



Evaluación de la interacción de microplásticos y atrazina en *Lumbricus terrestris* como un bioindicador terrestre

Habilitación presentada para optar al título de
Ingeniera Ambiental

CARLA VALENTINA ALEXANDRA SOBARZO PALMA

CONCEPCIÓN (Chile), 2023

“Evaluación de la interacción entre microplásticos y atrazinas en lumbricus terrestres como bioindicador terrestre”

Profesor Guía: Dra. Carolina Baeza Freer



Profesor Comisión: Dra. Patricia González Sánchez



Profesor Comisión: Dr. Ricardo Barra Ríos



Profesor Comisión: Dr. Alberto Araneda Castillo



CONCEPTO: APROBADO CON DISTINCIÓN MÁXIMA

Conceptos que se indica en el Título

- ✓ Aprobado por Unanimidad : (En Escala de 4,0 a 4,9)
- ✓ Aprobado con Distinción (En Escala de 5,0 a 5,6)
- ✓ Aprobado con Distinción Máxima (En Escala de 5,7 a 7,0)

Concepción, agosto 2023



Evaluación de la interacción de microplástico y atrazina en *Lumbricus terrestris* como un bioindicador terrestre

Habilitación presentada para optar al título de
Ingeniera Ambiental

CARLA VALENTINA ALEXANDRA SOBARZO PALMA

Profesor guía: Dra. Ana Carolina Baeza Freer

CONCEPCIÓN (CHILE), 2023

Índice	
Agradecimientos.....	iv
RESUMEN.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPÓTESIS	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Plásticos.....	4
2.2 ¿Qué son los microplásticos?.....	5
2.3 Efectos de los microplásticos.....	6
Figura 1	9
2.4 Agroquímicos	9
2.5 Efectos de los pesticidas.....	10
2.6 Atrazina.....	11
Tabla 1	13
Figura 2	14
2.7 Bioindicadores y Biomarcadores	14
2.7.1 Biomarcadores para microplásticos	15
2.7.2 Biomarcadores para pesticidas	16
2.8 <i>Lumbricus terrestris</i>	18
Tabla 2	22
3. METODOLOGÍA.....	2
3.1 Reactivos y materiales	2
3.2 Suelo.....	2
3.2.1 Caracterización propiedades fisicoquímicas del suelo.....	3
3.2.1.1 Granulometría.....	3
3.2.1.2 Porcentaje de humedad.....	3
3.2.1.3 Materia orgánica.....	4
3.2.1.4 pH.....	4
3.2.1.5 Fósforo Total.....	4
3.3 Prueba de adsorción a superficie de MP	4

3.3.1 Obtención y preparación de los MPs	4
Figura 3	5
3.3.2 Capacidad de adsorción a superficie de MPs	5
3.4 Diseño Experimental.....	6
3.4.1 Organismos y contaminación del suelo	6
Figura 4	8
3.4.2 Bioensayo de exposición.....	8
Figura 5	9
3.4.3 Concentración de atrazina en muestras de suelo	10
Figura 6	10
3.4.4 Lombrices y disección de tejidos	10
Figura 7	11
3.4.5 Actividad de la acetilcolinesterasa.....	12
3.4.6 Actividad de Carboxilesterasa	12
3.4.7 Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
1. Suelo.....	13
Tabla 3	13
2. Test de adsorción de ATZ a MP.....	14
Figura 8	14
Figura 9	14
Figura 10.....	15
Figura 11	15
Tabla 4	16
3. Exposiciones.....	17
3.1 Mortalidad.....	17
Figura 12	18
3.2 Extracción de ATZ del suelo	19
Tabla 5	19
3.3 Lombrices	19
Figura 13	19
Tabla 6	20
Tabla 6	21
Figura 14.....	22

