimiento o reproducción en la muestra (Daam et al., 2011).

2.3. *Sistemas de Biopurificación: Biocamas*

Una alternativa de sistemas de biopurificación, sencilla de utilizar y mantener, son las biocamas o *biobeds* (conocidos también como lechos biológicos). Esta tecnología inició como una estrategia de eliminación de contaminantes en Suecia en el año 1993 por el finquero Goran Ohlsson. Ya para los años 2000 se comenzó a utilizar en otros países hasta llegar a territorios latinoamericanos, donde, para el 2013, se reportaban más de 2000 unidades funcionando (Castillo et al., 2019). La FAO (2016) define los biobeds como una matriz biológicamente activa, diseñada para fijar y eliminar derrames de plaguicidas en las etapas de llenado, enjuague o estacionamiento de equipos de aplicación u otras operaciones que impliquen riesgo de contaminación química puntual. Esta definición sugiere que su composición volumétrica de la biomasa deberá ser aproximadamente de un 50% de contenido de materia rica en lignocelulosa, 25% de algún sustrato retenedor como turba o compost, y un 25% de materia inoculante como suelo preexpuesto a los plaguicidas meta.

El diseño estructural de un biobed varía según las aplicaciones de esfuerzos que soportará, por ejemplo, en la **Figura 1**, se muestra un diagrama de las partes que componen un biobed al nivel del suelo, en el cual, la maquinaria agrícola (tractor y tanqueta o spray-boom) utilizada para aplicaciones fitosanitarias se estaciona y hace los llenados de la solución de plaguicidas.



a) Biocama de parqueadero de maquinaria



b) Biocama de vertido para bombas de mochila

Figura 1. Biocamas de uso común en fincas agrícolas. Fuente: (FAO, 2016)

Esta estructura, normalmente construida en mampostería con las paredes internas impermeabilizadas, deberá soportar el peso del equipo agrícola y del operario (cargas vivas), y de la biomezcla en su interior (cargas muertas). Esta última se encuentra cubierta en la superficie superior con césped y, en la base interna, una capa de arcilla y drenaje. Además, por los volúmenes de trabajo, se cuenta con un sistema de recirculación para homogeneizar la distribución del plaguicida en la biomezcla.

Otro tipo de biocamas más simplificados se utilizan en fincas de pequeños productores, en ellas los volúmenes residuales son bajos, por lo que, normalmente, estas estructuras se componen de un recipiente impermeable como un estañón¹ comercial de 200 L que contienen la biomezcla en su interior (Véase la **Figura 1 b**).

La eficiencia de las biocamas se asocia a la composición de la biomezcla y su capacidad de favorecer condiciones idóneas para el desarrollo de microorganismos (Karanasios, Karpouzas, et al., 2012). Principalmente, el material lignocelulósico (residuos de paja, puerro, fibra de coco, cáscaras de cítricos,

¹ Cabe destacar que, en Costa Rica, no se ha encontrado evidencia de biocamas diseñadas dimensionalmente a partir de los resultados de degradación de la biomezcla, siendo los estañones comerciales los recipientes más comunes recomendados para contener el sistema.

hojas de olivo, bagazo, etc.) toma un papel importante en la aceleración del crecimiento de poblaciones de hongos lignolíticos, capaces de degradar las moléculas de los plaguicidas (Castillo et al., 2008; Karanasios, Tsiropoulos, et al., 2012).

Otro factor importante en la evaluación de la eficiencia de biocamas es la concentración (mg/kg) del plaguicida en la biomezcla (Chai et al., 2013). Tortella et al. (2013) señalan que las biomezclas deben tener la capacidad de degradar un contaminante a altas concentraciones. Por ejemplo, para plaguicidas agrícolas, debe utilizarse concentraciones por encima de la recomendada para aplicaciones, o aquella que represente un derrame accidental en los puntos de llenado y lavado de los equipos (Tortella et al., 2013).

Estos sistemas de biopurificación se pueden implementar, inclusive, sin conocer la identificación de todos los microorganismos que actúan metabólicamente en ellos (Góngora-Echeverría et al., 2018). Por ejemplo, en una biocama, basta con inocular la matriz con un suelo previamente expuesto a los contaminantes, ofrecer ciertas condiciones idóneas (humedad, fuente de carbono, etc.) para la proliferación de los microorganismos y optimizar el rendimiento con variaciones en el tipo de material lignocelulósico, temperatura, humedad u otros factores determinantes (Coppola et al., 2007). En Costa Rica, Chin-Pampillo et al. (2015) evaluaron la degradación del insecticida carbamato carbofurán variando el sustrato lignocelulósico (aserrín, bagazo de caña, fibra de coco, papel periódico y cascarilla de arroz) y las proporciones volumétricas de cada componente. Determinaron que, en combinación con turba/compost y suelo, todas las variaciones de la biomezcla presentaron un alto índice de detoxificación; además, la biomezcla a base de compost y fibra de coco evidenció mayor rendimiento en la proporción v/v 2:1:1 (fibra de coco : suelo : compost).

Ahora bien, con respecto a la vida útil de la biocama, según explica la Universidad de la Frontera (2013), el funcionamiento óptimo de la biomezcla de un lecho biológico es de aproximadamente 4 a 5 años, una vez pasado este periodo, se recomienda reemplazar toda la biomezcla. Así mismo, bajo buenas condiciones de temperatura y de uso estas pueden alcanzar una vida útil de hasta 8 años (Castillo et al., 2008).

Una vez que se remueve la biomezcla de la biocama, es necesario compostarla previo a su disposición en el predio. Ya que, de acuerdo con la Universidad de la Frontera (2013), esta puede contener pequeñas cantidades de residuos de plaguicidas, ya sea porque el lecho biológico fue usado recientemente o por aquellos plaguicidas que son degradados con mayor lentitud. Debe tomarse en cuenta que el proceso de compostaje implica ampliar la biomezcla en un plástico protegida de la lluvia, por un periodo de 6 a 12 meses, revolviéndola una vez por semana, procurando que siempre esté en la temperatura adecuada. Pasado este periodo, el material puede ser dispuesto en el predio de manera segura. Martín Elorza, (2020) recomienda que la cantidad a esparcir en el campo no debe superar las 50 toneladas por hectárea por año.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Plaguicidas en estudio

Se realizó un rastreo de los plaguicidas usualmente utilizados en cultivos de café en el territorio nacional y se identificó aquellos para los que se cuenta con capacidad analítica en el CICA. La **Tabla 1** muestra la lista de plaguicidas que fueron utilizados en los ensayos del proyecto con las respectivas concentraciones en los formulados comerciales utilizados.

Tabla 1. Ingredientes activos en estudio de plaguicidas de uso en café.

Molécula	Formulado Comercial	Concentración en formulado	Familia
Oxamil	Oxate 24 SL	240 g/L	Carbamato
Metil-tiofanato	Cycosin 50 SC	500 g/L	Benzimidazol
Hexaconazole	Hexil 5 SC	50 g/L	Triazol
Fluaxifob - p - butil	Flob 12.5 EC	125 g/L	Ariloxifenoxipropionato
Carbendazín	Soprano 25 SC	250 g/L	Benzimidazol
Epoxiconazole	Soprano 25 SC	250 g/L	Triazol
Propiconazole	Propicon 25 EC	250 g/L	Triazol
Triadimefón	Next 25 WP	250 g/kg	Triazol
Clorpirifós	Solver 48 EC	480 g/L	Organofosforado
Imidacloprid	Armero 70 WG	70 g/kg	Neonicotinoide
Tebuconazole	Silvacur Combi 30 EC	225 g/L	Triazol
Triadimenol	Silvacur Combi 30 EC	75 g/L	Triazol

3.2. Diseño experimental

El proyecto se dividió en 3 fases en serie que dan cumplimiento a cada uno de los objetivos específicos planteados:

3.2.1. Objetivo 1: Evaluar el potencial de tres biomezclas de distinto material lignocelulósico (cascarilla de café, fibra de coco y cascarilla de arroz) para degradar, mineralizar y detoxificar plaguicidas utilizados en café.

3.2.1.1. Screening (Fase 0)

El ensayo *screening* consistió en una etapa preliminar del proyecto que buscaba conocer el potencial de eliminación de plaguicidas de las distintas biomezclas a evaluar, su efecto de toxicidad

ambiental y la capacidad de mineralización de un plaguicida en concreto (CLP): La estructura de las biomezclas fue dada por tres componentes: el material lignoceluloso, el inóculo (suelo de una finca de café²), y finalmente, el material de soporte y fijación (compost); todo esto en una relación volumétrica de 2:1:1, respectivamente.

Se prepararon 3 biomezclas, empleando el mismo suelo preexpuesto (25% v/v) y el mismo compost (25% v/v), pero con cada uno de tres sustratos lignocelulósicos (50% v/v): fibra de coco (FC), cascarilla de café (CC) y cascarilla de arroz (CA). La preparación de cada biomezcla se realizó en paralelo, el mismo día que las otras; para lo cual, al tratarse de una relación volumétrica de los componentes, se calculó, primero, la densidad aparente de cada uno de ellos, y se estimó cuánta masa debía agregarse hasta alcanzar la masa total necesaria para correr los ensayos que cubren esta fase del proyecto.

La fase *screening* se constituyó de tres ensayos a nivel de laboratorio, para los cuales, fue necesario un total de biomezcla de 1 kg por cada ejemplar a evaluar. Para el cálculo de la masa necesaria de cada componente se utilizó la ecuación (2).

$$\frac{V_T}{2} \cdot \rho_{cl} + \frac{V_T}{4} \cdot \rho_{cc} + \frac{V_T}{4} \cdot \rho_{ci} = 1 \text{ kg} \quad (2)$$

Donde:

V_T = Volumen total de la biomezcla.

ρ_{cl} = Densidad aparente del componente lignocelulósico.

ρ_{cc} = Densidad aparente del componente compost.

ρ_{ci} = Densidad aparente del componente inóculo.

De lo anterior se calculó el volumen final de biomezcla con una masa de 1 kg a partir de las densidades aparentes estimadas en laboratorio. La densidad aparente de cada componente se calculó utilizando un frasco aforado a un volumen conocido, y, mediante la diferencia de masas, se obtuvo el valor

² Este suelo se encuentra preexpuesto a plaguicidas debido al uso cotidiano del manejo de cultivo y control de plagas que lleva a cabo el productor.

final de la masa del componente sobre el volumen medido en términos de g/L. Las densidades utilizadas se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Densidades aparentes calculadas en laboratorio para la conformación de las biocamas.

Material	Densidad aparente [g / L]
Suelo	890.36 ± 2.10
Fibra de Coco	129.86 ± 1.75
Compost	797.46 ± 0.90
Cascarilla de café	319.05 ± 1.20
Cascarilla de arroz	127.30 ± 1.48

Finalmente, cada biomezcla se humedeció hasta alcanzar aproximadamente un contenido de humedad del 75% con agua de tubo, luego fueron incubadas a 25°C durante 30 días para activar y estabilizar las poblaciones microbianas. En la **Figura 2** se muestran las tres biomezclas evaluadas antes y después del periodo de estabilización.

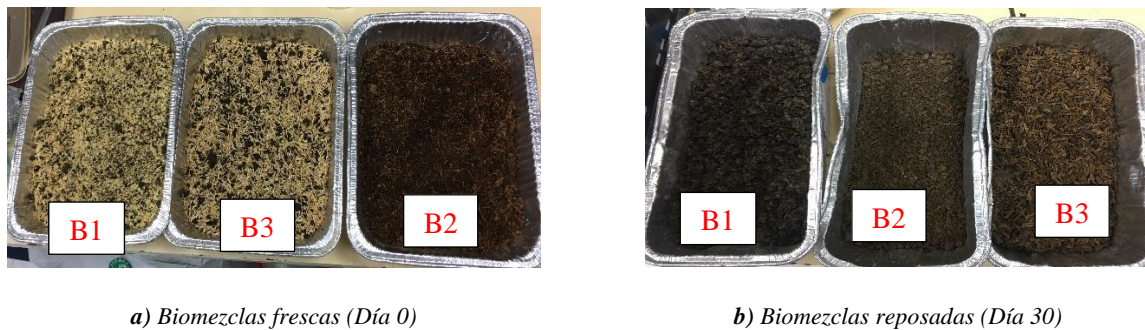


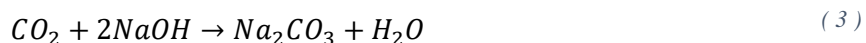
Figura 2. Biomezclas para la ejecución del proyecto. B1- Cascarilla de café, B2- Fibra de coco y B3- Cascarilla de arroz.

3.2.1.1.1. Respiración las biomezclas

Siguiendo el protocolo “Determinación de la tasa de respiración basal en muestras de suelo por medio de titulación” del CICA, se evalúa, mediante la tasa de respiración de las biomezclas, la actividad metabólica de los microorganismos presentes en términos de miligramos de dióxido de carbono consumidos por kilogramos de biomezcla por hora

$$\text{por kilogramos de biomezcla por hora } \frac{mg_{CO_2}}{kg_{suelo} \cdot h}.$$

El experimento consistió en cuantificar el CO₂ emitido por el proceso de respiración de los microorganismos dentro de un sistema aislado mediante una trampa de CO₂, la cual, tiene como principio la reacción de la ecuación química (3) donde se expone el CO₂ emitido a un medio de NaOH a una concentración conocida para dar lugar a la reacción.



Así, la cantidad de CO₂ absorbido es igual a la cantidad de NaOH consumido, este último es cuantificable mediante titulación. Para ello se precipita el carbonato con cloruro de bario BaCl₂ para obtener únicamente un remanente de NaOH con HCl. Finalmente, de la diferencia entre NaOH inicial y final se obtiene el CO₂ consumido. La respiración basal se puede calcular mediante la ecuación (4).

$$R_{basal} = \frac{M_c \cdot (V_b - V_m) \cdot C_{n_{HCl}}}{m_b \cdot t \cdot 2} \times 1000 \quad (4)$$

Donde:

R_{basal} = Respiración basal de la biomezcla en unidades de $\frac{mg_c}{g_{suelo} \cdot h}$

M_c = Masa molar del carbono = 12,01 g/mol.

V_b = Volumen promedio de la disolución de HCl 0,23540 mol/L consumido por el blanco en litros.

V_m = Volumen promedio de la disolución de HCl 0,23540 mol/L consumido por la muestra en litros.

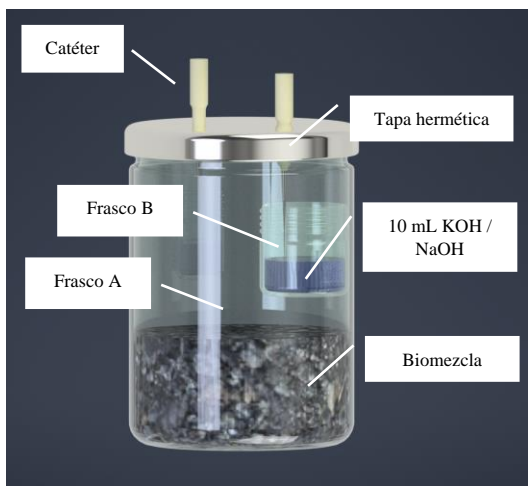
$C_{n_{HCl}}$ = concentración real de la disolución de HCl utilizada = 0,23540 mol/L.

m_b = masa de la biomezcla seca colocada dentro del sistema biométrico en gramos.

t = tiempo de incubación en horas

Se tomaron 10 g de cada biomezcla y se colocó en un frasco de vidrio de 350 mL (**Figura 3 a - frasco A**), dentro de este, también se colocó de forma flotante un frasco de 50 mL sin tapa (**Figura 3 a - frasco B**) conteniendo un volumen de 10 mL de una disolución de NaOH 0,55083 mol/L, este frasco B permanece colgado dentro del frasco A por medio de alambres de cobre que son sostenidos desde la tapa. El frasco A se tapó y selló con papel Parafilm para evitar entrada o salida de aire. En la tapa del frasco A,

se insertaron 2 catéteres, uno para extraer el líquido del frasco B y otro para airear el sistema cada vez que se realizó la toma de muestra, estos catéteres permanecen sellados garantizando un sistema aislado, así todo el CO₂ es capturado y cuantificado. La **Figura 3 a)** muestra el detalle de los componentes de los frascos biométricos para la captura de CO₂ producido en la biomezcla, mientras que la **Figura 3 b)** muestra los frascos del ensayo en ejecución.



a) Diseño de sistema biométrico para cuantificación de respiración mediante captura de CO₂³.

b) Sistema Biométrico en ejecución de ensayo de respiración y mineralización.

Figura 3. Sistema biométrico para cuantificación de CO₂ en ensayo de respiración y mineralización.

Los tres ensayos de la fase screening (fase I) posteriores son:

3.2.1.1.2. Ensayo de mineralización

Se determinó la capacidad, por biomezcla, de mineralización de la molécula clorpirifós cuantificando la producción de ¹⁴CO₂ en sistemas biométricos (véase **Figura 3**). Estos sistemas constan de un frasco A de vidrio transparente de 400 mL con tapa metálica de cierre roscado, y un frasco B de 50 mL colgando en el interior del A, sujetado por alambres de cobre en su parte superior. En la tapa del sistema se colocan 2 catéteres, uno para aireación luego de la toma de muestras, y otro para agregar o coleccionar KOH

³ La disolución contenida en el frasco B corresponde a NaOH para el ensayo de respiración y KOH para los ensayos de mineralización.

cada día de muestreo, el KOH funciona como trampa para capturar $^{14}\text{CO}_2$. Para cada muestra se pesan 50 g de biomezcla y se colocan dentro de los frascos biométricos (por triplicado), estos son inoculados con un cóctel de plaguicidas a una concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y Clorpirifós radiomarcado (^{14}C -CLP - 5000 dpm g^{-1}) a una actividad de 5000 dpm, cada uno en el frasco A homogeneizando manualmente, además, un segundo sistema por biomezcla por triplicado como control (sin plaguicidas). Finalmente, se obtuvo un total de 6 frascos por biomezcla, es decir, 18 frascos biométricos para el total del experimento. En el frasco B se agregaron 10 mL de KOH 0.25 M.

Este experimento se realizó para dos casos de estudio: 1) Mineralización en sistemas biométricos inyectados únicamente con clorpirifós $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y 2) El descrito con inyección del coctel de plaguicidas⁴, incluido el clorpirifós, cada molécula a una concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Las lecturas de los ensayos fueron realizadas por el Laboratorio de Aplicaciones Isotópicas y Metabolismo de Contaminantes (LAIMEC), el cual es el laboratorio autorizado por el CICA para este tipo de ensayos y que cumple con toda la normativa de seguridad radiológica requerida. Para esto se tomó un volumen de 8 mL de líquido centelleante (Ultima Gold, Perkin Elmer) en viales de vidrio (La actividad de los viales únicamente con este coctel fue medida primeramente para utilizar su valor como blanco en la estimación de los resultados), luego, se agregó una alícuota de 2 mL de la solución de KOH de la muestra a medir (véase

Figura 4D). Finalmente se determinó la actividad de $^{14}\text{CO}_2$ utilizando el equipo contador Tri-Carb de Perkin Elmer (véase

Figura 4F). La actividad de $^{14}\text{CO}_2$ emitido en el sistema (mineralizado) y la cantidad inicial de ^{14}C -CLP se utilizaron para calcular el porcentaje de plaguicida mineralizado.

⁴ Los cálculos de volúmenes o masas a tomar por producto formulado (plaguicida en presentación comercial) para la elaboración del coctel de contaminantes se realizó mediante una herramienta programada en Python 3.9 específicamente para este proyecto. Puede consultarse los resultados de los cálculos en el anexo A.



A) Set de muestras en sistemas biométricos



B) Extracción de CO₂ capturado con jeringas de vidrio.



C) Almacenamiento de CO₂ capturado (disolución de KOH)



D) Alícuota de KOH más líquido centelleante



E) Preparación de muestras para lectura de dpm.



F) Tri-Carb de Perkin Elmer: Lectura (dpm) de muestras.

Figura 4. Etapas de la ejecución del ensayo de mineralización, extracción y lectura de muestras.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo mediante código fuente en lenguaje de programación Python 3.9 específicamente diseñado para este ensayo. Finalmente, se realizó un análisis de varianza con prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos (biomezclas).

3.2.1.1.3. Ensayo de degradación

Se utilizaron muestras de biomezcla de 5.00 g dentro de tubos de polipropileno de 50 mL con tapa de rosca para centrífuga. A cada muestra se le agregó un cóctel de plaguicida a una concentración⁵ de 30 mg·kg⁻¹, se homogeneizó de forma manual y se incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en una cámara oscura durante 30 días. La extracción de las muestras se realizó los días 0, 2, 6, 9, 15, 21 y 30. En total se obtuvo 3 muestras por día por biomezcla para un total de 63 muestras. La lectura del ensayo de degradación fue realizada por el Laboratorio de Análisis de Plaguicidas y Compuestos Orgánicos (LAPCO).

⁵ Esta concentración se fijará por cada uno de los ingredientes activos de los formulados en estudio.



A) Tubos de polipropileno de 50 mL con tapa de rosca para centrifuga.

B) Set de muestras para ensayo de degradación.

C) Coctel de plaguicidas para inyección de muestras.

Figura 5. Muestras de biomezclas en tubos para centrifuga y coctel de plaguicidas.

Para el análisis de resultados, se procesaron las muestras con un código programado en Python 3.9, para lo cual, se realizó limpieza de datos, cálculos de promedios, desviaciones estándar, ajuste a modelo de decaimiento exponencial de primer orden de tres parámetros (ecuación (5)) o simple modificada (ecuación (6)), según mostraron los mejores resultados de ajuste. Esto permitió representar la degradación mediante un modelo matemático que facilita, no solo el cálculo de la vida media del plaguicida sino también la degradación en cualquier tiempo t . Se utilizó estos datos para determinar el tiempo de duración del ensayo de optimización en la fase siguiente del proyecto.

$$y(t) = y_0 + a \cdot e^{-b \cdot t} \quad (5)$$

$$y(t) = a \cdot e^{\left(\frac{b}{t+c}\right)} \quad (6)$$

Finalmente, se ejecutó un análisis de varianza con prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para analizar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de degradación final, tanto entre tiempos como entre tratamientos.

3.2.1.1.4. Ensayo de ecotoxicidad

Para la preparación de las muestras, se inyectó a 300 g de cada una de las biomezclas un cóctel de plaguicidas para una concentración final de $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Se almacenó el set de muestras en una cámara oscura a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. La extracción de las muestras se realizó los días 0, 15 y 30 recolectando muestras de 100 g por día y llevando a congelación para su posterior extracción de elutriados. Para la extracción de elutriados, se descongelaron las muestras para ser utilizadas según el procedimiento del Protocolo “*IT-20 Preparación de elutriados de sedimentos para ensayos de ecotoxicidad*” del CICA, donde se tomó $10 \pm 0,5 \text{ g}$ de muestra y se colocó dentro de un tubo plástico, se añadió 40 mL de agua reconstituida sin suplementos y se agitó a 2500 rpm por 1 h, luego, se llevó a centrifugar durante 5 min a 3500 rpm. El sobrenadante fue decantado en frascos plásticos de 100 mL y llevados a congelación para su posterior uso en los ensayos de ecotoxicidad. Se muestra el resultado de la extracción de elutriados en la **Figura 6**.



Figura 6. Elutriados para ensayos de ecotoxicidad.

Se realizaron 2 ensayos ecotoxicológicos: “*Cálculo de la concentración efectiva media*” en *Daphnia magna* y “*Cálculo del índice de germinación*” en semillas de lechuga *Lactuca sativa*. El ensayo en *D. magna* es una prueba de inmovilización del macro crustáceo que permite estimar los cambios en la toxicidad de las biomezclas siguiendo el protocolo “*MET-03 Bioensayos de toxicidad aguda con Daphnia magna*”, del laboratorio de ecotoxicología (LET) del CICA. El cual, consiste en exponer una población de

10 individuos de neonatos (individuos menor 24 horas de nacidos) del macro crustáceo *D. magna* a un medio acuoso (20 mL) de una concentración relativa⁶ y conocida de contaminantes por un periodo de 48 horas en un cuarto oscuro.



Figura 7. Neonato 24 horas *D. magna*. Fuente: (Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2021)

Se muestra en la **Figura 8** un ejemplo del set de ensayos de ecotoxicología para el cálculo de la EC_{50} . Cada tratamiento se realizó por triplicado.



Figura 8. Viales de 20 mL de medio contaminado con 10 individuos de *Daphnia* cada uno para estimación de EC_{50} .

Para determinar el rango de concentraciones en las que se encontraría, para cada tiempo de estudio (día 0, 15 y 30), la concentración a la cual, al menos, el 50% de los individuos sufrirían inmovilización, se

⁶ Una concentración relativa del 100% indica que el medio se encuentra a un 100% v/v del elutriado. Como se desconoce la concentración de los plaguicidas en el elutriado una vez extraído de la matriz (biomezcla), se utilizó un análisis de la EC_{50} con respecto a una concentración del elutriado concentrado disuelto en agua.

realizó un ensayo preliminar, así definir las concentraciones del ensayo real. Del ensayo preliminar se obtiene las concentraciones mostradas en la **Tabla 3** por cada tiempo:

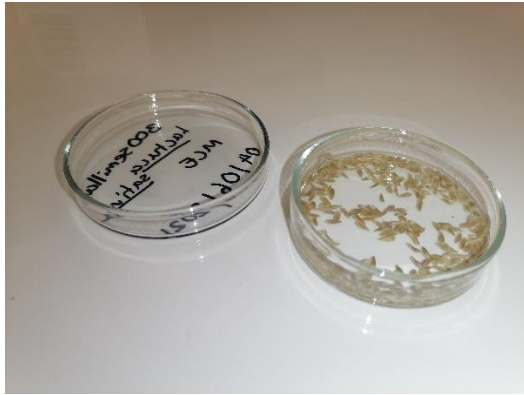
Tabla 3. Concentraciones utilizadas para el ensayo de ecotoxicología con *Daphnia magna*.

Día 0	Día 15	Día 30
1%	50%	50%
0.8%	25%	25%
0.64%	12.5%	12.5%
0.512%	6.25%	6.25%
0.41%	3.125%	3.125%
-	1.563%	1.563%

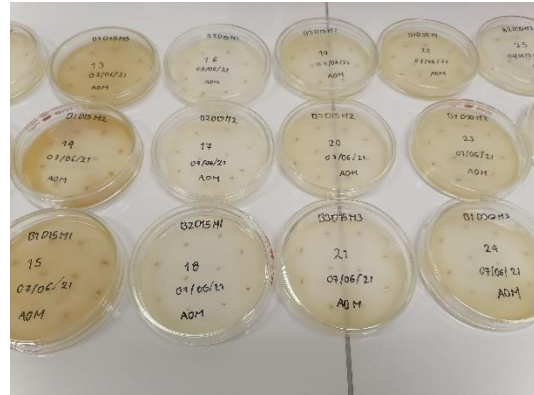
Cumplidas las 48 h, se cuantificó la cantidad de individuos inmovilizados o muertos para determinar, finalmente, la concentración efectiva media (EC₅₀). El análisis de los datos se realizó utilizando un código programado en lenguaje Python 3.9 específicamente para el procesamiento de los datos de este ensayo, en el cual, se ajustan los resultados de inmovilización al modelo de Hills de la ecuación (7) para el cálculo de la EC₅₀:

$$y = y_{min} + \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{Hill_{coef}}} \quad (7)$$

Para el ensayo de germinación, se siguió el procedimiento “*MET – 06 Bioensayo de fitotoxicidad con Lactuca sativa*” del LET, donde se expuso por tratamiento (elutriado de biomezcla por tiempo de muestra) una población de 10 individuos (semillas de lechuga) previamente desinfectados (con hipoclorito de sodio 4% v/v) durante un periodo de 5 días (en un cuarto oscuro) para evaluar el efecto de la toxicidad del medio contaminado sobre la germinación de las semillas. Cada semilla se colocó, dentro de una placa Petri, a una distancia de 1 cm con respecto a las otras, sobre un papel filtro, se humedeció uniformemente con 5 mL del elutriado (medio contaminado) y se selló con papel Parafilm. La germinación se cuantificó midiendo la longitud de la raíz de las semillas germinadas y comparándolas con la longitud de las raíces de las muestras “blancos” (sin plaguicidas). La **Figura 9** muestra los sistemas montados para germinación de semilla.



A) Desinfección de las semillas



B) Lotes de población de semillas en ensayo de germinación expuestas al contaminante.

Figura 9. Bioensayo de germinación de semillas de lechuga *Lactuca sativa*.

El análisis de los datos se realizó mediante un código en Python 3.9 específicamente programado para el ensayo (ver código fuente en la sección de anexos 8.4), donde se estimó la germinación de las semillas, la elongación de las raíces y el índice de germinación mediante las ecuaciones (8), (9) y (10).

$$GS = \frac{S_{muestra}}{S_{control}} \times 100 \quad (8)$$

$$ER = \frac{LR_{muestra}}{LR_{control}} \times 100 \quad (9)$$

$$IG = \frac{GS \times ER}{100} \quad (10)$$

Donde:

GS = Porcentaje de germinación de las semillas

$S_{muestra}$, $S_{control}$ = Número de semillas germinadas de la muestra y del control, respectivamente.

ER = Elongación de raíz en centímetros

$LR_{muestra}$, $LR_{control}$ = Promedio de longitud de raíz de semillas muestra y control, respectivamente.

IG = Índice de germinación

Para ambos ensayos, *D. magna* y germinación de semillas de lechuga, se realizó un análisis de varianza con prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$ para determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos y los tratamientos.

3.2.2. *Objetivo 2: Optimizar la composición de la biomezcla para maximizar el rendimiento de eliminación de plaguicidas.*

3.2.2.1. *Selección de biomezcla para optimización*

De los resultados de la fase screening, se realizó un análisis de rendimiento, en el cual, se identificó aquella biomezcla que, por ensayo, obtuvo los mejores resultados de degradación, mineralización y ecotoxicología. El análisis se llevó a cabo tomando en cuenta las curvas de degradación obtenidas y ajustadas al modelo de decaimiento exponencial, las curvas de mineralización resultantes y los índices de germinación y EC_{50} . Se estimó, además, la existencia de diferencias significativas entre los datos por día y por biomezcla mediante un análisis de varianza con prueba de tukey con un margen de confianza del 95%, $\alpha = 0,05$.

3.2.2.2. *Optimización de la biomezcla.*

Para la biomezcla con mejores resultados de degradación, mineralización y ecotoxicología, se realizó un ensayo de optimización, el cual, consistió en determinar las proporciones de compuestos que generan mayor rendimiento en la eliminación de los plaguicidas. Para esto, se empleó un diseño experimental compuesto central (CCD, por sus siglas en inglés) en el que se analizó nueve distintas proporciones volumétricas según se detalla en la **Tabla 4** y la **Figura 10**.

Este ensayo de optimización analizó el efecto de 2 factores (A: % Compost y B: % Porcentaje de suelo) sobre una respuesta (Degradación de los contaminantes). El diseño del experimento se realizó con el software *Expert Design 11*, tomando como muestra central (0, 0) la proporción de biomezcla 2:1:1 (misma empleada para los ensayos de la fase 1).

Tabla 4. Composición de las biomezclas según el CCD

Punto	A: Compost	B: Suelo	Compost v/v	Suelo v/v	Fibra de coco v/v
1	0,00	-1,41	25,0%	0,0%	75,0%
2	0,00	0,00	25,0%	25,0%	50,0%
3	-1,00	-1,00	7,3%	7,3%	85,4%
4	1,00	1,00	42,7%	42,7%	14,6%
5	1,00	-1,00	42,7%	7,3%	50,0%
6	0,00	1,41	25,0%	50,0%	25,0%
7	1,41	0,00	50,0%	25,0%	25,0%
8	-1,41	0,00	0,0%	25,0%	75,0%
9	-1,00	1,00	7,3%	42,7%	50,0%

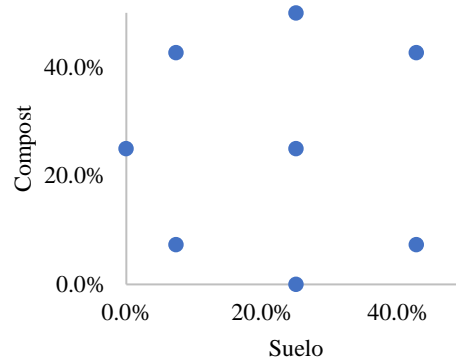


Figura 10. Distribución espacial del CCD.

El ensayo de optimización se compone de 9 “puntos” por cada unidad de ensayo⁷, de las cuales, el punto central compuesto de 5 réplicas por unidad de ensayo (5 para blancos, 5 para el día 0 y 5 para el día final: 15 muestras), los otros 8 puntos con 2 réplicas por unidad de ensayo, para sumar un total de 48 réplicas. Al final del ensayo se obtuvo 63 muestras, incluidos los blancos.

⁷ Se cuenta con tres unidades de ensayo: 1) blancos, 2) día 0 y 3) día final.

Cada muestra se montó siguiendo la metodología descrita en el ensayo *screening* (Degradación). La lectura del ensayo de degradación fue realizada por el Laboratorio de Análisis de Plaguicidas y Compuestos Orgánicos (LAPCO).

Los resultados finales se procesaron en el software *Expert Design 11* para generar una superficie de respuesta ajustada al mejor modelo matemático, y determinar la relación de los compuestos de la biomezcla con mejores resultados de eliminación:

3.2.2.3. *Análisis ponderado de factores*

El software utilizado para el diseño experimental de la fase 2 permitió analizar los resultados del ensayo tanto de forma “plana”, en la cual, todos los factores tienen el mismo peso sobre el ensayo, y, en efecto, sobre la solución optimizada final, como de una forma “ponderada”, asignando pesos a cada uno de los resultados, según su relevancia en el experimento, los cuales, fueron definidos por el analista. Finalmente, bajo distintos escenarios, se obtuvo múltiples soluciones optimizadas guiadas por la ponderación fijada.

Para no limitar la selección del resultado de optimización solo a las soluciones por análisis plano, se agregaron “pesos” a cada uno de los resultados iniciales para que el programa los tomara en cuenta al generar las soluciones optimizadas y, observar nuevas tendencias. Así, los pesos se distribuyeron bajo 4 criterios (categorías) distintos (Sin diferenciar entre familias):

- **Por el porcentaje de degradación (eliminación) máximo obtenido:** Mayor ponderación para aquellos con mayor porcentaje de degradación en el análisis plano.
- **Por la persistencia reportada en la “*Pesticide Properties Database PPDB*”:** Mayor ponderación para aquellos con mayor persistencia.
- **Por la Toxicología humana aguda según la OMS:** Mayor ponderación para aquellos con mayor toxicidad.
- **Por la Ecotoxicología aguda.** Mayor ponderación para aquellos con mayor ecotoxicidad.

Se muestra en la **Tabla 5**, los pesos finales utilizados para el análisis de los resultados de optimización.

Tabla 5. Pesos Asignados según categoría e impacto o peligro asociado.

Plaguicida	Familia	Eliminación Máxima Obtenida	Persistencia	Ecotoxicidad	Toxicidad Humana
Fluazifop-p-butil	Ariloxifenoxipropionato	+++++	++	+++++	+++
Carbendazim	Benzimidazol	++++	++++	+++++	++
Tiofanato de metilo	Benzimidazol	+++++	++	+++++	++
Oxamil	Carbamato	+++++	++	++++	+++++
Imidacloprid	Neonicotinoide	+++	+++	+++++	++++
Clorpirifós	Organofosforado	++	+++++	+++++	++++
Epoxiconazole	Triazol	++	+++	++++	+++
Hexaconazole	Triazol	++	+++	++++	++
Propiconazole	Triazol	++	++++	+++++	++++
Tebuconazole	Triazol	++	+++++	++++	+++
Triadimefón	Triazol	++	++	++++	+++
Triadimenol	Triazol	N/C	N/C	N/C	N/C

* N/C = No Contemplado dentro del análisis

De las múltiples soluciones ponderadas optimizadas obtenidas, se realizó un análisis de varianza con prueba de tukey $\alpha = 0,05$ entre las soluciones por categoría y compuestos (compost y suelo) para encontrar si existen diferencias estadísticamente significativas y definir un resultado final optimizado para el diseño de la biocama.

3.2.2.4. Degradación post-optimización

Posterior al análisis de varianza, se decidió proceder con un segundo ensayo de degradación para comparar la eliminación de las principales tendencias observadas: *Tendencia 1*: 29% Compost, 7,3% Suelo y *Tendencia 2*: 11% Compost, 7,3% Suelo (con sus respectivos porcentajes de fibra de coco); con muestreo los días 0, 1, 2, 5 y 20. Este ensayo extraordinario de degradación se realizó según la metodología de la fase 1 screening (degradación).

Los resultados fueron comparados mediante un análisis de varianza con prueba de Tukey y confiabilidad del 95%.

3.2.3. *Objetivo 3: Realizar un diseño dimensional de un sistema de biopurificación de tipo biocama, ajustado a un modelo de decaimiento exponencial.*

3.2.3.1. *Diseño del biobed*

Para el diseño dimensional del biobed se realizó, primeramente, un ajuste de la curva de decaimiento exponencial simple de 3 parámetros, el cual, contempla la variación en el tiempo de la concentración total del coctel de plaguicidas (sumatoria de concentraciones). Con el modelo de ajuste, el caudal de vertido máximo estimado Q_{VME} (valor estimado del volumen empleado en campo por los caficultores para el triple lavado de los equipos de aplicación en un periodo determinado), y el Tiempo de Retención Hidráulico t_{RH} con la ecuación (11) donde V representa el volumen mínimo requerido, se calculó las dimensiones mínimas de la biocama.

$$t_{RH} = \frac{V}{Q_{VME}} \quad (11)$$

Para una biocama de geometría rectangular, el tiempo de retención hidráulica se puede reescribir como se detalla en la ecuación (12).

$$t_{RH} = \frac{(l \cdot m) \times h}{Q_{VME}} \quad (12)$$

Donde l y m corresponden a los lados del rectángulo que forma la superficie de la biocama y h su profundidad.

De la ecuación (5) se puede estimar que la disminución de la concentración inicial $y(t = 0)$ corresponde a:

$$y(t = 0) = y_i = y_0 + a \quad (13)$$

Por tanto, el 50% de la concentración inicial (y_i) alcanzada en un tiempo medio (t_{50}) corresponde a:

$$y(t = t_{50}) = \frac{y_i}{2} = y_{50} = \frac{y_0 + a}{2} \quad (14)$$

Ahora, reescribiendo la ecuación (5) para $y(t = t_{50})$:

$$y(t = t_{50}) = y_{50} = y_0 + ae^{-b \cdot t_{50}} \quad (15)$$

El Tiempo de Retención Hidráulica (t_{RH}) se definió como el tiempo mínimo requerido para alcanzar, al menos, la mitad de la concentración inicial total del coctel de plaguicidas en estudio, es decir, el caso en el que $t_{RH} = t_{50}$. A este tiempo en que la concentración inicial del plaguicida se disminuye en un 50% se le llama vida media del plaguicida DT_{50} . Quedando la ecuación (12), como:

$$t_{RH} = t_{50} = DT_{50} = \frac{(l \cdot m) \times h}{Q_{VME}} \quad (16)$$

Ahora, conociendo el DT_{50} , se puede reescribir la ecuación (15):

$$y_{50} = y_0 + ae^{-b \frac{(l \cdot m) \times h}{Q_{VME}}} \quad (17)$$

De este modo, se pueden igualar las ecuaciones (14) y (17) para obtener una igualdad en términos de parámetros conocidos arrojados por el modelo del ajuste de curvas:

$$\frac{y_0 + a}{2} = y_0 + ae^{-b \frac{(l \cdot m) \times h}{Q_{VME}}} \quad (18)$$

Al despejar la ecuación (19) en términos del área superficial de la biocama ($l \times m$) se puede decir que:

$$l \times m = \ln \left(\frac{2a}{a - y_0} \right) \times \frac{Q_{VME}}{b \times h} \quad (19)$$

Finalmente, fijando una profundidad de biocama de $h = 80$ cm tal que no se favorezca un entorno anoxigénico en la profundidad del sistema y, conocidos los parámetros a, y_0, Q_{VME} , se calculó el área mínima requerida del BPS. El diseño 3D a escala se realizó utilizando el software Autodesk Inventor 2022 considerando cada uno de los accesorios que componen el sistema final.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase 0

4.1.1. Respiración de las biomezclas

La actividad metabólica, medida en términos de miligramos de CO₂ producidos por kilogramo de biomezcla por hora, fue máxima para la biomezcla con cascarilla de café y mínima para fibra de coco, mostrando, además, diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tres biosistemas (véase la **Figura 11**). La biomezcla con CC presentó una respiración basal 85,6% mayor a la FC y 62,5% superior en comparación con la CA. Esto se tomó como un indicador preliminar que sugería, como hipótesis inicial, que la biomezcla con CC generaría mejores resultados de eliminación de contaminantes. Dicha hipótesis está basada en que el sistema se encontraba mayormente activo con lo que respecta a consumo de O₂ y C presente en la materia orgánica de la matriz.

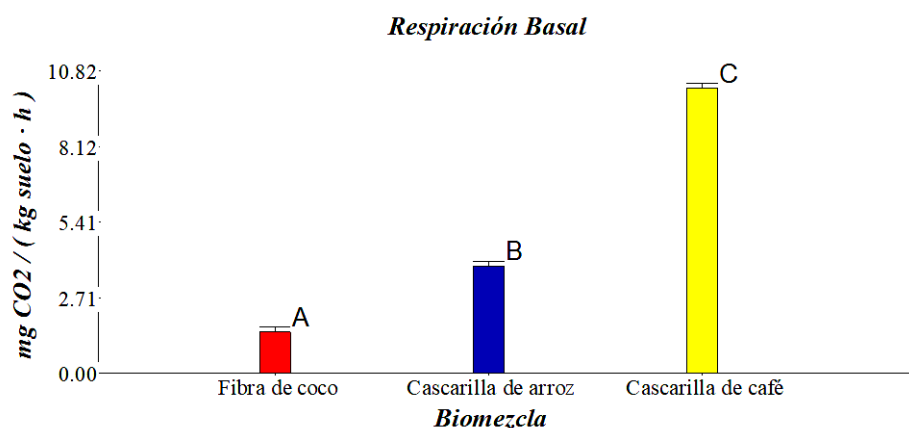


Figura 11. Respiración basal de las biomezclas determinado en un plazo de 24 h. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.

La hipótesis inicialmente propuesta se replanteó en los ensayos de la fase I del proyecto, donde se cuantificó la capacidad de cada una de las biomezclas para eliminar (parcial o completamente) los plaguicidas presentes y detoxificar la matriz contaminada.

4.2. Fase 1

4.2.1. Mineralización de Clorpirifós

La mineralización del clorpirifós se cuantificó para las 3 biomezclas bajo dos escenarios, o tratamientos distintos: **1. Todos los plaguicidas presentes en la matriz** y **2. Únicamente el clorpirifós**. De los resultados obtenidos, para ambos escenarios y durante los primeros 10 días, se advierte un comportamiento similar entre cada una de las biomezclas, sin embargo, a partir de este periodo, la tasa de crecimiento de la curva de eliminación acumulada, para la CC y la CA disminuye mientras que, para la FC, se mantiene dentro de un rango constante, tal que, para el día 30, el rendimiento de mineralización de la FC es mayor en comparación con las otras biomezclas en cada uno de los escenarios. Las biomezclas que contienen FC alcanzan, finalmente, una mineralización máxima del $17,65 \pm 6,20\%$ y $15,00 \pm 6,21\%$ para el día 45 en los tratamientos 1 y 2, respectivamente (véase la **Figura 12**). Otros estudios han determinado mineralización máxima de CLP de 17,6% y 10,36% en 60 días para una biomezcla de fibra de coco, compost y suelo (45:13:42 v/v) donde el único contaminante presente es el clorpirifós (Castillo-González et al., 2017; Huete-Soto et al., 2017). Coppola et al. (2007) demuestran una mineralización máxima del 10,1% en 45 días utilizando una biomezcla de paja, suelo y turba (2:1:1 v/v).

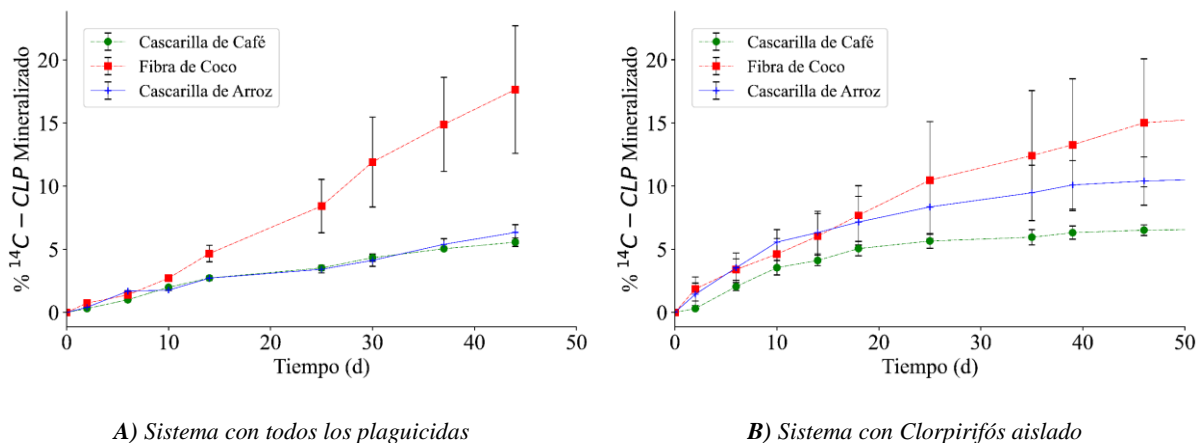


Figura 12. Mineralización acumulada porcentual de ^{14}C -Clorpirifós en cada biomezcla sin presencia de otros plaguicidas (derecha) y clorpirifós aislado (izquierda).

4.2.1.1. Análisis de varianza

De la mineralización máxima final obtenida, correspondiente al periodo total de 45 días, se encontró que los mejores rendimientos fueron arrojados por la biomezcla con FC, mostrando, además, diferencias estadísticamente significativas con respecto a las otras biomezclas (véase la **Figura 13**).