Figura 15	22
Figura 16	23
3.4 Análisis estadístico del cambio de peso	23
Tabla 7	23
Tabla 8	24
Tabla 9	24
3.5 Actividad enzimática de AChE.....	26
Tabla 10	26
Figura 18	26
Tabla 11	27
Tabla 12	27
Tabla 13	28
Figura 19	28
Figura 20	29
Figura 21	30
Tabla 14	31
3.6 Actividad enzimática de CbE	34
Figura 22	34
Tabla 15	35
Figura 23	35
Tabla 16	35
Tabla 17	36
Tabla 18	36
Figura 24	37
Figura 25	38
Tabla 19	39
3.7 Correlaciones	41
Figura 26	41
Tabla 20	41
5. CONCLUSIONES.....	42
OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE	44
Objetivo 15: Vida de ecosistemas terrestres.....	44
Objetivo 2: Hambre Cero	44
Objetivo 12: Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles.....	45

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXOS	57

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia por siempre apoyarme en todos los desafíos a los que me enfrento. A mis amigos, que han sido una gran fortaleza en todo este proceso.

Gracias a mis queridas profesoras Patricia González y Carolina Baeza, que han confiado en mi trabajo y en mis habilidades, me han apoyado y guiado en mi carrera profesional. Al profesor Ricardo Barra por guiarme en su experiencia y consejos. Al profesor Alfred Rossner, por todo su apoyo en la realización de los primeros ensayos.

Al profesor Mauricio Schoebitz por permitirme la oportunidad de conocer el laboratorio de Microbiología de suelos de la Facultad de Agronomía, del que ahora soy parte.

A las increíbles personas de los laboratorios del centro EULA, gracias por brindarme ayuda y apoyo, realmente ha sido la mejor parte de elegir una tesis de laboratorio.

A todas las personas que he mencionado, gracias por permitir que este proceso sea grato y ahora pueda dedicar parte de mi vida a la investigación.

Esta investigación ha sido financiada gracias al Proyecto VRID_MULTIDISCIPLINARIO, UdeC Código 2021000385MUL.

RESUMEN

La contaminación por microplásticos (MPs) y pesticidas se ha convertido en un problema ambiental a nivel mundial, y se han posicionado como los principales contaminantes de interés emergente del suelo. Esta presencia masiva se debe principalmente a las prácticas relacionadas al estilo de vida moderna y la agricultura convencional.

La liberación de estos contaminantes al ambiente es simultánea, por lo que explorar las posibles interacciones entre estos ha sido de gran interés en organismos acuáticos, sin embargo, la investigación para organismos del suelo es limitada.

Considerando que todos los procesos en el suelo están interconectados, una perturbación puede afectar a los distintos organismos que habitan en él. Es necesario evaluar los posibles efectos interactivos de los contaminantes en organismos clave del suelo, como la lombriz común *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae) que desempeña un rol importante en el ecosistema terrestre.

En esta investigación se expuso a *L. terrestris* a MPs y atrazina (ATZ) con el objetivo de evaluar los efectos a nivel enzimático de la exposición singular y a la combinación de los contaminantes en condiciones de laboratorio. Los individuos fueron expuestos a concentraciones en suelo de 0,5 mg/kg de ATZ y/o 2% p/p de MPs de polietileno de baja densidad (MPBD) mediante un bioensayo de exposición por 42 días. El efecto se determinó a través de la actividad de los biomarcadores enzimáticos Acetilcolinesterasa (AChE) y Carboxilesterasa (CbE) en los distintos tejidos de las lombrices. Los resultados indican un posible efecto de competición entre los contaminantes estudiados evaluados en AChE al estar en coexposición (MPs+ATZ), presentando un menor nivel de inhibición de actividad enzimática en ciertos tejidos específicos de la lombriz.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de plástico y su uso a gran escala se remonta aproximadamente a 1950 y desde entonces ha sido una herramienta esencial para el desarrollo de la vida humana moderna, es un material muy conveniente de producir debido a su gran versatilidad, bajo costo, higiene, facilidad de procesamiento y alta resistencia (Andrady and Neal, 2009; Cole et al., 2011; Geyer et al., 2017; Lei et al., 2018). Debido a estas características es que los plásticos están presentes en casi todos los sectores de la sociedad, siendo utilizado por una gran variedad de consumidores y aplicaciones industriales como envases, construcción, materiales sanitarios, piezas de automóviles, artículos para el hogar y materiales agrícolas (Goeran et al., 2010; Kim et al., 2020).