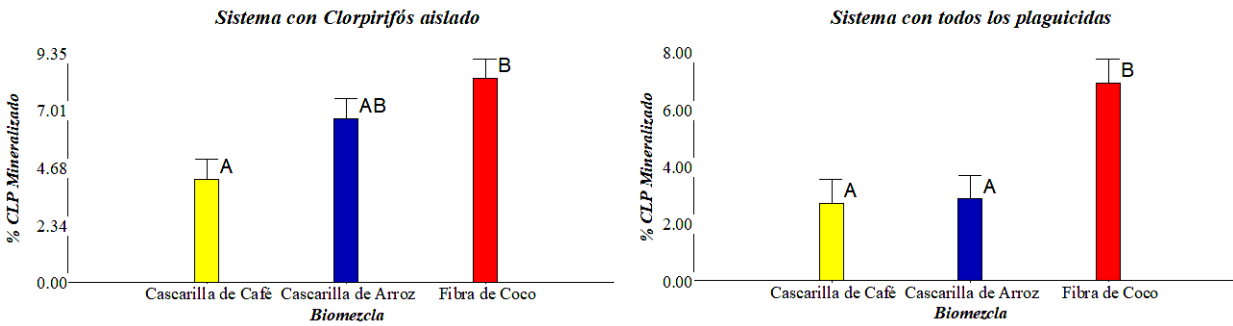


Figura 13. Análisis de varianza del porcentaje de mineralización entre biomezclas para el día 45 por tratamiento. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.

Para determinar si existió diferencias entre los resultados de mineralización entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza entre escenarios por tipo de biomezcla. Se encontró finalmente que, a pesar de que el comportamiento de mineralización representado en la **Figura 12**, en los dos casos, no es precisamente igual, no existen diferencias estadísticamente significativas (véase la **Figura 14**). Es decir, los resultados de mineralización de clorpirifós no varía significativamente entre un sistema en el que se encuentra la molécula como único agente contaminante, y en otro medio en el que están presentes los demás plaguicidas en estudio.

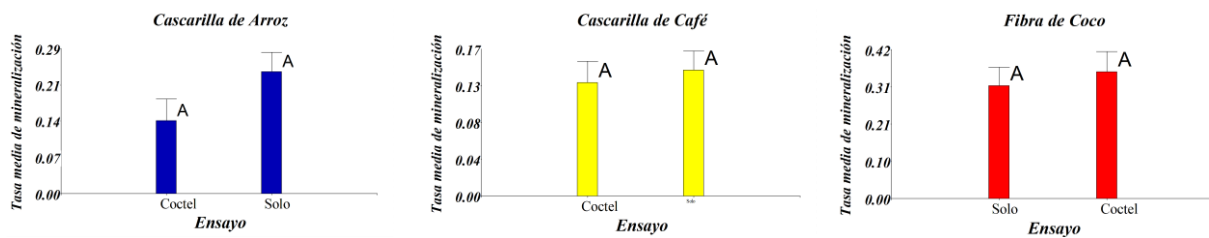


Figura 14. Análisis de varianza entre tasa media de mineralización entre ensayos por tipo de biomezcla, Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes

4.2.2. Degradación de Plaguicidas

En el análisis general de las curvas de degradación ajustadas, se puede advertir que, comparando los rendimientos de eliminación por cada una de las moléculas en estudio, la biomezcla con FC (curva roja) presenta los mejores resultados relativos a la CA y CC (véase la **Figura 15** y **Figura 16**), donde se puede observar que la curva permanece siempre por debajo de los otros tratamientos indicando que, por unidad de tiempo, se obtiene una degradación mayor. Ahora, para la familia de los triazoles (Epoconazole, Hexaconazole, Propiconazole, Tebuconazol y Triadimefón) a excepción del Triadimenol, en el mejor de los escenarios (que corresponde a la biomezcla de FC), se puede advertir que la mayor fracción de eliminación de los contaminantes ocurre durante los primeros 3-4 días, sin embargo, para el día 5, la tasa de eliminación (pendiente de la curva) comienza a disminuir hasta alcanzar valores cercanos a cero, ocasionando que la curva tienda a valores constantes conforme aumenta el tiempo. Es decir, la capacidad degradativa de la biomezcla se ve reducida superando los 5 días, esta reducción puede deberse a cambios físicos dentro de la matriz que inhiben la reacción enzimática en cadena de los microorganismos para degradar los contaminantes, como por ejemplo, cambios en el pH, concentración de la fuente de carbono y humedad (Huang et al., 2018). El caso del triadimenol difiere del comportamiento de los demás triazoles, demostrando un incremento en la concentración conforme aumenta el tiempo, igualmente, durante los primeros 3-4 días, y permaneciendo relativamente constante luego del día 5. Esta acumulación se justifica debido a que el triadimenol es el principal metabolito (o subproducto) del proceso de degradación de la molécula de triadimefón (Hou et al., 2022), siendo así que, conforme se elimina el triadimefón, el triadimenol se acumula.

La eliminación de las moléculas fluazifob-p-butyl, metil tiofanato y oxamilo, muestra resultados muy favorables, alcanzando una degradación máxima en los días 2, 8 y 15, respectivamente. Estas tres moléculas se pueden categorizar como contaminantes de importancia por alta toxicidad humana y ecotoxicidad, siendo que, el carbamato oxamilo posee la mayor toxicidad humana del total de pesticidas en estudio (Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas - Universidad Nacional, 2022).

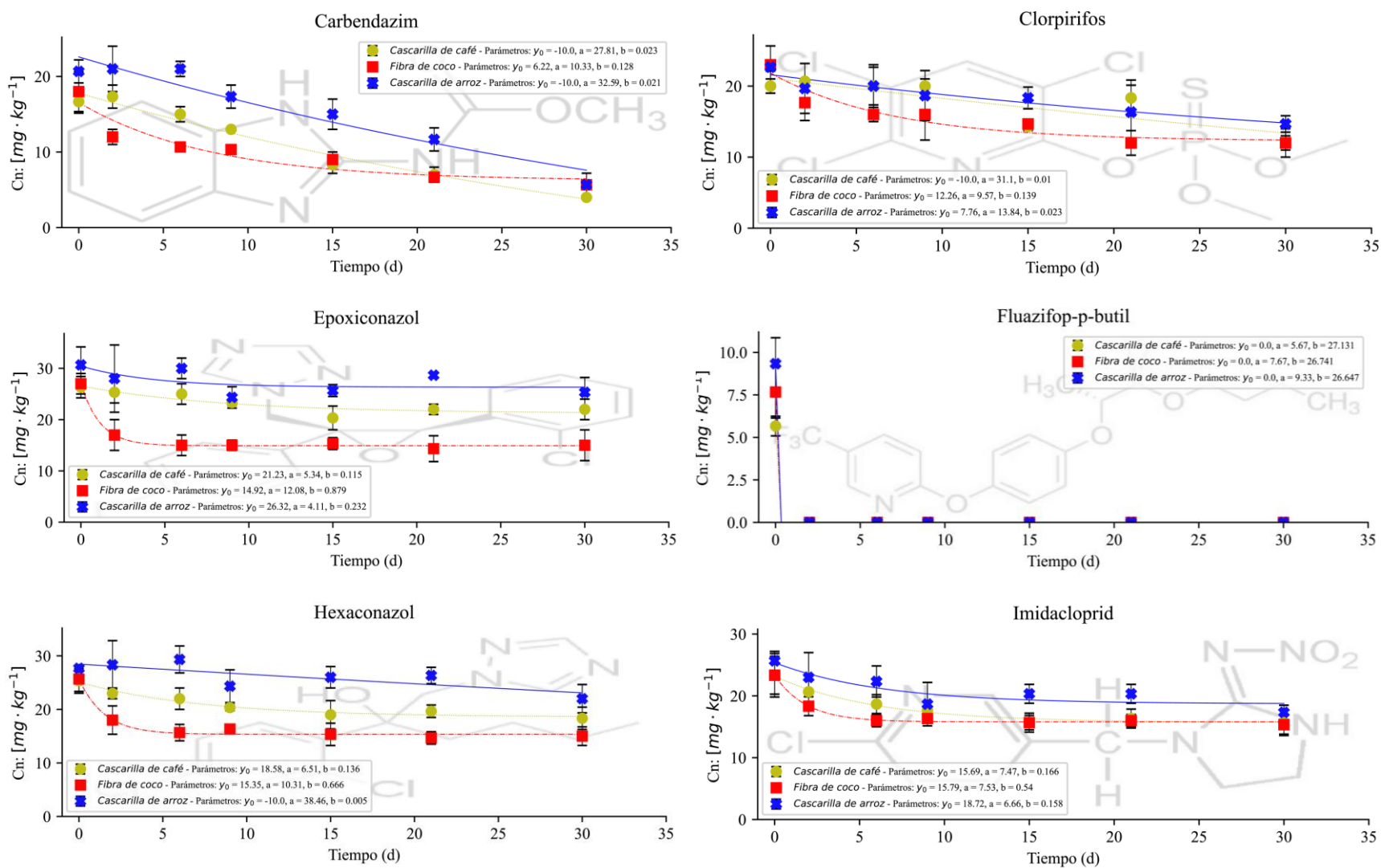


Figura 15. Resultado de degradación comparativa por biomasa para las 12 moléculas de los ingredientes activos de plaguicidas de café en estudio. Parte 1

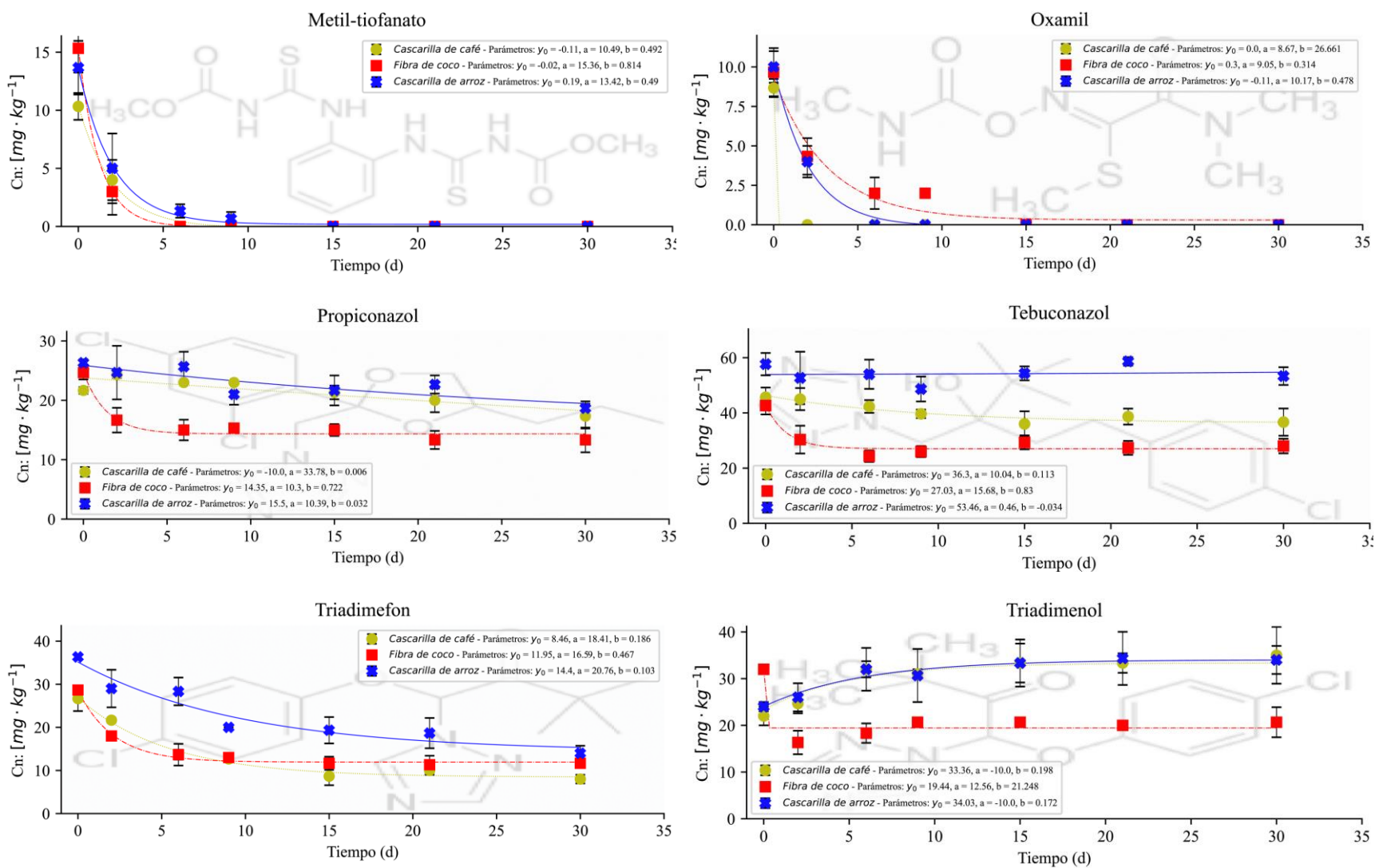


Figura 16. Resultado de degradación comparativa por biomezcla para las 12 moléculas de los ingredientes activos de plaguicidas de café en estudio. Parte 2

Del cálculo de vida media de cada una de las moléculas en estudio, a excepción del caso particular de triadimenol con una vida media negativa (indicando que el plaguicida se acumula dentro del sistema), se evidencia que, dentro del sistema de biodegradación estudiado solo se logró alcanzar la DT_{50} para el 42% de las moléculas estudiadas en un periodo de 30 días (véase la Tabla 6). Los resultados de degradación de los triazoles, a excepción del triadimefón, no muestran una eliminación suficiente para estimar sus vidas medias para ninguna de las biomezclas estudiadas. El caso del triadimefón, en la biomezcla FC, alcanza una DT_{50} de 4,2 días, la cual se encuentra muy por debajo de lo reportado en suelo por Lewis et al. (2016). Este mismo autor indica que la vida media típica en suelo para los triazoles estudiados puede ir desde los 63 días (tebuconazole) hasta los 354 días (epoxiconazole), véase la **Tabla 6**. La degradación de esta familia de plaguicidas utilizando distintos arreglos de biomezclas ha sido estudiada por otros autores: Fogg et al., (2003) determina una vida media para el Epoxiconazole de 61 días empleando una biomezcla de suelo, compost sin turba y paja de trigo (1:1:2 v/v). Por otro lado, Masís-Mora et al. (2019), usando una biomezcla de FC, compost y suelo en la misma proporción que el presente estudio (2:1:1 v/v) ha obtenido una vida media de 187,3 días para hexaconazole. Vidas medias de 160 días para propiconazole y 19 días para tebuconazol fueron alcanzadas por los estudios de Spliid et al. (2006) y Delgado-Moreno et al. (2017), respectivamente. Estas vidas medias obtenidas en otros estudios, a excepción del tebuconazole, se encuentran muy por encima de los 30 días, periodo al cual se valoró en este proyecto, siendo así que es posible que se requiera estudiar en un lapso mayor para conseguir eliminaciones por debajo del 50% de la concentración inicial. Además, factores como la alta concentración inicial por plaguicida (30 mg/kg) y la cantidad de plaguicidas presentes, por encima de 10, en las biomezclas pueden afectar el rendimiento de los microorganismos para degradar este tipo de contaminantes (Chu et al., 2008).

La vida media del carbendazim (de la familia de los benzimidazoles) fue alcanzada en las tres biomezclas estudiadas, siendo la FC quien obtuvo el resultado más favorable (12,6 días) e incluso por debajo de lo reportado en suelos por Lewis et al., (2016). Lescano et al. (2022) reporta una vida media un 46% menor a lo reportado en este estudio (6,8 días) al estudiar su degradación en una biomezcla de rastrojo

de mijo y suelo (1:1 v/v). Otras moléculas lograron reducir el 50% de su concentración inicial en tiempos muy cortos: fluazifob-p-butil obtuvo 0,3 días, siendo un valor muy por debajo a lo reportado en suelos (Badawi et al., 2015; Lewis et al., 2016), metil tiofanato alcanza una vida media de 0,85 días (FC) y el oxamilo 0,3 días (CC) siendo un valor favorable en comparación a la vida media reportada en suelos (5,3 d) por Lewis et al. (2016) y lo reportado por Osman et al. (2009).

Tabla 6. Comparación de vida media (DT_{50}) estimadas en días para cada plaguicida según la biomezcla en estudio y lo reportado en otros estudios en suelo y biomezclas.

Plaguicida	DT ₅₀ Estudio Actual			Reportado en literatura		Eliminación en suelo*			Referencia	
	CA	CC	FC	DT ₅₀	Biomezcla	DT ₅₀ típica	DT ₅₀ Laboratorio (20°C)	DT ₅₀ campo		
Carbendazim	20,71	16,46	12,58	6,8	Rastrojo de Mijo - Suelo	1:1	40	34,3	22	(Lescano et al, 2022)
Clorpirifós	NC	NC	NC	56	FC - Compost - Suelo	2:1:1	386	386	27,6	(Masís-Mora et al, 2019)
Epoconazole	NC	NC	NC	61	Suelo - Compost sin turba - Paja de trigo	1:1:2	354	226	120	(Fogg et al, 2003)
Fluazifob-P-butil	0,3	0,3	0,3	1,1	Suelo	NA	1	3,4	8,2	(Badawi et al, 2015)
Hexaconazole	NC	NC	NC	187,3	FC - Compost - Suelo	2:1:1	191	187	174	(Masís-Mora et al, 2019)
Imidacloprid	NC	NC	NC	83	Rastrojo de Mijo - Suelo	1:1	191	187	174	(Lescano et al, 2022)
Metil Tiofanato	1,44	1,39	0,85	NA	NA	NA	0,5	0,5	2	NA
Oxamilo	1,43	0,3	2,32	3,19	Suelo y estiércol en campo abierto	NA	5,3	5,3	6	(Osman et al, 2009)
Propiconazole	NC	NC	NC	160	Paja de trigo - Musgo - Suelo	2:1:1	71,8	71	35,2	(Spliid et al, 2006)
Tebuconazol	NC	NC	NC	19	Suelo - Vermicompost - Residuos de tomate	1:2:1	63	365	47,1	(Delgado-Moreno et al, 2017)
Triadimefón	18,25	7,2	4,21	NA	NA	NA	26	NA	NA	NA
Triadimenol	-4,59	-3,91	NC	NA	NA	NA	250	136,7	64,9	NA

* Según (Lewis et al, 2016)

4.2.2.1. Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza muestran que la concentración final de los contaminantes dentro de los sistemas difiere entre tratamientos, siendo que la biomezcla FC alcanzó la mayor eliminación (representado por una concentración final menor) de contaminantes con respecto a CC y CA (véase la **Figura 17**).

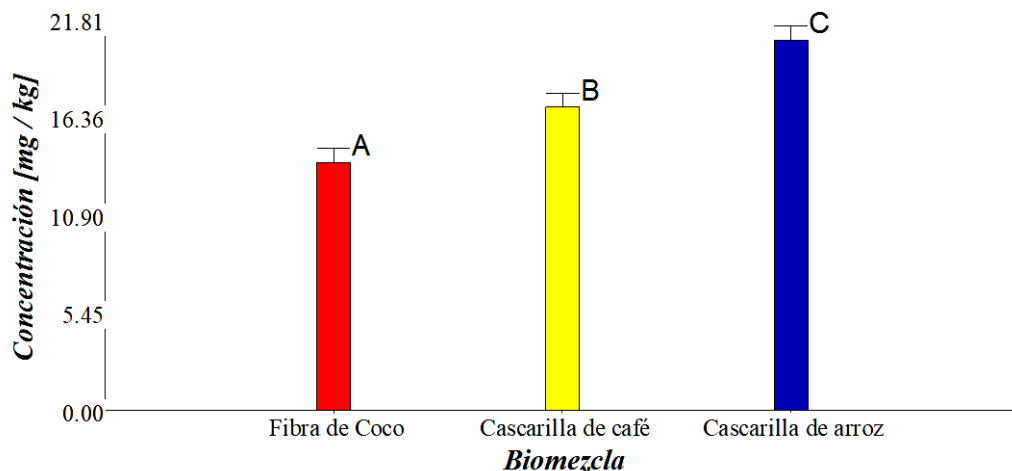


Figura 17. Análisis de varianza con prueba de Tukey para la concentración total promedio en un periodo de 30 días por biomezcla. $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.

La **Figura 18** muestra los resultados del análisis de varianza en la concentración final para cada una de las moléculas por tratamiento (periodo de 30 días), consecuente con los resultados de la **Figura 17**, la biomezcla FC presenta la menor concentración final en el 67% de las muestras cuantificadas (Exceptuando los casos N/D para los cuales la concentración final en todos los tratamientos estuvieron por debajo del límite de cuantificación).

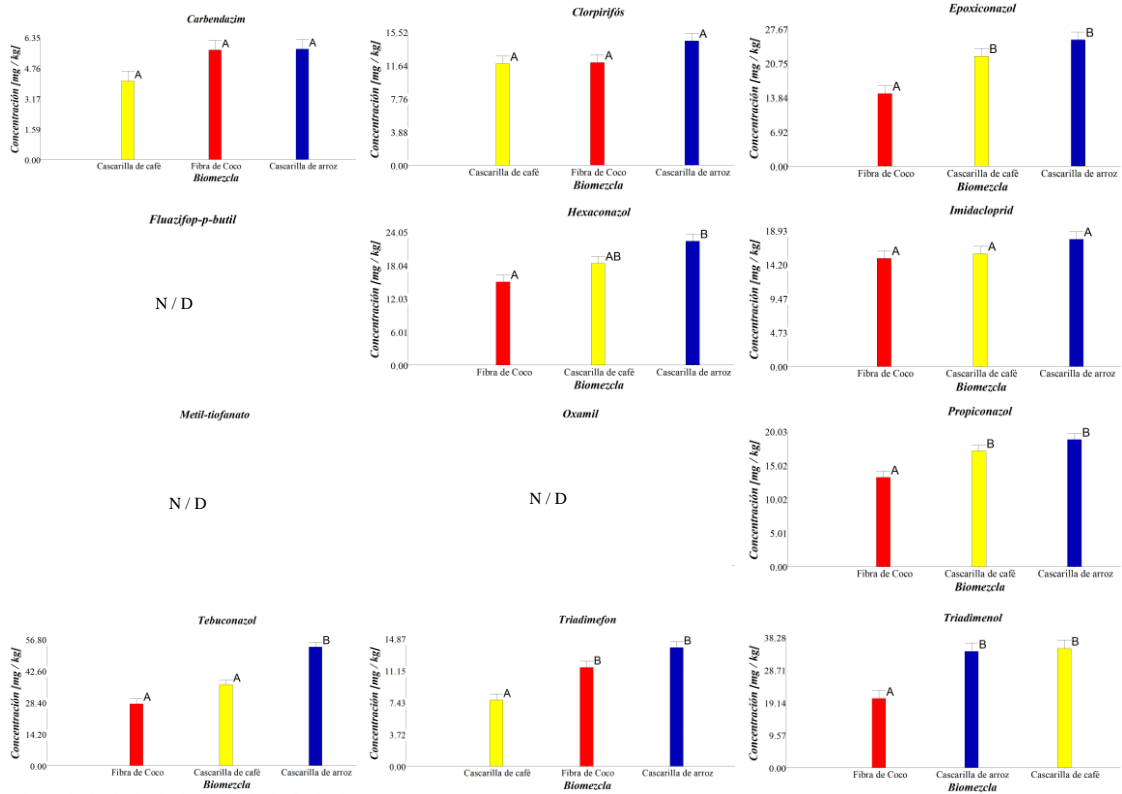


Figura 18. Análisis de varianza de biomezclas por plaguicida para la concentración final obtenida en un periodo de eliminación de 30 días. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes

4.2.3. Ecotoxicidad

4.2.3.1. Ensayo de ecotoxicología en *D. magna*

Se detalla en la **Figura 19** el ajuste de los resultados al modelo de Hills de la ecuación (7). Se observa que el valor de la EC_{50} corresponde al punto de inflexión de la curva, en el cual, se alcanza el valor al que el 50% de la población expuesta sufre de inmovilización o muerte.

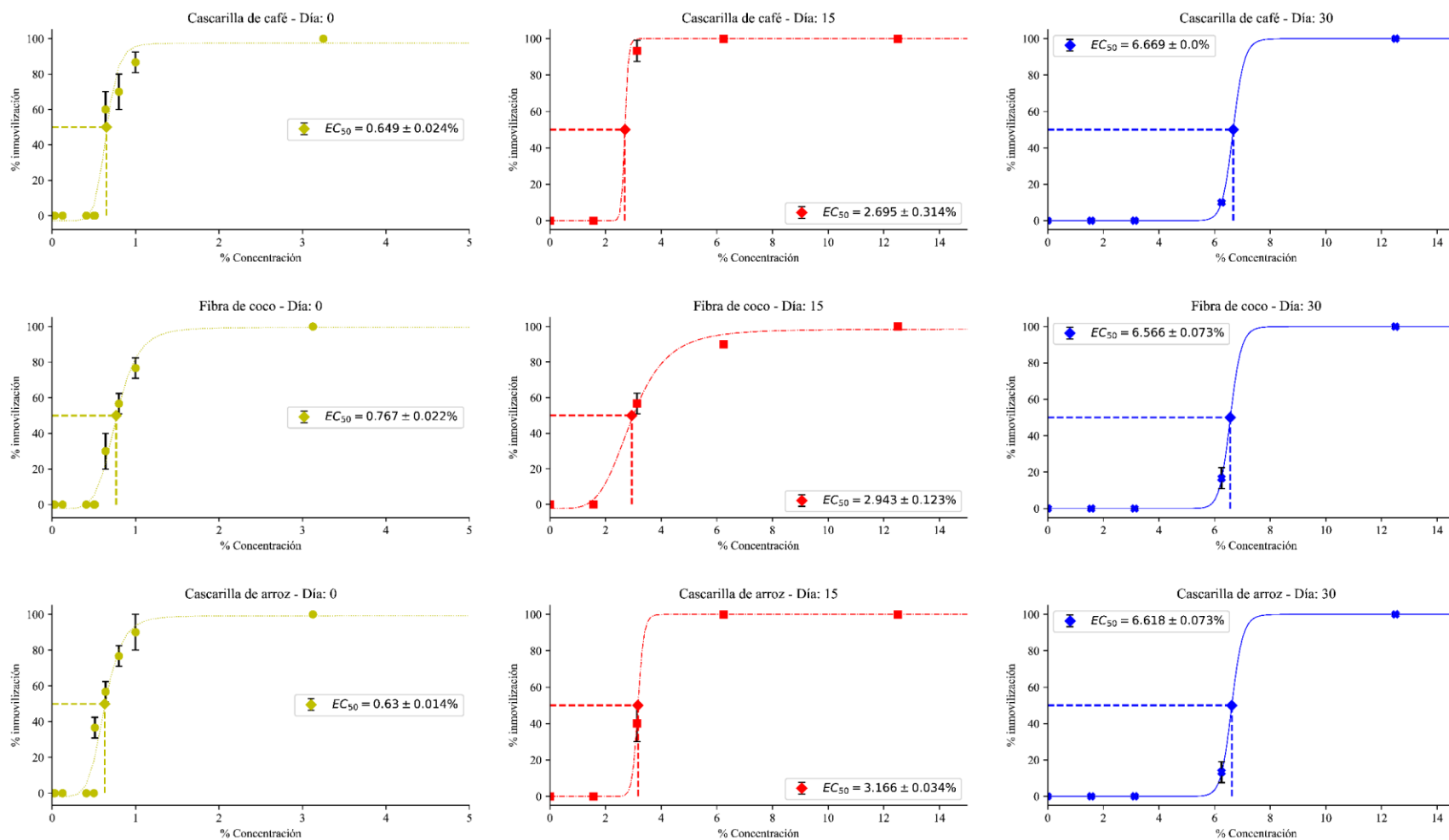


Figura 19. EC₅₀ calculada por día de estudio por biomezcla, ajustada según el modelo de Hills.

Los resultados muestran que la concentración efectiva media EC_{50} aumentó en un 90,3%, 88,3% y 90,5% en las biomezclas con CC, FC y CA, respectivamente en un periodo de 30 días (véase la **Figura 20**). De acuerdo con la **Figura 20**, la reducción continua en la toxicidad (incremento de la EC_{50}) demuestra que para tiempos mayores de tratamiento se favorece el proceso de detoxificación⁸, este comportamiento se ha observado en otro trabajo que estudió la degradación de plaguicidas también contemplados en este proyecto (tebuconazole, carbendazim, triadimenol y epoxiconazole) utilizando una biomezcla de fibra de coco, compost y suelo optimizada en una composición de 45:13:42 v/v (Murillo-Zamora et al., 2017).

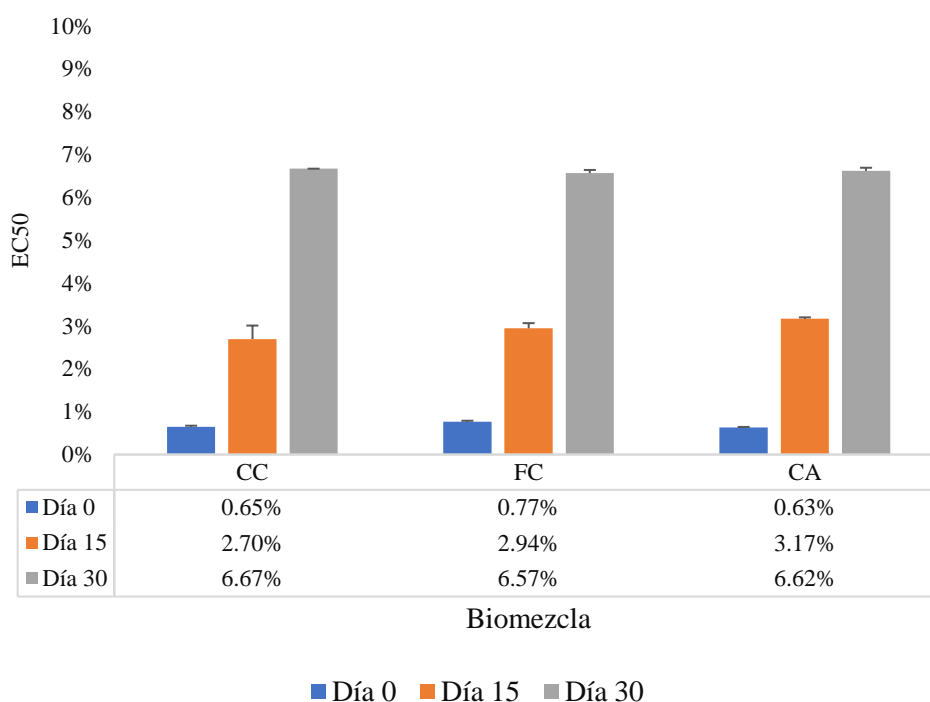


Figura 20. Concentración efectiva media para los días 0, 15 y 30.

5.1.1.1.1. Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza muestran que, para un mismo día de muestreo, a excepción del día 0 (correspondiente al estado inicial del sistema), no existen diferencias estadísticamente

⁸ Debe destacarse que esta reducción en la toxicidad del elutriado tiene lugar en un estudio en el que solo ocurre una única exposición a plaguicidas, es decir, no se ve modificada la concentración inicial del contaminante por adición posterior de plaguicidas.

significativas entre las biomezclas, siendo así que, se considera un comportamiento en la tasa promedio de detoxificación similar entre cada uno de los tratamientos (véase la **Figura 21**).

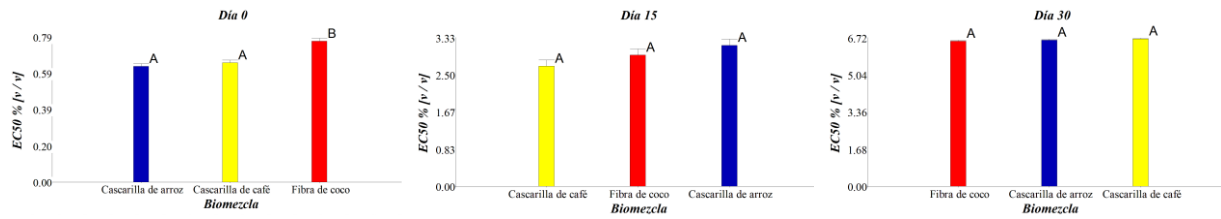


Figura 21. Análisis de varianza de la EC₅₀ por día entre biomezclas. Prueba de Tukey $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes

Por otro lado, el análisis de varianza entre días muestra que existen diferencias significativas en cada una de las biomezclas, indicando que, en efecto, la detoxificación sufre una disminución importante (expresada como un aumento de la EC₅₀) conforme trascurren los días de degradación dentro de cada sistema (véase la **Figura 22**).

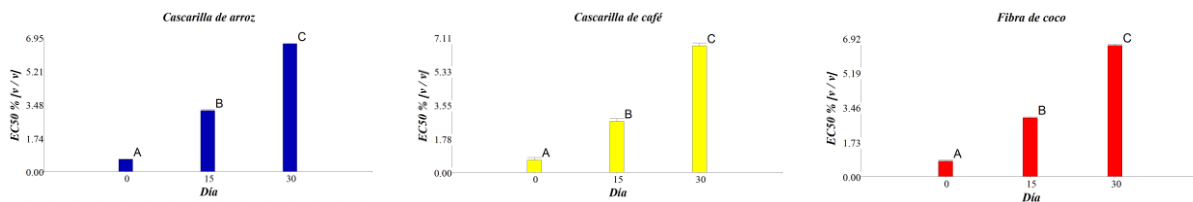


Figura 22. Análisis de varianza de la EC₅₀ por biomescla entre días. Prueba Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes

5.1.1.2. Ensayo de germinación en semillas de *Lactuca sativa*

Los ensayos de germinación mostraron que, en exposición a un medio contaminado con pesticidas, la capacidad de germinación de semillas de lechuga se ve afectada negativamente. La **Figura 23** muestra

cómo la inhibición del crecimiento de la raíz y el tallo se ve aumentada conforme se disminuye el tiempo de degradación de los contaminantes en la biomezcla (la imagen presenta el efecto para la FC).

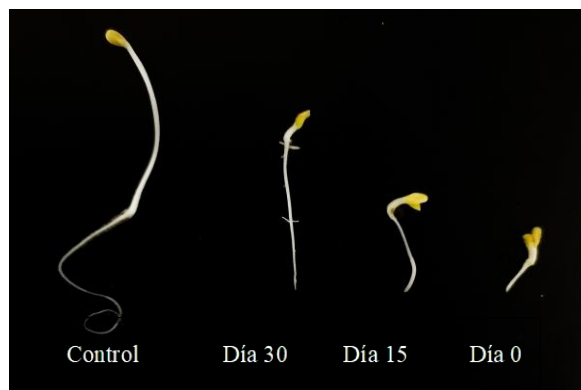


Figura 23. Efecto del medio contaminado sobre la germinación de semillas de lechuga según el tiempo de degradación en el sistema.

Masís-Mora et al. (2019) indican que, al igual que los resultados obtenidos en *L. sativa*, el mayor impacto sobre el índice de germinación ocurre en el día 0, sin embargo, contrario a la reducción subsecuente en la detoxificación resultante del presente trabajo, detallan que sus resultados no siempre mantienen esta tendencia a disminuir con el incremento del tiempo, justificando en la posible generación de productos de transformación que pueden aumentar la toxicidad del medio y, en efecto, un impacto en el índice de germinación.

5.1.1.2.1. Análisis de varianza

El análisis de varianza no mostró diferencias entre los índices de germinación de cada biomezcla para un mismo día (véase **Figura 24**), sin embargo, al comparar, para una misma biomezcla, si el cambio en el efecto sobre la germinación de las semillas era significativo (véase **Figura 25**), se obtuvo que, para la biomezcla de CC no hubo una diferencia importante entre el día 0, 15 y 30. No así para el caso de la CA y la FC donde se obtuvo un aumento en la germinación de un 59% y 53%, respectivamente, para el día 30 con respecto al día 0.

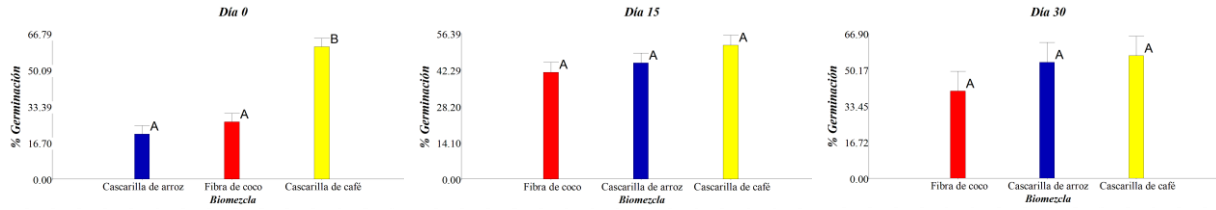


Figura 24. Análisis de varianza para el índice de germinación de semillas de lechuga por día entre biomezcla. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.

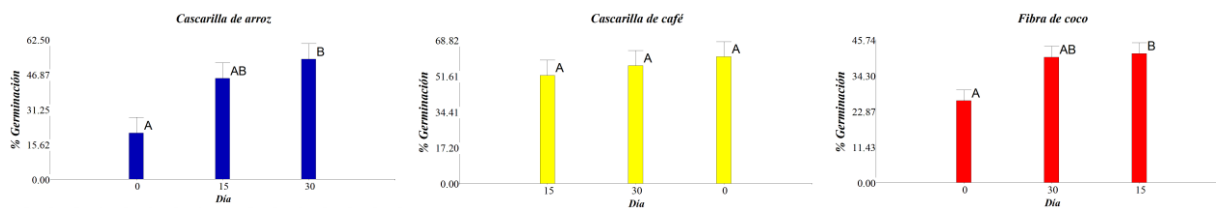


Figura 25. Análisis de varianza para el índice de germinación por biomezcla entre días. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.

5.1.2. Análisis de correlación

Para analizar los indicadores estudiados en las 2 primeras fases del proyecto (mineralización, ecotoxicología y degradación) se utilizó el Índice de Pearson con el objetivo de determinar si existía correlación entre cada uno de estos resultados (véase la **Tabla 7**, **Tabla 8** y **Tabla 9**). Se determinó que, para los tres tratamientos, existe una correlación (mayor a 0.9) directamente proporcional entre el grado de mineralización de CLP y la EC_{50} . Esto indica que, a mayor mineralización de CLP, menor la toxicidad del medio contaminando (mayores valores de EC_{50}).

Se encontró también una correlación (mayor a 0.75) inversamente proporcional entre la concentración final acumulada de los contaminantes y la EC_{50} y por encima de 0.77 con respecto al porcentaje de CLP mineralizado, indicando que, a mayor concentración de los contaminantes, la

ecotoxicidad del sistema es alta (bajos valores de EC₅₀) y, además, menor el grado de mineralización del plaguicida clorpirifós.

Tabla 7. Correlación con índice de Pearson en la biomezcla "Cascarilla de Arroz".

	%Germinación	EC50	CLP mineralizado	Concentración [mg / kg]
%Germinación	1	0.02	0	0.04
EC50	0.76	1	0	0
CLP mineralizado	0.85	0.95	1	0
Concentración [mg / kg]	-0.69	-0.92	-0.93	1

Tabla 8. Correlación con índice de Pearson en la biomezcla "Cascarilla de Café".

	%Germinación	EC50	CLP mineralizado	Concentración [mg / kg]
%Germinación	1	0.77	0.48	0.46
EC50	-0.11	1	0	0.02
CLP mineralizado	-0.27	0.94	1	0
Concentración [mg / kg]	0.29	-0.75	-0.91	1

Tabla 9. Correlación con índice de Pearson en la biomezcla "Fibra de Coco".

	%Germinación	EC50	CLP mineralizado	Concentración [mg / kg]
%Germinación	1	0.08	0.04	0.02
EC50	0.61	1	0	0.01
CLP mineralizado	0.69	0.92	1	0.02
Concentración [mg / kg]	-0.76	-0.82	-0.77	1

5.2. Fase 2

Del análisis por pesos descrito en la sección 3.2.2.3 de la optimización de biomezclas, se determinan 2 tendencias en la composición de las matrices (véase la **Figura 26**): para el componente compost se puede observar que se obtuvo un valor de alrededor del 11% v/v para ecotoxicidad y de alrededor de 30% v/v para los resultados por eliminación máxima obtenida, persistencia y toxicidad humana. Por otro lado, para el caso del componente suelo, se puede advertir que los resultados arrojan una composición del 7,23% y cerca del 25%. Por la complejidad del estudio se decidió proceder únicamente dos escenarios: 29% Compost, 7,3% Suelo y 11% Compost, 7,3% Suelo (Con sus respectivos porcentajes de fibra de coco). Chin-Pampillo et al. (2015) optimizaron una biomezcla para degradación del plaguicida carbofurán resultando una composición final de 45:13:42 (fibra de coco, compost y suelo), por otro lado, Ruiz-Hidalgo et al. (2016) realizaron un estudio de optimización de una biomezcla compuesta por CA, compost y suelo, obteniendo

finalmente una proporción de 30:43:27 v/v. Interesantemente ambos estudios mencionados optimizaron al incrementar la cantidad de suelo, contrario a esto, el proyecto actual ha arrojado resultados optimizados en los que el componente suelo ha sido reducido a 7,3%, siendo la fuente de carbono (fibra de coco) el componente con mayor incremento en la optimización.

5.2.1. Optimización: Análisis por pesos

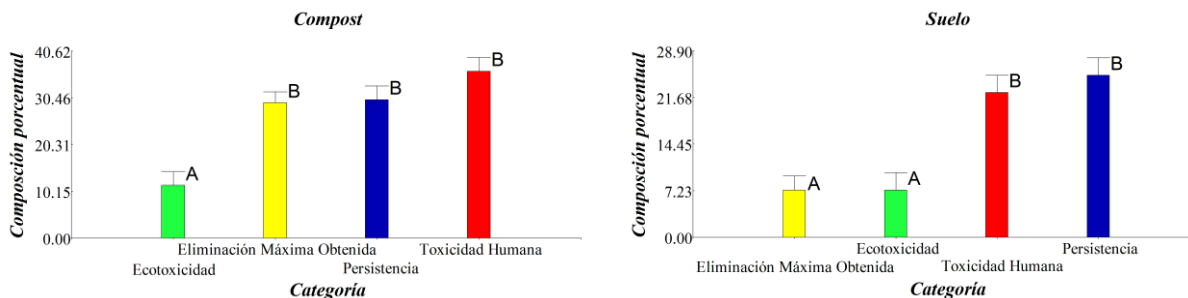


Figura 26. Análisis de varianza de las soluciones resultantes de la optimización por pesos con prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes

5.2.2. Degradación post-optimización

De los resultados de degradación post-optimización existe una tendencia que se repite entre plaguicidas y entre tratamientos: posterior al día 5, la tasa de eliminación se reduce hasta hacer que la curva permanezca constante en el tiempo (véase la **Figura 27** y la **Figura 28**), un comportamiento similar al obtenido pre-optimización. Esto puede representar un reto dentro del sistema debido a que la eliminación de los contaminantes parece no incrementar significativamente en el largo plazo. No obstante, el primer descenso de concentración de los plaguicidas se ve altamente marcado en los primeros 5 días del tratamiento, reduciendo significativamente el potencial de contaminación del medio en todos los tratamientos. Esta estabilización en las curvas de degradación indica una posible inhibición de la actividad metabólica de los microorganismos encargados de degradar los plaguicidas.

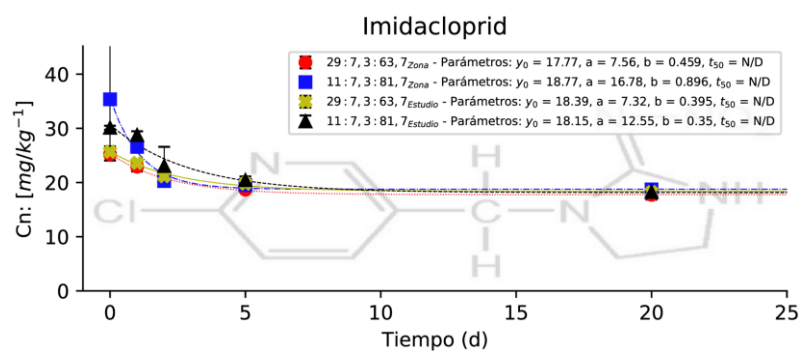
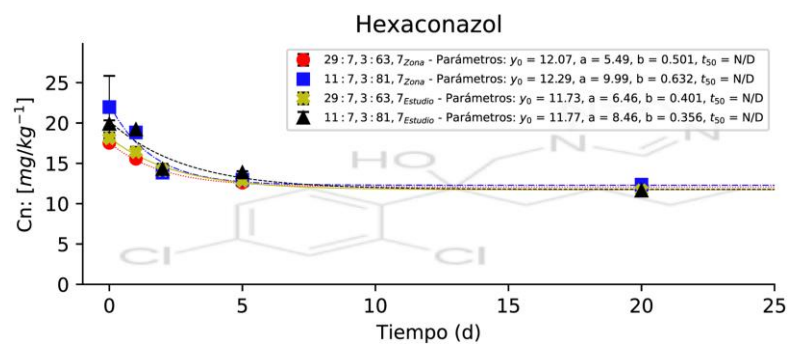
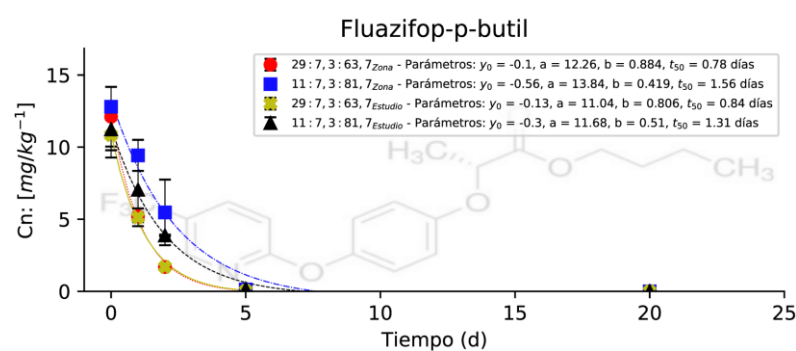
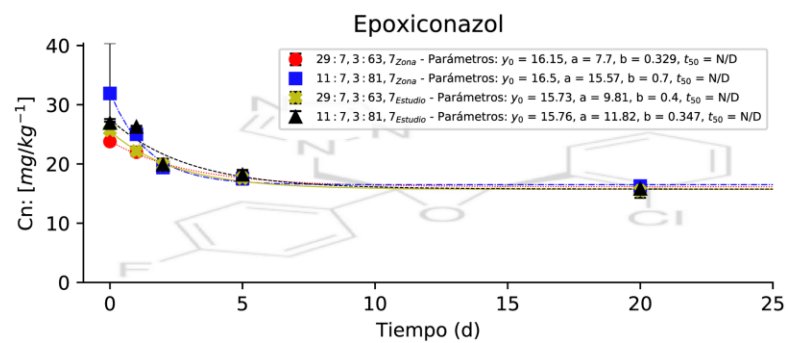
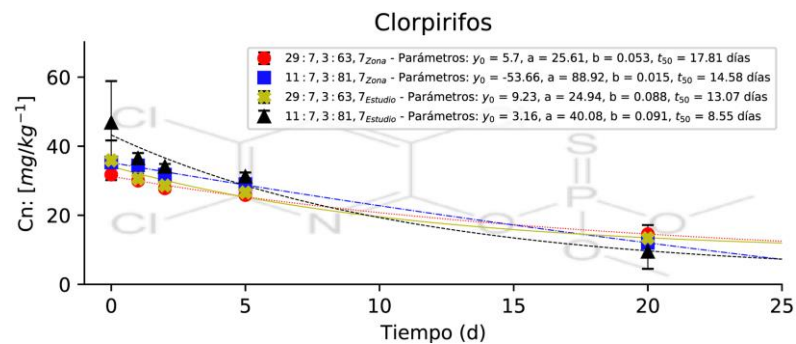
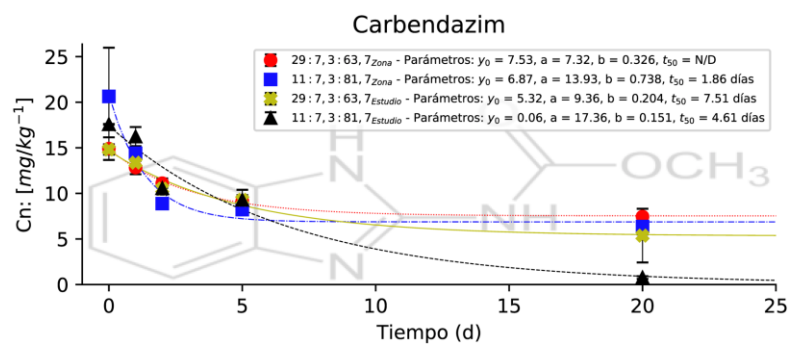