El plástico ha sido objeto de una creciente preocupación ambiental (Cole et al., 2011), ya que la durabilidad que lo hace un material tan atractivo lo hace muy resistente a la degradación, por lo que la eliminación de estos residuos es una problemática agravada por su abundante uso y práctica de usar-y-tirar (Barnes et al., 2009). Se calcula que alrededor del 80% de los residuos plásticos mundiales terminan en vertederos donde pueden tardar siglos en descomponerse, y están expuestos a las condiciones ambientales lo cual puede generar los llamados microplásticos (MPs) (Barnes et al., 2009; Geyer et al., 2017)

Los MPs son fragmentos de plástico de tamaño inferior a 5 mm formados a partir de restos plásticos más grandes que han sido degradados de forma física, química y biológica (Arthur et al., 2009; Hanvey et al., 2017; Rillig et al., 2017). Los efectos de los MPs en el ambiente difieren sustancialmente de otros contaminantes, debido a sus características intrínsecas, como movilidad y área superficial (Pathan et al., 2020).

Una de las principales actividades que permiten la entrada de los MPs en el suelo son las prácticas agrícolas, que utilizan acolchado plástico para obtener mejores rendimientos en los cultivos, cosechas más tempranas y mejor calidad de la fruta (Steinmetz et al., 2016). En este contexto de protección de

cultivos, y en consecuencia aumentar la producción y minimizar las pérdidas, en la agricultura convencional se utiliza una gran cantidad de pesticidas, que al igual que los MPs, tienen efectos dañinos al medio ambiente.

Su gran presencia en el ambiente convierte a los MPs y pesticidas en los principales contaminantes de interés emergente en el suelo, y considerando que su liberación es simultánea, ha sido de gran interés estudiar sus efectos conjuntos. Se ha reportado que la coexistencia de contaminantes en el ambiente puede producir efectos interactivos entre ellos. Los resultados del estudio de Cheng y colaboradores donde utilizaron la lombriz *Eisenia fetida*, sugiere que la exposición de microplásticos derivados de los mantos agrícolas tienen el potencial de aumentar la toxicidad de la atrazina en el ambiente del suelo a través de la inducción de estrés oxidativo y expresión anormal de genes Hsp70, ANN, TCTP y CRT en *E. fetida* (Cheng et al., 2020). Por otra parte, en el estudio de Dolar y colaboradores se expuso a *Porcellio scaber* a la coexposición entre MPs y el pesticida clorpirifós, donde la mezcla de ambos indujeron cambios que difirieron de las exposiciones individuales; los resultados sugieren que los procesos inmunitarios se modifican ligeramente tras la exposición a MPs y que estos pueden modular significativamente los efectos de otras sustancias químicas coexpuestas (Dolar et al., 2021).

1.1 HIPÓTESIS

Teniendo en consideración los efectos interactivos que se han reportado entre los contaminantes que están en coexposición en ciertas especies, se cuestiona la forma en la que estarán interactuando dos de los contaminantes más comunes de los suelos agrícolas de Chile en una especie clave del suelo como las lombrices. Es por esto, que esta investigación buscó responder la siguiente hipótesis: “existen efectos de interacción sinérgica entre los microplásticos y atrazina en *Lumbricus terrestris*.”

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Evaluar los efectos toxicológicos de la interacción entre microplásticos y atrazina en *Lumbricus terrestris*, a través de los cambios de actividad de los biomarcadores enzimáticos Acetilcolinesterasa (AChE) y Carboxilesterasa (CbE)

1.2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el material de MPs y su relación con atrazina.
2. Determinar los efectos de respuesta toxicológica de MPs y la atrazina por separado en las *Lumbricus terrestris*.
3. Determinar el efecto tóxico a la co-exposición entre MPs y el herbicida a través del uso de los biomarcadores.
4. Establecer si existe alguna relación causa-efecto que pueda responder a la pregunta de investigación del presente estudio a través del análisis estadístico de los datos obtenidos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plásticos