Figura 27. Resultados de degradación de plaguicidas en un tiempo de 20 días por plaguicida. Parte 1

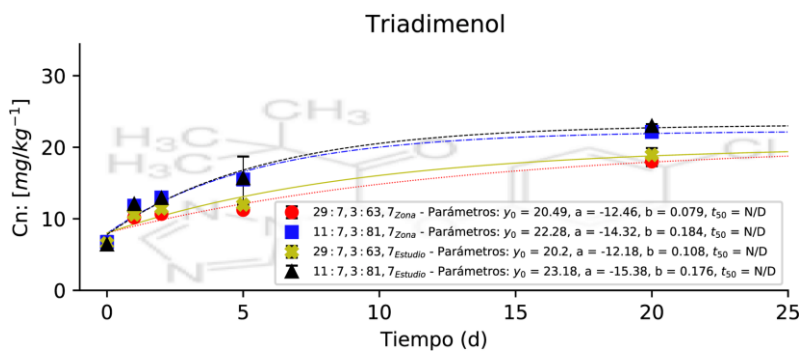
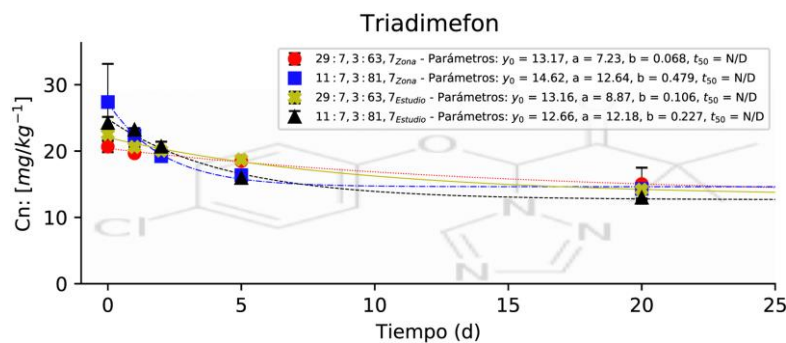
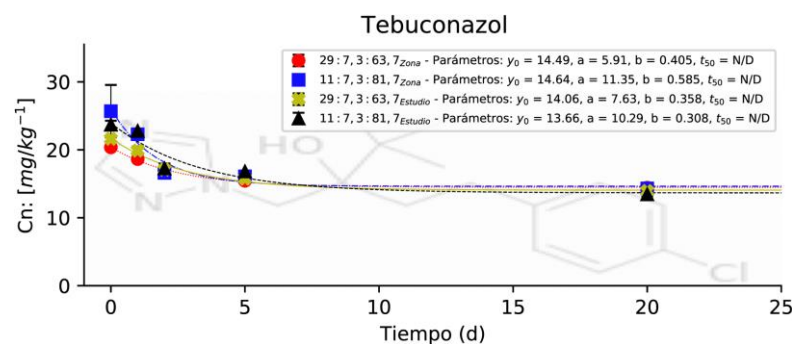
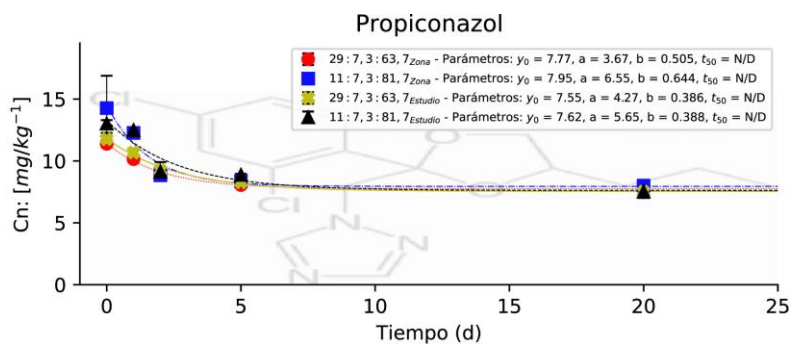
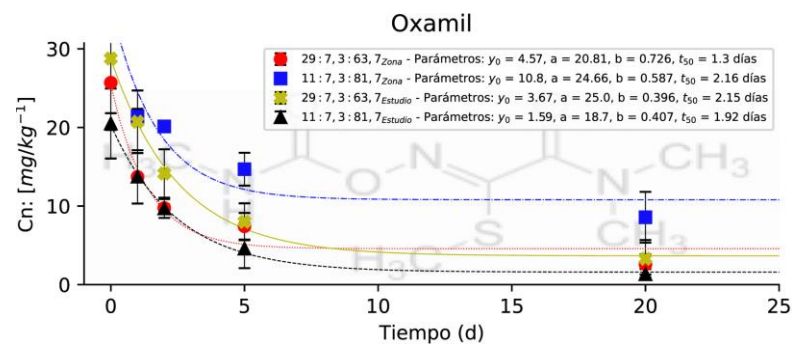
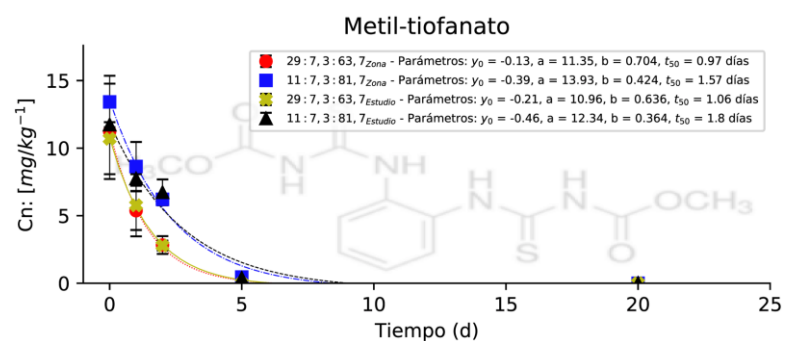


Figura 28. Resultados de degradación de plaguicidas en un tiempo de 20 días por plaguicida. Parte 2

Los resultados de degradación para las biomezclas optimizadas sugieren vidas medias más favorables en comparación con los obtenidos pre-optimización. Aun así, solo se logró estimar la vida media para 5 de los 12 plaguicidas en estudio. A diferencia de las biomezclas no optimizadas, en este caso, el principal hallazgo ha sido la vida media del clorpirifós que oscila entre 8,6 días y 17,8 días (*véase la Tabla 10*), estando muy por debajo de lo reportado para la misma biomezcla en proporción 2:1:1 (56 d) por Masís-Mora et al. (2019) y lo reportado para suelo con 386 días – típica (Lewis et al., 2016). Se puede destacar que ninguna de estas tres biomezclas optimizadas se acerca a lo comúnmente empleado 50:25:25.

Tabla 10, Comparación de vidas medias obtenidas para la biomezcla no optimizada de FC y las biomezclas optimizadas.

Plaguicida	Biomezcla no optimizada		Biomezcla Optimizada			
	1 : 1 : 2	29 : 7,3 : 63,7		11 : 7, 3 : 81, 7		
		Suelo de la zona	Suelo de estudio	Suelo de la zona	Suelo de estudio	
Carbendazim	16,46	NC	7,51	1,86	4,61	
Clorpirifós	NC	17,81	13,07	14,58	8,55	
Epoconazole	NC	NC	NC	NC	NC	
Fluazifob-P-butil	0,30	0,78	0,84	1,56	1,31	
Hexaconazole	NC	NC	NC	NC	NC	
Imidacloprid	NC	NC	NC	NC	NC	
Metil Tiofanato	1,39	0,97	1,06	1,57	1,8	
Oxamilo	0,3	1,30	2,15	2,16	1,92	
Propiconazole	NC	NC	NC	NC	NC	
Tebuconazol	NC	NC	NC	NC	NC	
Triadimefón	7,20	NC	NC	NC	NC	
Triadimenol	-3,91	NC	NC	NC	NC	
DT₅₀ global	NC	NC	NC	7,83	8,99	

El carbendazim indica una vida media mínima de 1,86; 5 días menos que lo reportado por Lescano et al. (2022) utilizando rastrojo y suelo, y 38,2 días por debajo de lo reportado en suelos (Lewis et al., 2016). El caso particular del fluazifob-p-butil muestra un incremento de 1,2 días con respecto a la biomezcla no optimizada mientras que el metil tiofanato y el oxamilo no muestran un cambio significativo entre ambos escenarios. Se estimó, además la vida media global, considerando la degradación total de los plaguicidas como un único contaminante, obteniéndose valores entre 7,83 y 8,99 días. Este trabajo evaluó la

degradación en un plazo de 20 días, lo cual puede justificar la baja eliminación en la mayor parte de las moléculas estudiadas; otros estudios alcanzan a cuantificar resultados en periodos de tiempo más amplios, superiores a los 280 días (Masís-Mora et al., 2019).

5.2.2.1. Análisis de varianza

El análisis de varianza entre las concentraciones finales obtenidas por plaguicida muestra que, a excepción del plaguicida oxamilo, no se hallan diferencias estadísticamente significativas (véase la **Figura 29**). El caso del oxamilo muestra que la biomezcla al 81,7% FC y 11% de compost con suelo de la zona tiene una eficiencia menor a los otros tres tratamientos, no obstante, logra reducir al 50% la concentración inicial en 2,16 días. Una hipótesis que podría explicar estas diferencias se plantea: el suelo de la zona puede tener menor capacidad de retención y estructura con respecto al suelo de estudio, es decir, al tratarse del sistema con la menor proporción de compost (principal responsable de la retención y soporte), la biomezcla podría tener deficiencias de retención de humedad afectando considerablemente el rendimiento de degradación del oxamilo. Aunque el hexaconazole, imidacloprid, epoxiconazole y propiconazole no muestran estas diferencias estadísticamente significativas, sí que indican que este mismo tratamiento tiene el menor rendimiento de eliminación comparado con los otras tres biomezclas. Esta hipótesis debe ser probada en otros estudios bajo condiciones similares a las establecidas.

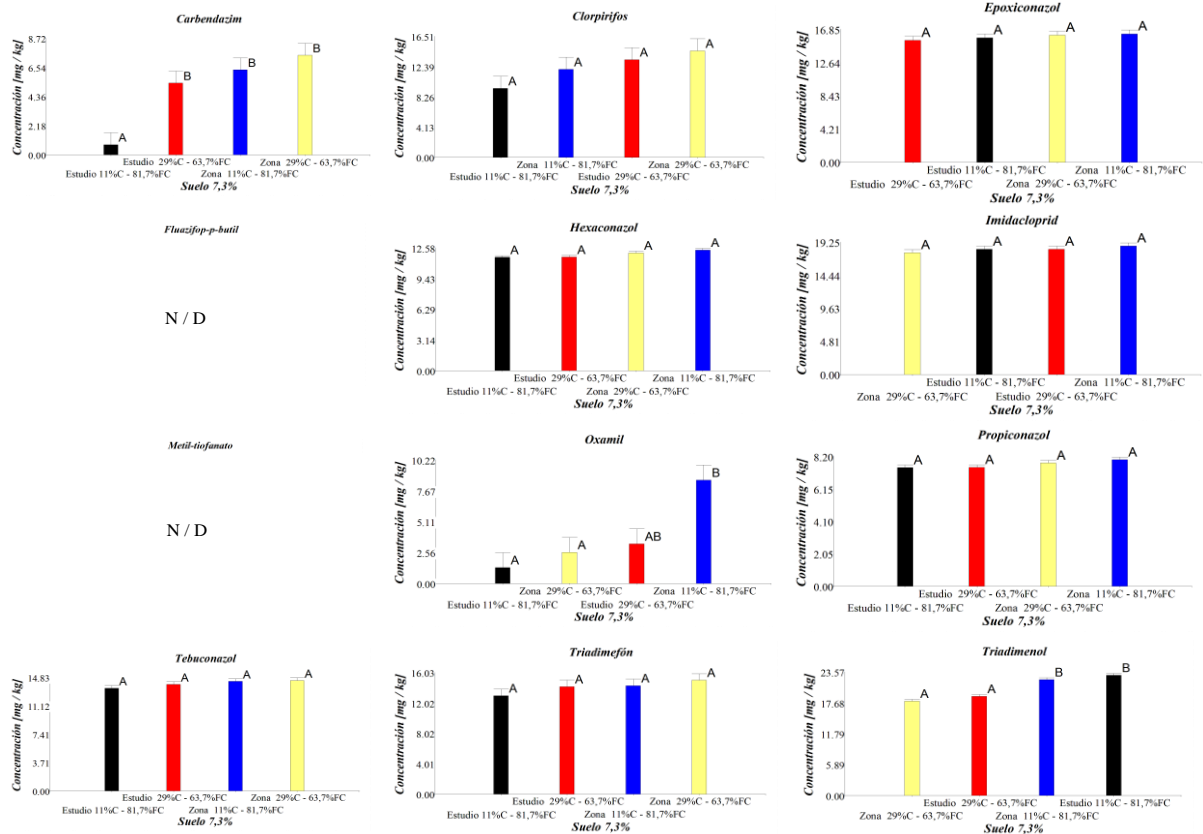


Figura 29. Análisis de varianza para la degradación máxima alcanzada en un tiempo de 20 días (máximo de estudio) por cada plaguicida. Prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes

Tomando la concentración final promedio de los plaguicidas como un contaminante único, es decir, promediando la concentración total final de los plaguicidas, se determinó que, entre tratamientos optimizados, no existen diferencias significativas (véase la **Figura 30**) obteniendo concentraciones totales por debajo de 17 ppm, representando una disminución de hasta 13 ppms con respecto a la concentración inicial para un tiempo de exposición de 20 días.

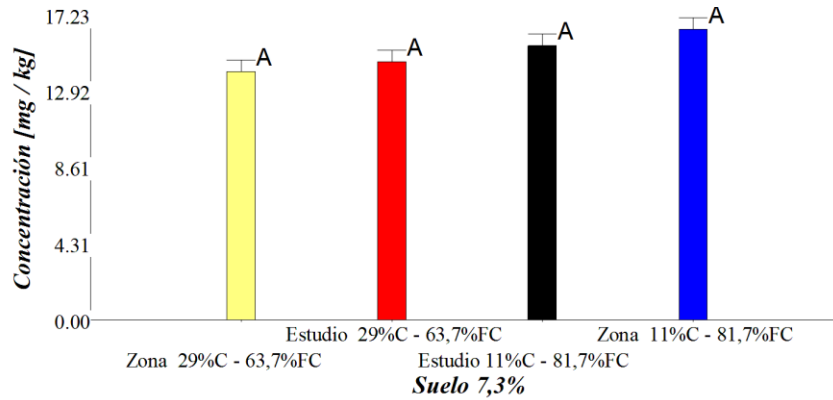


Figura 30. Análisis de varianza con prueba de Tukey para la concentración total promedio en un periodo de 20 días por biomezcla según tipo de suelo usado y arreglo proporcional de los componentes en estudio. $\alpha = 0,05$. Los resultados que no comparten una misma letra (A,B o C) son significativamente diferentes.

5.3. Fase 3

5.3.1. Estimación de los parámetros de diseño

Para el diseño del sistema de biopurificación se estimó la curva de degradación acumulada de los contaminantes (sumatoria de la concentración de los contaminantes por día) para cada uno de los tratamientos (véase la **Figura 31**):

- **Tratamiento 1:** 81,7:11:7,3 con suelo de la zona
- **Tratamiento 2:** 81,7:11:7,3 con suelo de estudio
- **Tratamiento 3:** 63,7:29:7,3 con suelo de la zona
- **Tratamiento 4:** 63,7:29:7,3 con suelo de estudio

Se puede observar que el caso 81,7:11:7,3 (con suelo de la zona, que es suelo extraído de la zona de Palmares) alcanza un valor de $DT_{50} = 7,83$ d, y el caso 81,7:11:7,3 (con el suelo de estudio, que es el suelo con el que se realizó todo el estudio previo del proyecto) un valor de $DT_{50} = 8,99$ d. Estos resultados son de alta importancia para el cálculo dimensional del sistema debido a que se trata del parámetro principal sobre el que se basa el modelo de diseño.

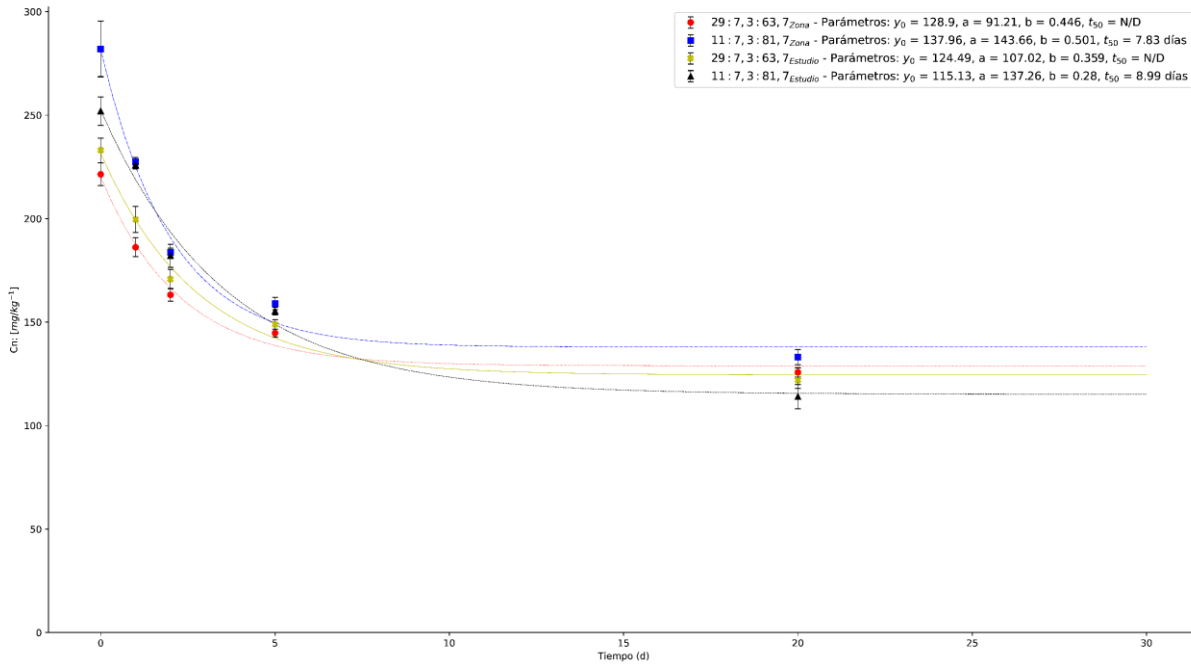


Figura 31. Concentraciones globales: curva de eliminación en un periodo de 20 días.

5.3.2. Estimación de las condiciones de diseño

El modelo dimensional obedece ciertas condiciones de diseño que deben ser estimadas inicialmente como: caudal de entrada, que depende del manejo de control de plagas que se le dé a cada finca, capacidad volumétrica del equipo de aplicación, volumen recomendado en el lavado del equipo y cantidad de equipos a utilizar por finca.

De acuerdo con el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social (2006) en el “Reglamento de Salud Ocupacional en el Manejo y Uso de Agroquímicos” el volumen de agua requerida por cada lavado del equipo no debe exceder el 25% de su capacidad. El VI Censo Nacional Agropecuario detectó 26527 fincas cafetaleras en un total de 84133,1 ha (INEC, 2015) obteniendo un área promedio de 3 ha por finca. Bajo esta estimación, se determina, por consulta a distintos productores cafetaleros que, para una finca de 3 ha, se requieren aproximadamente 2 equipos de aplicación de 25 L cada uno (este parámetro varía según la capacidad adquisitiva del productor). Se determina así que el volumen final del triple lavado bajo estas condiciones no deberá superar los 56,25 L (la **Tabla 11** muestra el resumen de las estimaciones de diseño).

Tabla 11. Estimaciones de diseño para los cálculos dimensionales de la biocama.

Equipo de Aplicación	Bomba de Motor
Capacidad del equipo	25 L
Volumen de triple lavado	28,3 L
Equipos por finca de 3 ha	2
Volumen de residuo contaminado	56,25 L (0,06 m ³)

Por la naturaleza del cultivo de café, la cantidad de aplicaciones de control de plagas entre fincas y productores es muy variable y depende del manejo integrado de plagas que se realice, siendo que algunas fincas son fumigadas entre 2 y hasta 5 veces al año. Esto es importante para el cálculo del caudal de entrada del sistema y el diseño posterior.

Ahora, bajo esta variabilidad, tomando en cuenta que se trata de un sistema biológico, y que, a pesar de que las aplicaciones son distantes en el tiempo, cada aplicación con sus respectivos lavados generará un volumen residual que debe ser descartado el mismo día en el sistema, por tanto, se decidió tomar el volumen calculado de la **Tabla 11** para un periodo de 1 día, teniendo un caudal de entrada de diseño de 0,54 m³/ d.

De acuerdo con los resultados de degradación acumulada de la **Figura 31**, se calculó las dimensiones del sistema (véase la **Tabla 12**) para los dos escenarios en los que se alcanzó la DT₅₀, ambos escenarios contienen la misma proporción de sus componentes, diferenciándose entre sí únicamente por el origen del inóculo (suelo):

1. **Suelo de la zona** 81,7:11:7,3 - DT₅₀ = 8 d
2. **Suelo de estudio** 81,7:11:7,3 - DT₅₀ = 9 d

Tabla 12. Resultados de los cálculos dimensionales de la biocama en 2 escenarios.

Dimensiones calculadas	Escenario 1	Escenario 2	Diseñado
	11 : 7, 3 : 81, 7 (Zona)	11 : 7, 3 : 81, 7 (Estudio)	
Altura (h)	0,80 m	0,80 m	0,80 m
Área Superficial (A)	0,68 m ²	0,59 m ²	1,00 m ²
Volumen de la biocama (V)	0,54 m ³	0,47 m ³	0,80 m ³

Los cálculos del diseño muestran que, para una altura de 0,80 m, el sistema debe cumplir con un área superficial promedio de, al menos, $a \times b = 0,64 \text{ m}^2$.

Para el prototipo se propusieron 2 alternativas iniciales: 1) biocama cavada en el suelo a una profundidad h (**Figura 32 - a**), impermeabilizada con geomembrana para evitar percolación hacia el subsuelo y 2) biocama construida en concreto (**Figura 32 - b**), sobre la superficie del suelo, impermeabilizada con membrana, a una altura h . Ambos prototipos de un área superficial $a \times b$.

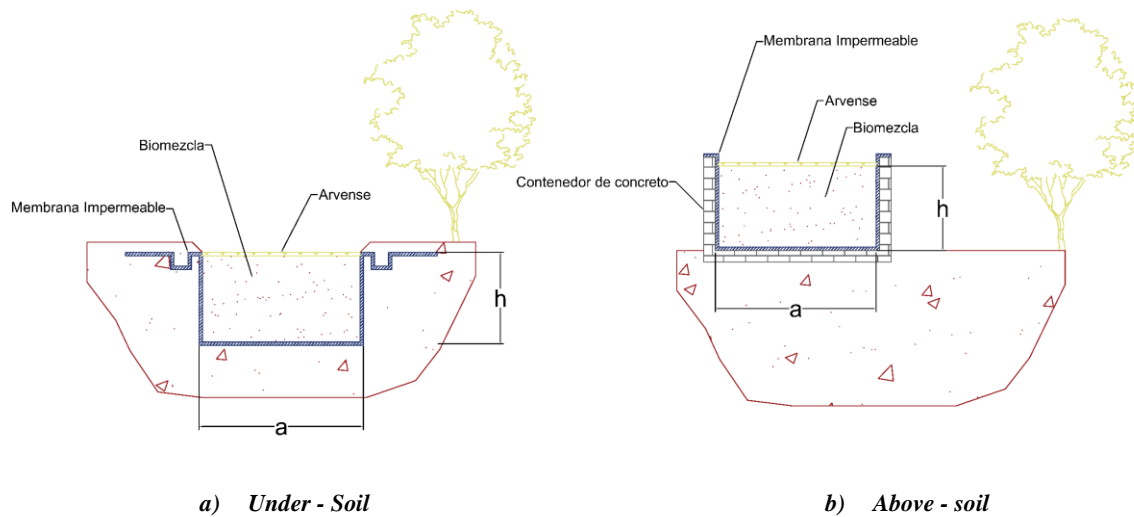


Figura 32. Prototipos preliminares para sistema de biorremediación de plaguicidas.

En la **Tabla 13** se comparan ambos sistemas y se enlista una serie de ventajas y desventajas propias de cada propuesta según su diseño.

Tabla 13. Análisis de ventajas y desventajas de los prototipos propuestos para el sistema de biopurificación.

Sistema	Ventajas	Desventajas
Under - soil	<ul style="list-style-type: none"> • Se puede dimensionar el sistema con precisión. • No incluye concreto, por lo que los costos son menores. • Queda a la altura del suelo. • Permite vaciar el contaminante sobre la superficie sin necesidad de levantar el contenedor del líquido. • Sistema puede ser sellado una vez completada su vida útil. 	<ul style="list-style-type: none"> • Riesgo de ruptura de geomembrana y liberación de contaminantes al subsuelo • Los costos por material impermeabilizante podrían encarecer el proyecto • Sistema expuesto a inundación y escorrentía si no se diseña drenaje perimetral. • Sistema debe ser cercado para evitar caída de animales y personal. • Menor vida útil
Above - Soil	<ul style="list-style-type: none"> • Se puede dimensionar el sistema con precisión. • Riesgo de filtración por ruptura de paredes se reduce al estar protegido por concreto. • Mayor vida útil • No hay riesgo de inundación ni contaminación por escorrentía. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere mayor inversión en concreto, bloques, cemento y refuerzos de construcción. • Sistema debe ser cercado para evitar caída de animales y personal. • Una vez alcanzada la vida útil de la biomezcla, el material debe ser manipulado para su posterior proceso. Esto conlleva a contaminación cruzada y mayor mano de obra por mantenimiento.

5.3.3. Diseño final de la biocama

De los dos escenarios dimensionales obtenidos en la **Tabla 12** y los dos prototipos de la **Figura 32** se decidió rediseñar el sistema bajo una propuesta más económica, maximizando las ventajas y reduciendo las desventajas enlistadas de forma que se pudiese construir la biocama con materiales, en su mayoría, reutilizados, de bajo costo y larga vida útil. La **Figura 33** muestra el diseño tridimensional final, el cual, se compone de 3 subsistemas:

1. Sistema de homogeneización:

Conformado por un tanque (estañón reutilizado de 200 L) que descansa a un nivel de referencia de 0.5 m sobre la superficie de la biomezcla, este drena el contaminante en fase acuosa a través el subsistema de distribución hidráulica impulsado por el diferencial de energía potencial (fuerza de gravedad). La principal función de este subsistema de homogeneización es operar como reservorio donde se depositen los contaminantes y se homogeneice la mezcla antes de entrar al sistema de biorremediación, de tal forma que la carga (concentración) de contaminantes se mantenga lo más uniforme en el caudal de entrada a la biocama.

En el diseño de la **Figura 33**, este estanón se encuentra reposando sobre una estructura metálica que asegura el diferencial de altura necesario para que el flujo hidráulico ocurra, sin embargo, en topografías que permitan establecer esta diferencia de altura mediante una grada o talud, se puede sustituir la estructura de forma que no es necesaria para la construcción final del sistema.

2. Sistema de distribución hidráulica:

Este es el sistema que conecta el tanque de homogeneización con la biomezcla. Distribuye los contaminantes mediante una tubería hidráulica en paralelo sobre toda la superficie. Las salidas están controladas por llaves manuales que pueden ser reguladas para garantizar el caudal de entrada diseñado. Estas válvulas, que cumplen el rol de emisores, están distribuidas espacialmente en un

arreglo rectangular de $0,25 \times 0,25$ m, para un total de 16 unidades de emisión. Además, posee una llave madre que permite cerrar el flujo para darle mantenimiento a la biocama.

3. Sistema de biorremediación:

Compuesto por una tanqueta reutilizada de $1 \times 1 \times 1$ m, abierta en su extremo superior y rellena de la biomezcla a una altura de $h = 0,80$ m, con un área superficial de $A = 1$ m². Este subsistema es regado por los 16 emisores que garantizan el caudal de entrada de diseño. Además, en su extremo superior está cubierto por algún arvense de la zona para evitar pérdida de agua por evaporación (Radiación solar) y operar como indicador del contenido de humedad del sustrato. Finalmente, la tanqueta cuenta con una válvula de PVC en el nivel más bajo que permite drenar el agua en caso de ser necesario en actividades de mantenimiento.

Cada uno de los componentes necesarios para la construcción de este sistema se presentan, con su respectivo nombre, dimensiones, cantidad, material y comentarios en la **Tabla 14** y **Tabla 15** del anexo B.



Figura 33. Diseño final del sistema de biopurificación (BPS) para eliminación de plaguicidas utilizados en café.

CONCLUSIONES

Se alcanzó hasta un $17,65 \pm 6,20\%$ de mineralización en la molécula del plaguicida clorpirifós utilizando la biomezcla con fibra de coco no optimizada.

La biomezcla con fibra de coco, como material lignocelulósico, destaca por mejor rendimiento para los ensayos realizados en comparación con cascarilla de arroz y cascarilla de café.

Plaguicidas de alta toxicidad como el Oxamilo, Fluazifob-p-butil y Metil tiofanato se degradaron al 100% en los primeros 10 días.

Se redujo el impacto de contaminación para biosistemas vegetales (validado por germinación) y biosistemas acuáticos (validado por toxicidad en *Daphnia magna*).

Los resultados muestran que existe una correlación directa (Índice de Pearson = 0,95) entre el porcentaje de CLP mineralizado y la EC_{50} para todas las biomezclas.

Los resultados de la biomezcla optimizada alcanzan rendimientos de eliminación de hasta un 42,5% para el día 5 y de un 50% para el día 8 con la biomezcla 81,7:11:7,3 inoculada con suelo de la zona (Palmares).

La implementación de lechos biológicos funciona como una alternativa de bajo costo y viable para el tratamiento efectivo de aguas contaminadas por triple lavado de envases y equipos de aplicación de plaguicidas agrícolas. Se concibe, además, como una herramienta aplicable y de fácil acceso a cualquier productor de café del territorio nacional.

Es posible diseñar un sistema de biopurificación de tipo biocama a partir de los resultados de degradación de plaguicidas de una biomezcla mediante el modelo de decaimiento exponencial de 3 parámetros.

RECOMENDACIONES

Es necesario realizar estudios del sistema puesto en operación (a escala) para validar los resultados de degradación obtenidos en laboratorio.

Estudios siguientes de rendimiento de degradación son requeridos para estimar el periodo de vida útil del sistema.

El estudio no determina si existe reducción del efecto contaminante de los plaguicidas en la matriz por efectos de baja biodisponibilidad debido a adsorción de moléculas contaminantes entre las arcillas presentes en el suelo, ni se cuantificó la producción de los metabolitos secundarios y su concentración. Sigüentes estudios deben realizarse para cuantificar este efecto en la biomezcla.

Por la naturaleza del proyecto, no se cuantificó efectos de la acidez, contenido de humedad, radiación y otros factores sobre la eficiencia del sistema. Estudios posteriores se pueden realizar para evaluar sus efectos sobre los resultados y optimizar nuevamente la biomezcla considerando estos parámetros.

Estudios posteriores son necesarios para cuantificar grado de mineralización de los plaguicidas en el sistema a escala. Además, se recomienda estudiar el impacto ecotoxicológico del sistema implementado.

La densidad aparente de los componentes puede variar considerablemente según el origen de la materia prima, se recomienda estimar este parámetro para calcular la masa de cada sustrato dentro de la biomezcla siguiendo las proporciones de diseño utilizadas.

Se debe asegurar una biomezcla lo más homogénea posible para asegurar uniformidad de los componentes dentro de la biocama.

Por tratarse de un biosistema confinado, expuesto en su superficie a radiación solar, es necesario garantizar que el sustrato conserve un contenido de humedad cercano a capacidad de campo para asegurar que el desarrollo de los microorganismos sea óptimo.

Se puede utilizar como indicador de la humedad del suelo el estado del arvense que cubre la superficie: verde y turgente indica buen contenido de humedad, signos de marchitez indican deficiencias de agua. Se puede estimar un caudal diario de, al menos, 6 L de agua al día, o 25 – 30 L de agua por semana en época seca (para los días en los que no está ingresando contaminante al sistema)-. Esta lámina de agua permite satisfacer parte de lo perdido por evapotranspiración a la atmósfera.

Dentro del sistema de biopurificación diseñado, al verter la solución de agua contaminada dentro del subsistema de homogeneización, se recomienda utilizar una membrana o barrera que opere como filtro para evitar el ingreso de sólidos o partículas que puedan obstruir el subsistema de distribución hidráulica.

El CICA ha realizado durante los últimos años acciones de divulgación sobre lechos biológicos a productores nacionales, y ha implementado sistemas similares en regiones productivas como Cartago. En adición, es importante continuar y ampliar los planes de educación a los productores locales para mostrar y concientizar acerca de la importancia de las biocamas para el control de contaminación por plaguicidas de uso agrícola.

Este tipo de sistemas deben ser incluidos en la estructura de enseñanza de Buenas Prácticas Agrícolas de instituciones gubernamentales como el Ministerio de Agricultura y Ganadería MAG, y dar seguimiento con el objetivo de implementar una red de sistemas de manejo de contaminantes agroquímicos y disminuir, a nivel ambiental, el impacto de estos agentes en los biosistemas.

Para sistemas extensivos de producción de café, con fincas mayores a las 3 ha (área utilizada para el diseño del sistema), se puede estimar la colocación de biocamas en serie para maximizar la degradación de contaminantes y minimizar el riesgo por contaminación de agroquímicos. Así mismo, para zonas donde existen múltiples fincas con áreas menores a las 3 ha, se recomienda utilizar una de ellas como "finca colectora de residuos" que cumpla como centro de acopio para la zona.

Se recomienda la colocación de este tipo de sistemas en la zona de manipulación y preparación de mezclas de formulados para hacer un manejo responsable de las aguas residuales del triple lavado y reducir el riesgo de derrames por transporte de estos residuos.

REFERENCIAS

- Abraham, J., & Silambarasan, S. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. {JAS}2: A proposal of its metabolic pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 126, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.07.001>
- Badawi, N., Rosenbom, A. E., Olsen, P., & Sørensen, S. R. (2015). Environmental Fate of the Herbicide Fluazifop-P-butyl and Its Degradation Products in Two Loamy Agricultural Soils: A Combined Laboratory and Field Study. *Environmental Science & Technology*, 49(15), 8995–9003. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00406>
- Castillo, M. D. P., Pizzul, L., & Nilson, E. (2019). *La historia del biobed*.
- Castillo, M. D. P., Torstensson, L., & Stenstrom, J. (2008). Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use-A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6206–6219. <https://doi.org/10.1021/jf800844x>
- Castillo-González, H., Pérez-Villanueva, M., Masís-Mora, M., Castro-Gutiérrez, V., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Antibiotics do not affect the degradation of fungicides and enhance the mineralization of chlorpyrifos in biomixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.008>
- Chai, L.-K., Wong, M.-H., & Hansen, H. C. B. (2013). Degradation of chlorpyrifos in humid tropical soils. *Journal of Environmental Management*, 125, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.005>
- Chawla, N., Sunita, S., Kamlesh, K., & Kumar, R. (2013). Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 17, 88–105.

- Chen, S., Liu, C., Peng, C., Liu, H., Hu, M., & Zhong, G. (2012). Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol by a New Fungal Strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. *{PLoS} {ONE}*, 7(10), e47205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047205>
- Chin-Pampillo, J. S., Ruiz-Hidalgo, K., Masís-Mora, M., Carazo-Rojas, E., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2015). Adaptation of biomixtures for carbofuran degradation in on-farm biopurification systems in tropical regions. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 9839–9848. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4130-6>
- Chu, X., Fang, H., Pan, X., Wang, X., Shan, M., Feng, B., & Yu, Y. (2008). Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *Journal of Environmental Sciences*, 20(4), 464–469. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62080-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62080-X)
- Coppola, L., Castillo, M., Monaci, E., & Vischetti, C. (2007). Adaptation of the Biobed Composition for Chlorpyrifos Degradation to Southern Europe Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 396–401. <https://doi.org/10.1021/jf062744n>
- Daam, M. A., Leitao, S., Cerejeira, M. J., & Sousa, J. P. (2011). Comparing the sensitivity of soil invertebrates to pesticides with that of *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 85(6), 1040–1047. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.032>
- Delgado-Moreno, L., Nogales, R., & Romero, E. (2017). Biodegradation of high doses of commercial pesticide products in pilot-scale biobeds using olive-oil agroindustry wastes. *Journal of Environmental Management*, 204, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.032>
- Domínguez Gual, M. C. (2015). La contaminación ambiental, un tema con compromiso social. *Producción \$+\$ Limpia*, 10, 9–21.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000100001&nrm=iso

Durán, V. B., la-Cruz Malavassi, E., Ledezma, G. H., & Muñoz, F. R. (2013). *Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=475947762021>

FAO. (2016). *Biobed Un lecho biológico para minimizar la contaminación puntual por plaguicidas*.

Fenoll, J., Ruiz, E., Flores, P., Vela, N., Hellín, P., & Navarro, S. (2011). Use of farming and agro-industrial wastes as versatile barriers in reducing pesticide leaching through soil columns. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1–3), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.012>

Fogg, P., Boxall, A. B., Walker, A., & Jukes, A. A. (2003). Pesticide degradation in a biobed composting substrate. *Pest Management Science*, 59(5), 527–537. <https://doi.org/10.1002/ps.685>

Fonseca-Sánchez, A., Madrigal-Solís, H., Núñez-Solís, C., Calderón-Sánchez, H., Moraga-López, G., & Gómez-Cruz, A. (2019). Evaluación de la amenaza de contaminación al agua subterránea y áreas de protección a manantiales en las subcuencas Maravilla-Chiz y Quebrada Honda, Cartago, Costa Rica. *Uniciencia*, 33(2), 76–97. <https://doi.org/10.15359/ru.33-2.6>

Ghafoor, A., Moeys, J., Stenstrom, J., Tranter, G., & Jarvis, N. J. (2011). Modeling Spatial Variation in Microbial Degradation of Pesticides in Soil. *Environmental Science & Technology*, 45(15), 6411–6419. <https://doi.org/10.1021/es2012353>

Góngora-Echeverría, V. R., Quintal-Franco, C., Arena-Ortiz, M. L., Giacomán-Vallejos, G., & Ponce-Caballero, C. (2018). Identification of microbial species present in a pesticide dissipation process in biobed systems using typical substrates from southeastern Mexico as a biomixture at a

- laboratory scale. *Science of The Total Environment*, 628–629, 528–538.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.082>
- Hou, L., Jin, X., Liu, N., Luo, Y., Yan, Z., Chen, M., Liu, Y., Xie, H., Giesy, J. P., Wu, F., & Xu, J. (2022). Triadimefon in aquatic environments: occurrence, fate, toxicity, and ecological risk. *Environmental Sciences Europe*, 34(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00590-7>
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*, 23(9), 2313. <https://doi.org/10.3390/molecules23092313>
- Huete-Soto, A., Castillo-González, H., Masís-Mora, M., Chin-Pampillo, J. S., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Effects of oxytetracycline on the performance and activity of biomixtures: Removal of herbicides and mineralization of chlorpyrifos. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.078>
- INEC. (2015). *VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados Generales*.
- Karanasios, E., Karpouzas, D. G., & Tsiropoulos, N. G. (2012). Key parameters and practices controlling pesticide degradation efficiency of biobed substrates. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(6), 589–598. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.665753>
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., & Karpouzas, D. G. (2012). On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation*, 23(6), 787–802. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9571-8>
- Khan, M. A., & Brown, C. D. (2016). Influence of commercial formulation on leaching of four pesticides through soil. *Science of The Total Environment*, 573, 1573–1579.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.076>

- Lafuente, A. L. (2007). Bioremediación y fitorremediación en suelos contaminados. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Lescano, M., Fussoni, N., Vidal, E., & Zalazar, C. (2022). Biodegradation of pesticide-contaminated wastewaters from a formulation plant employing a pilot scale biobed. *Science of The Total Environment*, 807, 150758. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150758>
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Martín Elorza, F. (2020). *CAMAS BIOLÓGICAS: Una alternativa para la mitigación de riesgos*. extension://bfdogplmndidlpjfhhojckpakkdjkkil/pdf/viewer.html?file=https%3A%2F%2Fwww.casafe.org%2Fpdf%2F2020%2FFederico-Elorza-2020-CAMAS-BIOLOGICAS-Una-alternativa-sustentable-para-la-mitigacion-de-riesgos.pdf
- Masís-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Tortella, G., Beita-Sandí, W., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2019). Removal of triazines, triazoles and organophosphates in biomixtures and application of a biopurification system for the treatment of laboratory wastewaters. *Chemosphere*, 233, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.001>
- Mateo-Sagasta, J., Marjani Zadeh, S., & Turrall, H. (2018). *More people, more food... worse water? - Water Pollution from Agriculture: a global review*.
- Ministerio de Ambiente y Energía. (2000). *Reduccion del escurrimiento de plaguicidas al mar caribe. Informe nacional: Costa Rica*. <https://iwlearn.net/resolveuid/ac575a11b973f120b5d125a04426fcb6>
- Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. (2006). *Reglamento de Salud Ocupacional en el Manejo y Uso de Agroquímicos N° 33507*.

- Molina-Morales, Y., Flores-García, M., Balza-Quintero, A., Benítez-Díaz, P., & Miranda-Contreras, L. (2012). Niveles de plaguicidas en aguas superficiales de una región agrícola del estado mérida, venezuela, entre 2008 y 2010. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 28(4), 289–301.
- Morillo, E., & Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of The Total Environment*, 586, 576–597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
- Murillo-Zamora, S., Castro-Gutiérrez, V., Masís-Mora, M., Lizano-Fallas, V., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Elimination of fungicides in biopurification systems: Effect of fungal bioaugmentation on removal performance and microbial community structure. *Chemosphere*, 186, 625–634. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.162>
- Naciones Unidas. (2006). *Sistema Globalmente Armonizado De Clasificacion Y Etiquetado De Productos Quimicos (sga) (Spanish Edition)*. Naciones Unidas. <https://www.amazon.com/Globalmente-Armonizado-Clasificacion-Etiquetado-Productos/dp/9213160070?SubscriptionId=AKIAIOBINVZYXZQZ2U3A&tag=chimbori05-20&linkCode=xm2&camp=2025&creative=165953&creativeASIN=9213160070>
- Osman, K. A., Al-Rehiyani, S. M., Al-Deghairi, M. A., & Salama, A. K. (2009). Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.008>
- Ruiz-Hidalgo, K., Chin-Pampillo, J. S., Masís-Mora, M., Carazo-Rojas, E., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2016). Optimization of a Fungally Bioaugmented Biomixture for Carbofuran Removal in On-Farm Biopurification Systems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2681-2>
- Schaaf, A. A. (2015). Valoración de impacto ambiental por pesticidas agrícolas. *Observatorio Medioambiental*, 18(0). https://doi.org/10.5209/rev_obmd.2015.v18.51283

- Soares, A. F. S., Leao, M. M. D., de Faria, V. H. F., da Costa, M. C. M., Moura, A. C. M., Ramos, V. D. V., Neto, M. R. V., & da Costa, E. P. (2013). Occurrence of pesticides from coffee crops in surface water. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(1). <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1053>
- Spliid, N. H., Helweg, A., & Heinrichson, K. (2006). Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed. *Chemosphere*, 65(11), 2223–2232. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.049>
- Suddaby, L. A., Beulke, S., van Beinum, W., Oliver, R. G., Kuet, S., & Brown, C. D. (2016). Long-term experiments to investigate irreversibility in sorption of pesticides to soil. *Chemosphere*, 162, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.062>
- Sun, S., Sidhu, V., Rong, Y., & Zheng, Y. (2018). Pesticide Pollution in Agricultural Soils and Sustainable Remediation Methods: a Review. *Current Pollution Reports*, 4(3), 240–250. <https://doi.org/10.1007/s40726-018-0092-x>
- Tao, S., Li, L., Ding, J., Zhong, J., Zhang, D., Lu, Y., Yang, Y., Wang, X., Li, X., Cao, J., Lu, X., & Liu, W. (2011). Mobilization of Soil-Bound Residue of Organochlorine Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in an in vitro Gastrointestinal Model. *Environmental Science & Technology*, 45(3), 1127–1132. <https://doi.org/10.1021/es1025849>
- Tarcau, D., Cucu-Man, S., Boruvkova, J., Klanova, J., & Covaci, A. (2013). Organochlorine pesticides in soil, moss and tree-bark from North-Eastern Romania. *Science of The Total Environment*, 456–457, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.103>
- Tortella, G. R., Mella-Herrera, R. A., Sousa, D. Z., Rubilar, O., Briceño, G., Parra, L., & Diez, M. C. (2013). Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities. *Chemosphere*, 93(6), 1084–1093. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.084>