El uso del plástico ha sido una herramienta esencial para el desarrollo de la vida humana moderna, debido a su bajo costo, alta resistencia y gran versatilidad (Cole et al., 2011). Los plásticos son polímeros orgánicos y sintéticos, cuyos monómeros provienen del petróleo o del gas (Thompson et al., 2009). Algunos de sus usos son para envases, materiales sanitarios, artículos domésticos y materiales agrícolas (Kim et al., 2020). Algunos de los plásticos más comunes son el poliestireno (PS), el policloruro de vinilo (PVC) y el polietileno (PE), siendo este último el compuesto más común con una producción anual de más de 25 millones de toneladas. El PE de baja densidad es el principal componente de la película de manto en la producción agrícola (Garrido et al., 2019; Zahra et al., 2010).

En 2018 la producción global de plástico alcanzó alrededor de 360 millones de toneladas (Ya et al., 2021) y se estima que la liberación de plástico en el suelo es aproximadamente 4 a 23 veces superior que en los océanos. Debido a esta producción intensiva se calcula que al 2050 se habrán desechado 12 mil millones de toneladas métricas (Mt) en vertederos o en el medio ambiente (Geyer et al., 2017).

Una de las actividades humanas con importante aporte de desechos plásticos al medio ambiente es la agricultura convencional (Sanchez-Hernandez et al., 2021). La aplicación de biosólidos y compost como enmiendas del suelo, así como el uso de películas de plástico para el acolchado del suelo, cubiertas de invernaderos y túneles bajos, tubos de riego por goteo son las principales entradas directas residuos plásticos a suelos agrícolas (Espí et al., 2006; Sanchez-Hernandez et al., 2021; van den Berg et al., 2020). El plástico utilizado en estas prácticas se compone casi en su totalidad de PE o cloruro de polivinilo (PVC), pues son muy estables y no se degradan fácilmente en entornos naturales.

La tasa de recuperación del plástico es menor a 60%, por lo que se depositan grandes cantidades de plástico residual en los suelos agrícolas, resultando en la acumulación de microplásticos en este tipo de suelos (Horton et al., 2017; Steinmetz et al., 2016).

2.2 ¿Qué son los microplásticos?

Los MPs son pequeños fragmentos de plásticos formados a partir de la degradación de pedazos más grandes de plástico debido a su exposición a condiciones ambientales, a causa de descuidada disposición, o es producido directamente desde las industrias como un material de tamaño pequeño (Rillig et al., 2017). Existen distintas clasificaciones según tamaño del plástico, según Hanvey, los microplásticos se dividen en: grandes microplásticos (GMPs) con tamaños entre 1-5 mm y pequeños microplásticos (PMPs) de tamaños entre 1 μ m-1 mm (Arthur et al., 2009; Hanvey et al., 2017).

Los microplásticos pueden ser categorizados según fuente primaria o secundaria. Las fuentes primarias (o MPs primarios) tienen su tamaño desde el origen y contemplan: partículas de MPs utilizadas en limpiadores faciales para exfoliación, abrasivos de pastas de dientes, preparaciones cosméticas, residuos de producción de las plantas procesadoras de plástico, pinturas y textiles de las aguas residuales domésticas. Los MPs secundarios son partículas que resultan de la abrasión y desgaste de piezas más grandes de plástico, esta degradación puede producirse por factores como la fotodegradación, interacciones mecánicas, químicas o biológicas (Andrady, 2011; Barnes et al., 2009; Bele et al., 2021; Fendall and Sewell, 2009; Garrido et al., 2019; Gregory, 1996; Silva et al., 2018; Zitko and Hanlon, 1991).