- Universidad de la Frontera. (2013). *Manual de construcción y operación de lechos biológicos, Proyecto D09R1006. Manejo adecuado de residuos de Plaguicidas en la Producción Frutícola de la región de La Araucanía a través de la implementación y difusión de Lechos Biológicos [en línea]. Temuco: UFRO. Instituto de Agroindustria y Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca.* <https://hdl.handle.net/20.500.14001/33377>
- Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas - Universidad Nacional. (2022). *Manual de plaguicidas centroamérica.* Oaxamil. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/421-oxamil>
- Valderrama, J. F. N., Baena, J. P., & Pérez, F. J. M. (2012). Persistencia De Plaguicidas En El Ambiente Y Su Ecotoxicidad: Una Revision De Los Procesos De Degradacion Natural. *Gestión y Ambiente*, 15(3), 27–38. <https://search-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/docview/1677587318?accountid=28692>
- Vittozzi, L., Fabrizi, L., Consiglio, E. di, & Testai, E. (2001). Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environment International*, 26(3), 125–129. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(00\)00102-1](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(00)00102-1)
- Walker, C. H., Sibly, R. M., & Peakall, D. B. (2016). *Principles of Ecotoxicology.* Taylor & Francis Ltd. https://www.ebook.de/de/product/24336771/c_h_walker_r_m_sibly_d_b_peakall_principles_of_ecotoxicology.html
- Wong, F., Kurt-Karakus, P., & Bidleman, T. F. (2012). Fate of Brominated Flame Retardants and Organochlorine Pesticides in Urban Soil: Volatility and Degradation. *Environmental Science & Technology*, 46(5), 2668–2674. <https://doi.org/10.1021/es203287x>

ANEXOS

9.1. Código fuente para procesamiento de datos. Degradación. Python 3.9

```
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
from scipy.optimize import curve_fit as cf

#Changing font to Times
plt.rcParams["font.family"] = "Times New Roman"

#Functions to fit with curve
def fun1(t, y0, a, b):
    cn = y0 + a*np.exp(-b * t)
    return cn

def fun2(t, a, b):
    cn = a*np.exp(-b * t)
    return cn
t = np.linspace(0, 30, 90)

guess = (15, 8, 0.3) #Parametros iniciales para el ajuste del modelo

ruta = r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase I\Degradación\Procesamiento de datos_
-porcentuales\ConexionDatosNormalizados.csv"
df = pd.read_csv(ruta, sep = ",")

pesticides = df.drop_duplicates(subset="Plaguicidas")["Plaguicidas"]
biomezclas = list(df.columns.values[3:])
dias = df.drop_duplicates(subset="Dia")["Dia"].reset_index()

plaguicidas = [plag for plag in pesticides]

for plaguicida in plaguicidas:
    df.loc[df["Plaguicidas"] == plaguicida, "B1"] = df["B1"].transform(lambda b: round(b / 1000))# / max1 * 100, 2))
    df.loc[df["Plaguicidas"] == plaguicida, "B2"] = df["B2"].transform(lambda b: round(b / 1000))# / max2 * 100, 2))
    df.loc[df["Plaguicidas"] == plaguicida, "B3"] = df["B3"].transform(lambda b: round(b / 1000))# / max3 * 100, 2))

avg = df.groupby(["Plaguicidas", "Dia"]).mean().reset_index()
avg = avg.rename(columns = {"B1" : "Cn_prom_B1", "B2" : "Cn_prom_B2", "B3" : "Cn_prom_B3"})

stdv = df.groupby(["Plaguicidas", "Dia"]).std().reset_index()
stdv = stdv.rename(columns = {"B1" : "Cn_prom_B1_SD", "B2" : "Cn_prom_B2_SD", "B3" : "Cn_prom_B3_SD"})

x = [0, 1, 2, 0, 1, 2, 0, 1, 2, 0, 1, 2]
y = [0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 3, 3]
fig, axes = plt.subplots(nrows=4, ncols=3, sharex=False, sharey=False)

for i, plaguicida in enumerate(plaguicidas):
    avg_filtrado = avg.loc[avg["Plaguicidas"].str.contains(plaguicida)]
    stdv_filtrado = stdv.loc[stdv["Plaguicidas"].str.contains(plaguicida)]
    for j, biomezcla in enumerate(["Cn_prom_B1", "Cn_prom_B2", "Cn_prom_B3"]):
        figs = ["o", "s", "x"]
        line_style = [":", "-.", "-"]
        line_color = ["y", "r", "b"]

        if biomezcla[-2:] == "B1":
            label = "$Cascarilla\ de\ café$"
        elif biomezcla[-2:] == "B2":
            label = "$Fibra\ de\ coco$"
        else:
            label = "$Cascarilla\ de\ arroz$"
        try:
            y0, a, b = (cf(fun1, avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], guess, maxfev=5000, bounds = (-10, 100))[0])
            print(f"{plaguicida} - {label} : Ajustando con decaimiento exponencial de primer orden y 3 parámetros:")
            axes[i][j].plot(t, fun1(t, y0, a, b), lw = 0.5, marker = "", linestyle = f"{line_style[j]}", c = f"{line_color[j]}")
            axes[i][j].errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla + "_SD"], lw = 0.5, label =
            -f"{label} - Parámetros: $y_0$ = {round(y0, 2)}, a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}", marker = f"{figs[j]}", linestyle = "", c =
            -f"{line_color[j]}", ecolor="k", capsiz=3)
        except RuntimeError:
            try:
                a, b = (cf(fun2, avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], maxfev=5000)[0])
                print(f"{plaguicida} - {label} : Ajustando con decaimiento exponencial de primer orden y 2 parámetros:")
                axes[i][j].plot(t, fun2(t, a, b), lw = 0.5, marker = "", linestyle = f"{line_style[j]}", c = f"{line_color[j]}")
                axes[i][j].errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla + "_SD"], lw = 0.5,
                -label = f"{label} - Parámetros: a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}", marker = f"{figs[j]}", linestyle = "", c =
                -f"{line_color[j]}", ecolor="k", capsiz=3)
            except RuntimeError:
                print(f"{plaguicida} - {label} : No se logró ajustar ninguna de las curvas para el caso {plaguicida} - {label}")
```



```

axes[y[i], x[i]].errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla + "_SD"], lw = 0.5,
-label = f"{label} - Parámetros: a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}", marker = f"{figs[j]}", linestyle = "", c =
-f"{line_color[j]}", ecolor="k", capsizes=3)

axes[y[i], x[i]].set_title(f"{plaguicida}")
axes[y[i], x[i]].set_xlabel('Tiempo (d)')
axes[y[i], x[i]].set_ylabel('Cn: $[mg\ kg^{-1}]$')
axes[y[i], x[i]].legend(loc='best', shadow=False, fontsize=6)
axes[y[i], x[i]].set_ylim([0, avg_filtrado[biomezcla].max() * 1.2])
axes[y[i], x[i]].spines['right'].set_visible(False)
axes[y[i], x[i]].spines['top'].set_visible(False)
imData = plt.imread(f"{plaguicida}.png")
axes[y[i], x[i]].imshow(imData, alpha = 0.15, aspect = "auto", extent = (-1,35,0,avg_filtrado[biomezcla].max() * 1.2))
left = 0.05 # the left side of the subplots of the figure
right = 0.971 # the right side of the subplots of the figure
bottom = 0.052 # the bottom of the subplots of the figure
top = 0.971 # the top of the subplots of the figure
wspace = 0.193 # the amount of width reserved for blank space between subplots
hspace = 0.438 # the amount of height reserved for white space between subplots
fig.subplots_adjust(left, bottom, right, top, wspace, hspace)
plt.show()

```

[]:

9.2. Código fuente para procesamiento de datos. Mineralización. Python 3.9

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

#Changing font to Times
plt.rcParams["font.family"] = "Times New Roman"

def leerDatos(tipo):
    C = tipo[0]
    S = tipo[1]
    with open(f"Lectura_Blanco_{C}_{S}.csv", "r") as csp:
        dpm_Calculados = {C:{}, S:{}}
        for line in csp.readlines()[1:]:
            lectura = line.strip().split(";")
            ensayo = lectura[0][4:6] # SP o CP
            biomezcla = lectura[0][2:]
            dpm_muestra = float(lectura[-1])
            dpm_blanco = float(lectura[-2])
            dpm_total_10mL = (dpm_muestra - dpm_blanco) / 2 * 10
            dia = lectura[0][6:]
            if biomezcla not in dpm_Calculados[ensayo].keys():
                dpm_Calculados[ensayo][biomezcla] = {}
            if dia not in dpm_Calculados[ensayo][biomezcla].keys():
                dpm_Calculados[ensayo][biomezcla][dia] = []
            dpm_Calculados[ensayo][biomezcla][dia].append(dpm_total_10mL)
        dpm_Calculados_CP = dpm_Calculados[C]
        dpm_Calculados_SP = dpm_Calculados[S]
        return dpm_Calculados_CP, dpm_Calculados_SP

def estimarDPMs(dpm_Calculados, biomezclas):
    dpm_inicial_por_gramo = 5000 #dpm/g
    gramos = 50 #gramos
    dpm_inicial = dpm_inicial_por_gramo * gramos
    resultados = []
    for biomezcla in biomezclas:
        b = [[0, 0, 0]]

```

```

dias = [0]
for dia in dpm_Calculados[biomezcla]:
    dias.append(int(dia[1:]))
    b.append(dpm_Calculados[biomezcla][dia])
acumulados = []
for i in range(len(b[0])):
    acc = []
    valor_acumulado = 0
    for j in range(len(b)):
        valor_actual = b[j][i]
        valor_acumulado += valor_actual
        acc.append(valor_acumulado)
    acumulados.append(acc)
acumulados_nuevos = []
for i in range(len(acumulados[0])):
    acc = []
    for j in range(len(acumulados)):
        carbono_invertido = (1 - (dpm_inicial - acumulados[j][i]) / (dpm_inicial)) * 100
        acc.append(carbono_invertido)
    acumulados_nuevos.append(acc)
resultados.append(acumulados_nuevos)
return resultados, dias

def graficar(acumulados_nuevos, dias, biomezclas, tipo, k, name):
    #Generando archivo con los acumulados para calculos de ANOVAS
    for i, biomix in enumerate(acumulados_nuevos):
        for d, data in enumerate(biomix):
            #print(tipo[0] + ", " + biomezclas[i] + ", " + str(dias[d]) + f",{data[0]},{data[1]},{data[2]}" + "\n" )
            with open(r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase I\Mineralización\ANOVAS\datos_anova.csv", "a") as f:
                f.write(tipo[0] + ", " + "M1" + ", " + biomezclas[i] + ", " + str(dias[d]) + ", " + f"{data[0]}" + "\n" )
                f.write(tipo[0] + ", " + "M2" + ", " + biomezclas[i] + ", " + str(dias[d]) + ", " + f"{data[1]}" + "\n" )
                f.write(tipo[0] + ", " + "M3" + ", " + biomezclas[i] + ", " + str(dias[d]) + ", " + f"{data[2]}" + "\n" )

    #Graficando los datos
    b1, b2, b3 = biomezclas
    b_avg = [[], [], []]
    b_std = [[], [], []]
    i = 0
    for acumulado in acumulados_nuevos:
        for accs in acumulado:
            b_avg[i].append(round(np.mean(accs), 2))
            b_std[i].append(round(np.std(accs), 2))
            i += 1
    fg = ["o", "s", "+"]
    ls = [":", "-", "-"]
    lc = ["y", "r", "b"]
    axes[k].set_title(f"{name}")
    axes[k].set_xlabel('Tiempo (d)')
    axes[k].set_ylabel('% 14CLP$ Mineralizado')
    axes[k].errorbar(dias, b_avg[0], yerr = b_std[0], marker = fg[0], lw = 0.5, label = f"{b1}", linestyle = ls[0], c = lc[0],
    ecolor="k", capsize=3)
    axes[k].errorbar(dias, b_avg[1], yerr = b_std[1], marker = fg[1], lw = 0.5, label = f"{b2}", linestyle = ls[1], c = lc[1],
    ecolor="k", capsize=3)
    axes[k].errorbar(dias, b_avg[2], yerr = b_std[2], marker = fg[2], lw = 0.5, label = f"{b3}", linestyle = ls[2], c = lc[2],
    ecolor="k", capsize=3)
    axes[k].legend(loc = 'best', fontsize=12, ncol=3, borderaxespad=1)
    axes[k].spines['right'].set_visible(False)
    axes[k].spines['top'].set_visible(False)
    axes[k].set_xlim([0, 50])

fig, axes = plt.subplots(nrows=1, ncols=2, sharex=False, sharey=False)
tipos = [{"PP", "SS"}, {"CP", "SP"}]
for k, tipo in enumerate(tipos):
    if tipo == ["PP", "SS"]:
        name = "Sistema con todos los plaguicidas"
    else:
        name = "Sistema con Clorpirifós aislado"
    dpm_Calculados_CP, dpm_Calculados_SP = leerDatos(tipo)
    biomezclas = ("B1", "B2", "B3")
    nombres = "Cascarilla de Café", "Fibra de Coco", "Cascarilla de Arroz"
    resultados_acumulados, dias = estimarDPMs(dpm_Calculados_CP, biomezclas)
    graficar(resultados_acumulados, dias, nombres, tipo, k, name)
left = 0.05 # the left side of the subplots of the figure
right = 0.971 # the right side of the subplots of the figure
bottom = 0.052 # the bottom of the subplots of the figure
top = 0.971 # the top of the subplots of the figure
wspace = 0.193 # the amount of width reserved for blank space between subplots
hspace = 0.438 # the amount of height reserved for white space between subplots
fig.subplots_adjust(left, bottom, right, top, wspace, hspace)
plt.show()

```

9.3. Código fuente para procesamiento de datos. Ecotoxicología (*Daphnia magna*). Python 3.9

```

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
from scipy.optimize import curve_fit as cf

#Changing font to Times
plt.rcParams["font.family"] = "Times New Roman"

#Función de Hills para ajuste de resultados de ecotox Daphnia
def funHillEC50(x, min_, max_, EC50, Hill_coef):
    y = min_ + ( (max_ - min_) / (1 + ( x / (EC50) ) ** (Hill_coef) ) )
    return y

#Esta variable contiene 500 números entre el 0 y 50 para utilizarlos luego al graficar la curva ajustada
cn = np.linspace(0, 50, 500)

#Leyendo el archivo con los resultados de laboratorio
ruta = r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase I\Ecotoxicología\Resultados\Daphnia\resultadosEcotoxDaphnia.
_csv"
results = pd.read_csv(ruta, sep = ";")
biomezclas = sorted([biomezcla for biomezcla in results.drop_duplicates(subset = ["Biomezcla"])["Biomezcla"]])
respuestas = list(results.columns.values[3:])
dias = sorted([dia for dia in results.drop_duplicates(subset = ["Dia"])["Dia"]])

#Configurando el subplot donde se graficarán los resultados
x = [0, 1, 2]
y = [0, 1, 2]
fig, axes = plt.subplots(nrows=3, ncols=3, sharex=False, sharey=False)

#Estas variables se utilizarán para almacenar los resultados y, luego, escribirlas en un documento
Biomezclas_Resultados = []
Dia_Resultados = []
EC50_Resultados = []
EC50_SD_Resultados = []
for i, biomezcla in enumerate(biomezclas):
    tratamientos = results.loc[results["Biomezcla"] == biomezcla] #Entrando por tipo de biomezcla (tratamiento)
    for k, dia in enumerate(dias):
        figs = ["o", "s", "x"]
        line_style = [":", "-.", "-"]
        line_color = ["y", "r", "b"]
        print(f"biomezcla {biomezcla} - dia: {dia}")
        tratamiento = tratamientos.loc[tratamientos["Dia"] == dia]
        tratamiento["Promedio"] = tratamiento[respuestas].mean(axis = 1)
        tratamiento["SD"] = tratamiento[respuestas].std(axis = 1)

        #Ajustando la curva para cada una de las respuestas del ensayo
        min_1, max_1, EC50_1, Hill_coef_1 = (cf(funHillEC50, tratamiento["Concentracion"], tratamiento["Respuesta1"], maxfev=500000)[0])
        min_2, max_2, EC50_2, Hill_coef_2 = (cf(funHillEC50, tratamiento["Concentracion"], tratamiento["Respuesta2"], maxfev=500000)[0])
        min_3, max_3, EC50_3, Hill_coef_3 = (cf(funHillEC50, tratamiento["Concentracion"], tratamiento["Respuesta3"], maxfev=500000)[0])

        #Calculando los valores promedio de los parámetros de la curva ajustada
        min_ = np.average([min_1, min_2, min_3])
        max_ = np.average([max_1, max_2, max_3])
        EC50 = np.average([EC50_1, EC50_2, EC50_3])
        EC50_SD = np.std([EC50_1, EC50_2, EC50_3])
        Hill_coef = np.average([Hill_coef_1, Hill_coef_2, Hill_coef_3])

        #Creando un archivo con los parámetros calculados
        with open(r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase I\Ecotoxicología\Resultados\Daphnia\ANOVA\hillsEC50.csv", "a") as hill_ec50:
            hill_ec50.write(" ".join([str(ec50_) for ec50_ in [EC50_1, EC50_2, EC50_3]]))
            hill_ec50.write("\n")

        #Graficando y configurando formato deseado
        axes[y[i], x[k]].plot(cn, funHillEC50(cn, min_, max_, EC50, Hill_coef), lw = 0.75, marker = "", linestyle = line_style[k], c = line_color[k])
        axes[y[i], x[k]].errorbar(tratamiento["Concentracion"], tratamiento["Promedio"], tratamiento["SD"], linestyle = "", marker = figs[k], c = line_color[k], ecolor="k", capsiz=3)
        axes[y[i], x[k]].errorbar([EC50], [50], [EC50_SD], linestyle = "", marker = "D", c = line_color[k], label = f"$EC_{50}$", ecolor="k", capsiz=3)
        axes[y[i], x[k]].text(round(EC50, 3) * 100, round(EC50_SD, 3) * 100, f"$EC_{50}$", ecolor="k", capsiz=3)
        if biomezcla == "B1":
            titulo = "Cascarilla de café"
        elif biomezcla == "B2":
            titulo = "Fibra de coco"
        else:
            titulo = "Cascarilla de arroz"
        axes[y[i], x[k]].set_title(f"{titulo} - Día: {dia}")
        axes[y[i], x[k]].set_xlabel('% Concentración')

```

```

axes[y[i], x[k]].set_ylabel('% inmovilización')
axes[y[i], x[k]].legend(loc='best', shadow=False, fontsize=10)
axes[y[i], x[k]].spines['right'].set_visible(False)
axes[y[i], x[k]].spines['top'].set_visible(False)
axes[y[i], x[k]].vlines([EC50], 0, [50], linestyle="dashed", color = line_color[k])
axes[y[i], x[k]].hlines([50], 0, [EC50], linestyle="dashed", color = line_color[k])
if k == 0:
    axes[y[i], x[k]].set_xlim([0, 5])
else:
    axes[y[i], x[k]].set_xlim([0, 15])
Biomezclas_Resultados.append(str(biomezcla))
Dia_Resultados.append(str(dia))
EC50_Resultados.append(str(round(EC50, 3)))
EC50_SD_Resultados.append(str(round(EC50_SD, 3)))

resultados_globales = zip(Biomezclas_Resultados, Dia_Resultados, EC50_Resultados, EC50_SD_Resultados)

#Escribiendo un archivo con los resultados de la EC50 y su respectiva desviación standart
encabezado = ["Biomezcla", "Dia", "EC50_prom", "SD"]
with open(r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase I\Ecotoxicología\Resultados\Daphnia\EC50_calculada.csv", "w") as res:
    res.write(",".join(encabezado) + "\n")
    for resultado in resultados_globales:
        res.write(",".join(resultado))
        res.write("\n")

#Configuración de la "página" de los gráficos de resultados
left = 0.05 # the left side of the subplots of the figure
right = 0.971 # the right side of the subplots of the figure
bottom = 0.052 # the bottom of the subplots of the figure
top = 0.971 # the top of the subplots of the figure
wspace = 0.193 # the amount of width reserved for blank space between subplots
hspace = 0.438 # the amount of height reserved for white space between subplots
fig.subplots_adjust(left, bottom, right, top, wspace, hspace) #Configurando las dimensiones de los subgráficos dentro del gráfico.
-final, además márgenes y otros.
plt.show()

```

9.4. Código fuente para procesamiento de datos. Ecotoxicología (*Lactuca sativa*). Python 3.9

```

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

#Changing font to Times
plt.rcParams["font.family"] = "Times New Roman"

ruta = r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase I\Ecotoxicología\Resultados\Lechuga\ResultadosEcotox.csv"
results = pd.read_csv(ruta, sep = ",")

biomezclas = sorted([biomezcla for biomezcla in results.drop_duplicates(subset = ["Biomezcla"])["Biomezcla"]][:-1])
dias = sorted([dia for dia in results.drop_duplicates(subset = ["Dia"])["Dia"]][:-1])

b_control = results.loc[results["Biomezcla"] == "Control"]
with open("IndicesDeGerminacion.csv", "w") as indices:
    indices.write("Biomezcla,Dia,IG,STD\n")
    for biomezcla in biomezclas:
        print("\nBiomezcla:", biomezcla)
        for dia in dias:
            resultado = []
            for muestra in ["M1", "M2", "M3"]:
                b = results.loc[results["Biomezcla"] == biomezcla]
                b = b.loc[b["Dia"] == dia]
                sumatoria_germinadas_muestra = b[muestra].count()
                sumatoria_de_raices_muestra = b[muestra].sum()

                sumatoria_germinadas_control = b_control[muestra].count()
                sumatoria_de_raices_control = b_control[muestra].sum()

                ig = ( sumatoria_germinadas_muestra * sumatoria_de_raices_muestra ) / ( sumatoria_germinadas_control *
                -sumatoria_de_raices_control ) * 100

            resultado.append(ig)
        print(f"Día {dia}: {round(np.average(resultado), 3)} ± {round(np.std(resultado), 3)}%")
        indices.write(f"{biomezcla},{dia},{round(np.average(resultado), 3)},{round(np.std(resultado), 3)}\n")

```

```

with open(r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase_
-I\Ecotoxicología\Resultados\Lechuga\ANOVA\lechugaIG.csv", "a") as lechuga:
    lechuga.write(f"{biomezcla},{dia},{resultado[0]}\n")
    lechuga.write(f"{biomezcla},{dia},{resultado[1]}\n")
    lechuga.write(f"{biomezcla},{dia},{resultado[2]}\n")

indicesCalculados = pd.read_csv("IndicesDeGerminacion.csv", sep = ",")
indice_b1 = indicesCalculados.loc[indicesCalculados["Biomezcla"] == "B1"]
indice_b2 = indicesCalculados.loc[indicesCalculados["Biomezcla"] == "B2"]
indice_b3 = indicesCalculados.loc[indicesCalculados["Biomezcla"] == "B3"]

fig, ax = plt.subplots()
x = np.arange(3)
w = 0.1
b1 = ax.bar(x - w - 0.025, indice_b1["IG"], w, label = "Cascarilla de Café", yerr = indice_b1["STD"], error_kw = {'ecolor' : '0.2', 'color' : 'y', 'capsize' : 3}, color = "y")
b2 = ax.bar(x, indice_b2["IG"], w, label = "Fibra de Coco", yerr = indice_b2["STD"], error_kw = {'ecolor' : '0.2', 'capsize' : 3}, color = "r")
b3 = ax.bar(x + w + 0.025, indice_b3["IG"], w, label = "Cascarilla de Arroz", yerr = indice_b3["STD"], error_kw = {'ecolor' : '0.2', 'color' : 'b', 'capsize' : 3}, color = "b")
ax.plot([0 - w - 0.025, 1 - w - 0.025, 2 - w - 0.025], indice_b1["IG"], color = "y", ls = "--", marker = "s")
ax.plot([0, 1, 2], indice_b2["IG"], color = "r", ls = "--", marker = "s")
ax.plot([0 + w + 0.025, 1 + w + 0.02, 2 + w + 0.02], indice_b3["IG"], color = "b", ls = "--", marker = "s")
ax.set_xticks(x)
ax.set_xticklabels(dias)
ax.set_ylabel('$Índice de Germinación$')
ax.set_xlabel('$Días transcurridos$')
ax.spines['right'].set_visible(False)
ax.spines['top'].set_visible(False)
ax.legend()
fig.tight_layout()
plt.show()

```

9.5. Código fuente para procesamiento de datos. Optimización - Degradación. Python 3.9

```

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
from scipy.optimize import curve_fit as cf

#Changing font to Times
plt.rcParams["font.family"] = "Times New Roman"

#Functions to fit with curve
def fun1(t, y0, a, b):
    cn = y0 + a * np.exp(-b * t)
    return cn

def fun2(t, a, b):
    cn = a * np.exp(-b * t)
    return cn
t = np.linspace(0, 30, 90)

ruta = r"C:\Users\ferna\OneDrive\UCR\TFG CICA\Proyecto BioBeds\Ensayos\Fase II\PosOptimización Resultados\ResultadosConexion.csv"
df = pd.read_csv(ruta, sep = ",")

pesticidas = df.drop_duplicates(subset="Plaguicidas")["Plaguicidas"]
biomezclas = list(df.columns.values[3:])
dias = df.drop_duplicates(subset="Dia")["Dia"].reset_index().sort_values("Dia")

plaguicidas = [plag for plag in pesticidas]

C1 = "1Z" # Zona 29:7,3:63,7
C2 = "2Z" # Zona 11:7,3:81,7
C3 = "1E" # Estudio 29:7,3:63,7
C4 = "2E" # Estudio 11:7,3:81,7

avg = df.groupby(["Plaguicidas", "Dia"]).mean().reset_index()

```

```

avg = avg.rename(columns = {"C" + C1 : "Cn_prom_C" + C1, "C" + C2 : "Cn_prom_C" + C2, "C" + C3 : "Cn_prom_C" + C3, "C" + C4 :
-"Cn_prom_C" + C4})
#print(df)
stdv = df.groupby(["Plaguicidas", "Dia"]).std().reset_index()
#print(avg)
stdv = stdv.rename(columns = {"C" + C1 : f"Cn_prom_C{C1}_SD", "C" + C2 : f"Cn_prom_C{C2}_SD", "C" + C3 : f"Cn_prom_C{C3}_SD", "C" + C4 :
- f"Cn_prom_C{C4}_SD"})

acumulado = df.groupby(["Dia", "Muestra"]).sum().reset_index()
acumulado_avg = acumulado.groupby(["Dia"]).mean().reset_index()
acumulado_std = acumulado.groupby(["Dia"]).std().reset_index()
print(acumulado_avg)
print(acumulado_std)

def procesarResultadosIndividuales(plaguicidas):
    guess = (110, 90, 0.5) #Parametros iniciales para el ajuste del modelo
    x = [0, 1, 2, 0, 1, 2, 0, 1, 2, 0, 1, 2]
    y = [0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 3, 3]
    fig, axes = plt.subplots(nrows=4, ncols=3, sharex=False, sharey=False)
    resultados_csv = [{"Plaguicida", "Biomezcla", "y0", "a", "b", "t50"}]

    for i, plaguicida in enumerate(plaguicidas):
        avg_filtrado = avg.loc[avg["Plaguicidas"].str.contains(plaguicida)]
        stdv_filtrado = stdv.loc[stdv["Plaguicidas"].str.contains(plaguicida)]
        for j, biomezcla in enumerate(["Cn_prom_C" + C1, "Cn_prom_C" + C2, "Cn_prom_C" + C3, "Cn_prom_C" + C4]):
            figs = ["o", "s", "x", "h~"]
            line_style = [":", "-", "-.", "---"]
            line_color = ["r", "b", "y", "k"]

            if biomezcla[-2:] == C1:
                label = "$29 : 7,3 : 63,7_{Zona}$"
            elif biomezcla[-2:] == C2:
                label = "$11 : 7,3 : 81,7_{Zona}$"
            elif biomezcla[-2:] == C3:
                label = "$29 : 7,3 : 63,7_{Estudio}$"
            else:
                label = "$11 : 7,3 : 81,7_{Estudio}$"
            try:
                y0, a, b = (cf(fun1, avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], guess, maxfev=5000)[0])
                #res = list(res)
                print(f"{plaguicida} - {label} : Ajustando con decaimiento exponencial de primer orden y 3 parámetros:")
                #print(plaguicida, biomezcla, res)
                #print(biomezcla, y[i], x[i])
                t50 = round(1 / b * np.log( (2 * a) / (a - y0) ), 2)

                if np.isnan(t50) == True or t50 < 0:
                    t50 = "N/D"
                else:
                    t50 = str(t50) + " días"
                    t50 = str(t50)
                    print("t50:", t50)
                resultados_csv.append([plaguicida, biomezcla[-3:], str(round(y0, 2)), str(round(a, 2)), str(round(b, 3)), t50])
                axes[j][i], x[i]].plot(t, fun1(t, y0, a, b), lw=0.5, marker="o", linestyle=f"{line_style[j]}", c=_c)
            except RuntimeError:
                axes[j][i], x[i]].errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla + "_SD"], lw=0.5,
            label = f"{label} - Parámetros: $y_0$ = {round(y0, 2)}, a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}, $t_{50}$ = {t50}", marker =_c)
            figs[j]], linestyle = "", c = f"{line_color[j]}", ecolor="k", capsiz=3)
            except RuntimeError:
                try:
                    a, b = (cf(fun1, avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], maxfev=5000)[0])
                    print(f"{plaguicida} - {label} : Ajustando con decaimiento exponencial de primer orden y 2 parámetros:")
                    #print(plaguicida, biomezcla, res)
                    #print(biomezcla, y[i], x[i])
                    axes[j][i], x[i]].plot(t, fun2(t, a, b), lw=0.5, marker="o", linestyle=f"{line_style[j]}", c=_c)
                except RuntimeError:
                    axes[j][i], x[i]].errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla + "_SD"], lw=0.5,
            label = f"{label} - Parámetros: a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}", marker = f"{figs[j]}", linestyle = "", c =_c)
            figs[j]], ecolor="k", capsiz=3)
            except RuntimeError:
                print(f"{plaguicida} - {label} : No se logró ajustar ninguna de las curvas para el caso {plaguicida} - {label}")
                axes[j][i], x[i]].errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla + "_SD"], lw=0.5,
            label = f"{label} - Parámetros: a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}", marker = f"{figs[j]}", linestyle = "", c =_c)
            figs[j]], ecolor="k", capsiz=3)

            axes[j][i], x[i]].set_title(f"{plaguicida}")
            axes[j][i], x[i]].set_xlabel('Tiempo (d)')
            axes[j][i], x[i]].set_ylabel('Cn: $[mg / kg^{-1}]$')
            axes[j][i], x[i]].legend(loc='best', shadow=False, fontsize=6)
            axes[j][i], x[i]].set_ylim([0, avg_filtrado[biomezcla].max() * 1.5])
            axes[j][i], x[i]].spines['right'].set_visible(False)
            axes[j][i], x[i]].spines['top'].set_visible(False)
            imData = plt.imread(f"{plaguicida}.png")
            axes[j][i], x[i]].imshow(imData, alpha = 0.15, aspect = "auto", extent = (-1,25,0,avg_filtrado[biomezcla].max() * 1.2))

left = 0.05 # the left side of the subplots of the figure
right = 0.971 # the right side of the subplots of the figure
bottom = 0.052 # the bottom of the subplots of the figure
top = 0.971 # the top of the subplots of the figure
wspace = 0.193 # the amount of width reserved for blank space between subplots
hspace = 0.438 # the amount of height reserved for white space between subplots

```

```

fig.subplots_adjust(left, bottom, right, top, wspace, hspace)
plt.show()
with open("resultados_csv.csv", "w") as res:
    for rslt in resultados_csv:
        res.write(",".join(rslt)+"\n")

def procesarResultadosAcumulados(acumulado_avg, acumulado_std):
    guess = (110, 90, 0.5) #Parametros iniciales para el ajuste del modelo
    avg_filtrado = acumulado_avg
    stdv_filtrado = acumulado_std
    fig, axes = plt.subplots(nrows=1, ncols=1, sharex=False, sharey=False)
    for j, biomezcla in enumerate(["C" + C1, "C" + C2, "C" + C3, "C" + C4]):
        figs = ["o", "s", "x", "-"]
        line_style = [":", "-", "-", "--"]
        line_color = ["r", "b", "y", "k"]
        if biomezcla[-2:] == C1:
            label = "$29 : 7,3 : 63,7_{Zona}$"
        elif biomezcla[-2:] == C2:
            label = "$11 : 7,3 : 81,7_{Zona}$"
        elif biomezcla[-2:] == C3:
            label = "$29 : 7,3 : 63,7_{Estudio}$"
        else:
            label = "$11 : 7,3 : 81,7_{Estudio}$"
        try:
            y0, a, b = (cf(fun1, avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], guess)[0])
            print(f"{label} : Ajustando con decaimiento exponencial de primer orden y 3 parámetros:")
            print(f"{y0}, {a}, {b}")
            t_50 = round(1 / b * np.log( (2 * a) / (a - y0) ), 2)
            if np.isnan(t_50) == True or t_50 < 0:
                t_50 = "N/D"
            else:
                t_50 = str(t_50) + " días"
            t_50 = str(t_50)
            print("t_50:", t_50)
            axes.plot(t, fun1(t, y0, a, b), lw = 0.5, marker = "", linestyle = f"{line_style[j]}", c = f"{line_color[j]}")
            axes.errorbar(avg_filtrado["Dia"], avg_filtrado[biomezcla], stdv_filtrado[biomezcla], lw = 0.5, label = f"{label} -␣
-Parámetros: $y_0$ = {round(y0, 2)}, a = {round(a, 2)}, b = {round(b, 3)}, $t_{50}$ = {t_50}", marker = f"{figs[j]}", linestyle =␣
␣", c = f"{line_color[j]}", ecolor="k", capsize=3)
        except RuntimeError:
            print("ALERTA")
        axes.set_xlabel('Tiempo (d)')
        axes.set_ylabel('Cn: $[mg / kg^{-1}]$')
        axes.legend(loc='best', shadow=False, fontsize=12)
        axes.set_ylim([0, avg_filtrado[biomezcla].max() * 1.2])

axes.spines['right'].set_visible(False)
axes.spines['top'].set_visible(False)
left = 0.05 # the left side of the subplots of the figure
right = 0.971 # the right side of the subplots of the figure
bottom = 0.052 # the bottom of the subplots of the figure
top = 0.971 # the top of the subplots of the figure
wspace = 0.193 # the amount of width reserved for blank space between subplots
hspace = 0.438 # the amount of height reserved for white space between subplots
fig.subplots_adjust(left, bottom, right, top, wspace, hspace)
plt.show()
procesarResultadosIndividuales(plaguicidas)

```

9.6. Anexo A. Resultado de cálculos de plaguicidas para preparación de coctel (Python 3.9)

Ensayo de Degradación
 FECHA DE CÁLCULOS: 09/09/2021
 HORA: 01:10:37
 Resumen de la información ingresada y calculada

Parámetro y unidad	Cantidad ingresada o calculada
Total de Muestras	60.00
Masa de cada Muestra [g]	5.00
Concentración de IngAct en la Biomezcla [mg/kg]	30.00
Masa total de Biomezcla [g]	300.00
Masa de cada Ingrediente Activo [mg]	9.00
Volumen que se inyecta a la muestra [uL]	1000.00
Volumen mínimo de aforo [uL]	60000.00
Volumen Final de aforo [mL]	100.00
Concentración del plaguicida en el coctel [g/L]	0.15

Se detalla a continuación la cantidad de cada formulado que se debe agregar al balón aforado de 100.00 mL:

Item	Ingrediente activo	Cantidad	Unidad
1	Fluazifop-p-butil	120.00	uL
2	Oxiflourfen	62.50	uL
3	Carbendazim **	120.00	uL
4	Tiofanato de metilo	30.00	uL
5	Oxamil	62.50	uL
6	Imidacloprid	0.02	g
7	Clorpirifós	31.25	uL
8	Epoxiconazole **	120.00	uL
9	Hexaconazole	300.00	uL
10	Propiconazole	60.00	uL
11	Tebuconazole *	66.67	uL
12	Tolclofos Metil	0.03	g
13	Triadimefón	0.06	g
14	Triadimenol *	200.00	uL

NOTA: Los ingredientes activos con el mismo número de asterisco al final (Ej: TRIADIMENOL Y TEBUCONAZOL),
 comparten el mismo formulado, es decir, el formulado
 contiene los 2 disueltos,
 por lo que se debe extraer la cantidad del que es contenido
 en mayor grado,
 o lo que es lo mismo, se debe extraer el volumen o masa
 MENOR indicada en la columna "Cantidad".
 Si ambos tienen la misma cantidad, se toma esa.

9.7. Anexo B. Detalle de accesorios de la biocama

Tabla 14. Detalle de accesorios del sistema de biopurificación. Parte 1.




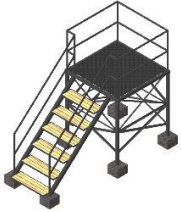





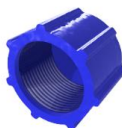

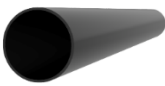



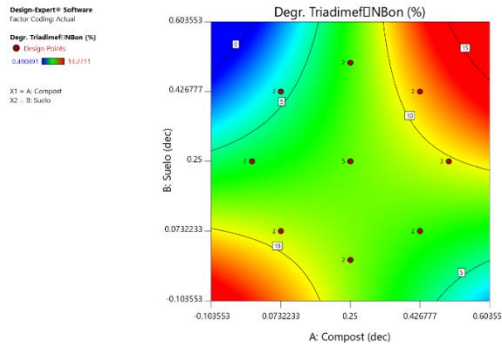
Accesorio	Detalle gráfico	Nombre	Cantidad	Material	Comentarios
1		Estañón	1	Plástico	De segundo uso. Capacidad de 200 L, con perforación en el fondo para salida de contaminante.
2		Tanqueta	1	Plástico con estructura de aluminio	De segundo uso, sin tapa superior (abierto).
3		Biomezcla	1	Gramínea (superficie), 81,7% Fibra de coco, 7,3% Suelo, 11,0 % Compost (v/v)	La capa superior corresponde a alguna gramínea que se siembre sobre la biomezcla para reducir efecto de evaporación.
4		Plataforma	1	Metal, concreto, madera	Opcional, puede sustituirse por algún gradiente de altura facilitado por la topografía del sitio o por una grada de concreto ya existente.
5		Válvula de paso acople rápido	1	Plástico (Riego)	Diámetro 1".
6		Codo 90° acople rápido	2	Plástico (Riego)	Diámetro 1".
7		Niple roscado macho	1	Plástico (Riego)	Diámetro 1"

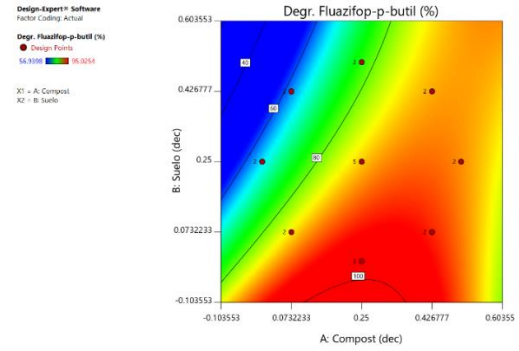
Tabla 15. Detalle de accesorios del sistema de biopurificación. Parte 2.

Accesorio	Detalle gráfico	Nombre	Cantidad	Material	Comentarios
8		Válvula de inserción y acople rápido para goteo	16	Plástica (Riego)	Diámetro 16 mm (o disponible para goteo).
9		Acople rápido roscado macho	4	Plástica (Riego)	Diámetro 1''
10		Tapón roscado membra	4	Plástica (Riego)	Diámetro 1''.
11		Tee acople rápido	3	Plástica (Riego)	Diámetro 1''.
12		Tubería para riego	6 – 7 m	PE Baja densidad	Diámetro 1''. Preferiblemente de baja densidad para reducir costos.
13		Acople rápido roscado hembra	1	Plástica (Riego)	Diámetro 1''
14		Tuerca	2	Plástica (Riego)	Diámetro 1''
15		Arandela	2	Hule	Diámetro 1''

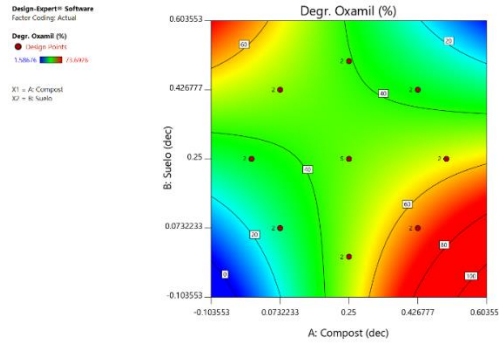
9.8. Anexo C. Optimización: Resultados Generales



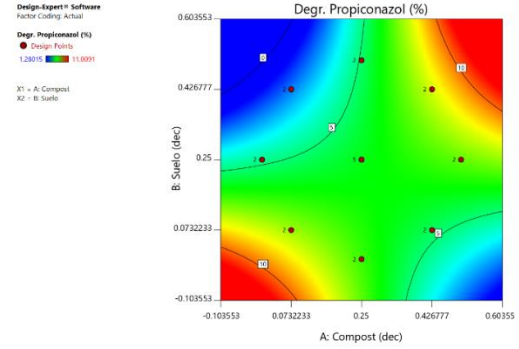
a) Triadimefón



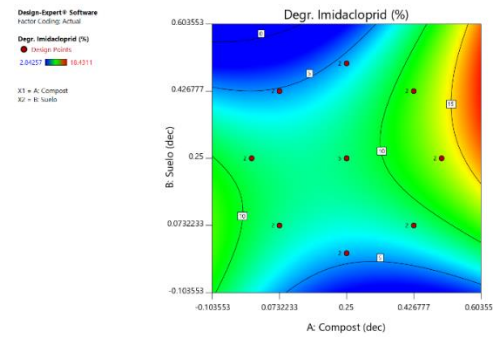
b) Fluazifop-p-butil



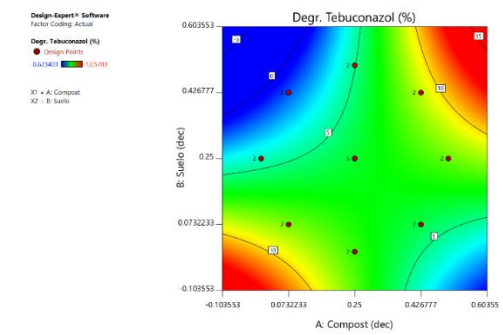
c) Oxamilo



d) Propiconazole

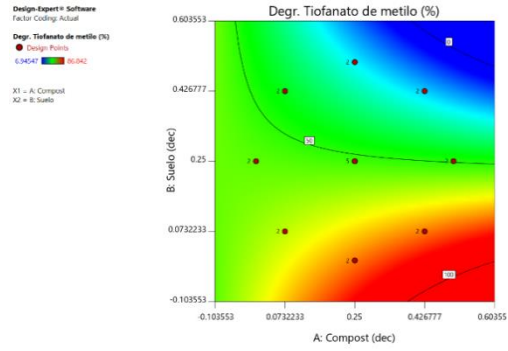


e) Imidacloprid

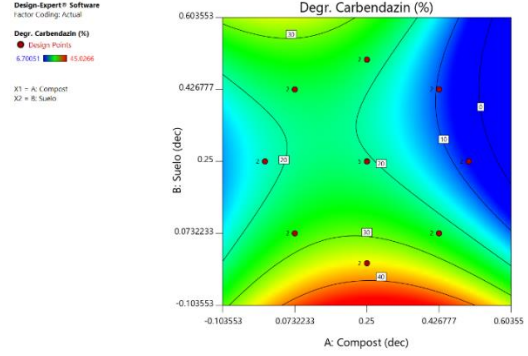


f) Tebuconazol

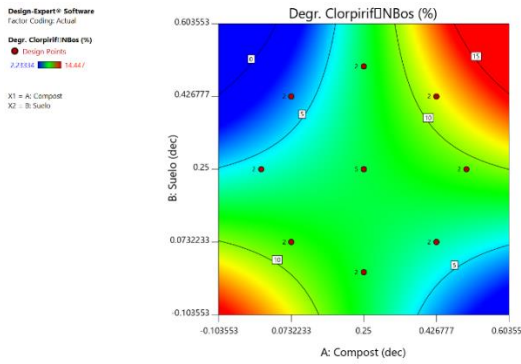
Figura 34. Superficies de respuesta de degradación por plaguicida. Parte 1.



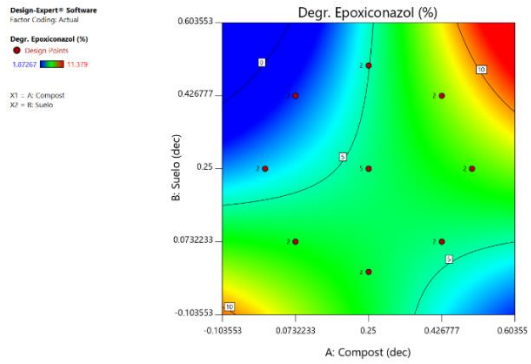
a) Metil tiofanato



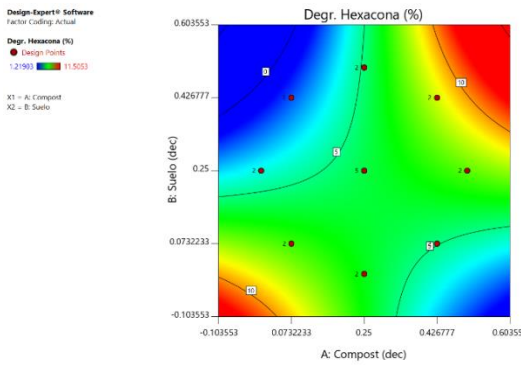
b) Carbendazim



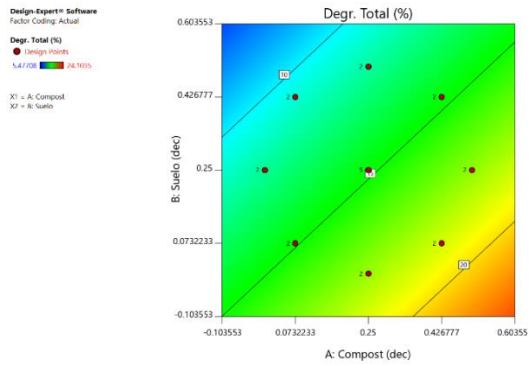
c) Clorpirifós



d) Epoxiconazole



e) Hezaconazole



f) Sumatoria de concentraciones

Figura 35. Superficies de respuesta de degradación de por plaguicida. Parte 2.