Las fuentes de MPs en el compartimiento terrestre proceden principalmente de aportes antropogénicos como vertederos, riego con aguas residuales contaminadas con plásticos y escorrentía en carreteras. Las fuentes naturales están representadas por los aportes de la deposición atmosférica, desastres naturales, tormentas e inundaciones con agua de lagos o ríos contaminados. MPs primarios y secundarios pueden pasar por las plantas de tratamiento de aguas residuales y posteriormente ser transportadas por canales urbanos y ríos

hasta llegar a los cuerpos de agua dulce y marina (Raju et al., 2018; Wagner and Lambert, 2018). La aplicación de residuos orgánicos como los lodos de depuración, acolchado con plásticos, el uso de compost como fertilizantes es la principal fuente de MPs en suelos agrícolas, además se ha demostrado que fertilizantes orgánicos pueden actuar como transportadores para que los MP ingresen a los suelos (Blasing and Amelung, 2018; He et al., 2018; Pathan et al., 2020)

2.3 Efectos de los microplásticos

Los MPs se han transformado en un problema ambiental ya que producen efectos tóxicos en el suelo y tras su exposición provoca alteraciones fisiológicas que afectan principalmente los sistemas digestivo e inmunitario de los organismos (Sanchez-Hernandez, 2021; Sharifinia et al., 2020; Trestrail et al., 2020).

Los MPs poseen una superficie rugosa, alta porosidad, movilidad y elevada relación superficie/volumen (Pathan et al., 2020; Zhou et al., 2020b). Además, poseen propiedades de adsorción conferidas por sus estructuras superficiales y grupos funcionales, que permiten una adsorción eficaz de contaminantes peligrosos como antibióticos, bisfenoles, contaminantes orgánicos, pesticidas y patógenos (Dongxing et al., 2019; Liu et al., 2019b; Wu et al., 2020; Zhou et al., 2016; Zhou et al., 2020a). Esta interacción con contaminantes tiene un impacto más amplio en el ambiente, ya que el proceso de adsorción de MPs puede influir en la fotodegradación de los compuestos, lo que en última instancia altera el destino ambiental de los contaminantes (Chen et al., 2020a). Por otra parte, los complejos MPs/contaminante pueden exacerbar sus efectos nocivos en plantas y animales, ya que podrían inducir toxicidad combinadas para los organismos (Tang et al., 2021)

Estudios han demostrado que los contaminantes adsorbidos luego pueden ser desorbidos de los microplásticos en el medio ambiente o dentro de los sistemas digestivos de los organismos, lo que conlleva consecuencias para su tasa de crecimiento, reproducción y supervivencia (Bakir et al., 2014; Huerta Lwanga et al., 2017; Yu et al., 2018; Zhou et al., 2020a), por lo cual los MPs actúan

potencialmente como vectores en el transporte, transformación y la biodisponibilidad de contaminantes presentes en el medio ambiente.

Las propiedades físicas, químicas y morfológicas de los MPs pueden ser modificadas al estar expuestos durante largos periodos de tiempo a las condiciones climáticas, en un proceso llamado envejecimiento. En este proceso puede ocurrir la oxidación superficial fotoinducida, así como la aparición de redes macroscópicas de micro fisuras que provoca una mayor superficie que en los MPs prístinos (Hüffer et al., 2018; Kim et al., 2017; Larché et al., 2012; Mato et al., 2001; Pandey and Singh, 2001). Estos cambios en las propiedades físicas y químicas de la superficie de los materiales de PE envejecidos pueden provocar cambios en el comportamiento de adsorción de los MP con los contaminantes ambientales, por lo cual los efectos resultantes varían entre los estudios con uso de MPs prístinos y envejecidos (Li et al., 2018; Liu et al., 2019a; Liu et al., 2018; Müller et al., 2018).

Se ha identificado que los MPs destruyen la estructura del suelo y tienen repercusiones negativas en la capacidad de retención del agua del suelo (Liu et al., 2014a), además estos destruyen la actividad microbiana del suelo (perturban las comunidades bacterianas), alterando así los diferentes ciclos biogeoquímicos del suelo, transportando compuestos como pesticidas (su comportamiento de sorción puede diferir del de la materia orgánica y de los minerales de los suelos (Teuten et al., 2007)).

Durante el proceso de degradación en el suelo, los monómeros y aditivos de los MPs (retardantes de llama, colorantes, inhibidores de foto degradación, compuestos para aumentar la rigidez o flexibilidad) son fácilmente liberados, pudiendo llegar a los medios acuáticos por lixiviación (Horton et al., 2017). Además, pueden entrar fácilmente en la red alimenticia al ser ingeridos por animales debido a su pequeño tamaño (Zhu et al., 2018). La ingestión de fragmentos de plástico puede causar efectos adversos directos como la obstrucción del canal digestivo, abrasión y destrucción del epitelio, y lisis celular. Dependiendo del tipo, tamaño y forma de los fragmentos, también pueden haber efectos indirectos como el estrés oxidativo, inflamación y alteraciones metabólicas (An et al., 2021; Trestrail et al., 2020). Es así como los MPs afectan finalmente la fauna, estructura y funcionamiento del suelo y ecosistemas (Bandopadhyay et al., 2018; Boughattas et al., 2022; Cao et al., 2017; Hodson et al., 2017; Horton et al., 2017).

En cuanto a efectos sobre organismos del suelo, en general MPs de mayor tamaño muestran mayores efectos combinados con otros contaminantes sobre el crecimiento de las lombrices de tierra (Liu et al., 2022). Esto puede deberse a que los microplásticos de mayor tamaño causan daños físicos más graves a las lombrices de tierra, como por ejemplo dañar la piel y los celomocitos de las lombrices de tierra, aumentando así la acumulación de otros contaminantes. En cambio, los microplásticos de menor tamaño se excretan fácilmente (Liu et al., 2022), por lo que causan menos daños a las lombrices de tierra (Liu et al., 2022; Zhang et al., 2022).

En general la coexposición a MPs y otros contaminantes puede causar daños más graves a las lombrices de tierra, como el aumento de la acumulación de contaminantes, inhibición de las tasas de crecimiento, daño oxidativo agravado y cambios en la microbiota intestinal de las lombrices de tierra. Los MPs pueden causar daños físicos a las lombrices y alterar la biodisponibilidad de otros contaminantes favoreciendo su acumulación, sin embargo, en algunos casos la presencia de MPs puede paliar los efectos adversos de otros contaminantes, como la fuerte adsorción de otros contaminantes, lo cual reduce su biodisponibilidad. Hay que tener en consideración que los estudios se han

realizado en condiciones de laboratorio, con periodos de exposición relativamente cortos comparados con el ambiente, y las concentraciones utilizadas de MPs y otros contaminantes son usualmente mayores que las que se encuentran en el ambiente (Zhang et al., 2022).

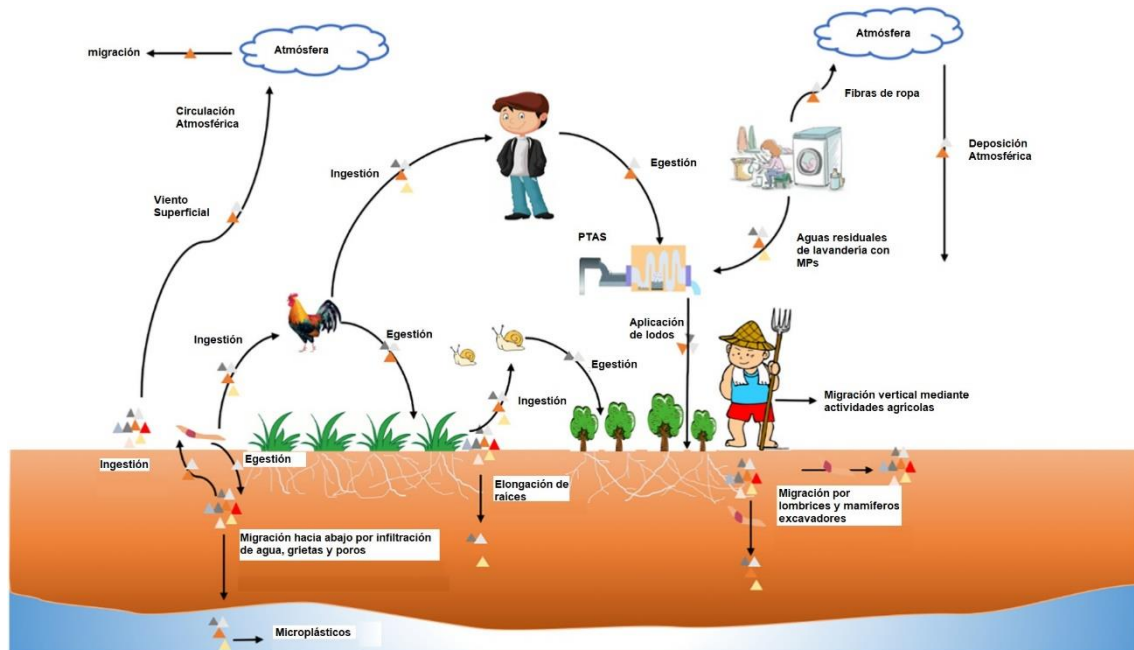


Figura 1: Procesos de migración de los microplásticos en el ambiente (Ya et al., 2021).

2.4 Agroquímicos

La mejora en las condiciones de vida ha aumentado la población, y por consiguiente también ha aumentado la demanda de alimento. Para cumplir con esta demanda, la actividad forestal y agropecuaria han utilizado agroquímicos como fertilizantes y pesticidas, estos últimos siendo los que controlan la propagación de malezas, insectos, parásitos, protegiendo a los cultivos de posibles daños. Es por esto que los plaguicidas cumplen un rol importante en proteger la salud pública (Cooper and Dobson, 2007; Muñoz-Quezada et al., 2014).

Los pesticidas son sustancias químicas tóxicas, por lo cual, a pesar de los beneficios que pueden entregar, su uso indiscriminado ha provocado una grave contaminación ambiental, resultando en la reducción de especies de plantas y animales terrestres y acuáticos, ya que se han contaminado con niveles tóxicos

los cuerpos de agua, aire y suelo (Helfrich et al., 2009; Lan et al., 2019; Mahmood et al., 2016).

2.5 Efectos de los pesticidas

Los pesticidas pueden unirse a la materia orgánica, a los mantos de PE agrícola (Nerin et al., 1996) o a la fracción mineral arcillosa del suelo (Bailey and White, 1964) lo que dificulta su extracción y caracterización (Calderbank, 1989).

A nivel de población los efectos de los plaguicidas dependen de la exposición y la toxicidad, factores como el ciclo biológico, las características, el momento de aplicación, la estructura de la población y la estructura del paisaje (Schmolke et al., 2010)

El uso de estas sustancias afecta la biota que reside en el suelo y las cuales le confieren las cualidades como la absorción de nutrientes, degradación de la materia orgánica y fertilidad del suelo, producen efectos tóxicos en lombrices de tierra ya que afectan los comportamientos alimenticios y su vitalidad.

Los plaguicidas liposolubles ingresan al cuerpo de los animales por biomagnificación y se absorben en los tejidos grasos, por lo que la persistencia de la sustancia en la cadena alimentaria es prolongada (Casabé et al., 2007; Mahmood et al., 2016; Man and Zucong, 2009). Los plaguicidas son emitidos de forma simultánea o secuencial, por lo que el número y la composición de las posibles mezclas son a menudo desconocidas y cambian en el tiempo (Hernandez et al., 2017). Esto puede producir que los efectos sean sinérgicos, es decir, el efecto toxicológico de las sustancias combinadas es mayor que el efecto esperado de la suma de toxicidades de cada una por separada (García Fernández and Navas Ruíz, 2020).

2.6 Atrazina

Dentro de los pesticidas más utilizados está la atrazina. La atrazina [2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina] es un herbicida sintético de triazina utilizado para eliminar las malas hierbas en viveros, praderas, campos de caña de azúcar, bosques y huertos frutales (Song et al., 2009). Es el segundo herbicida más utilizado en todo el mundo con un consumo anual de 70.000-90.000 toneladas, esto debido a su costo relativamente bajo y su alta eficacia en el control de malezas (Kumar et al., 2013; Pathak and Dikshit, 2012).

Debido a su uso prolongado, estabilidad, largo tiempo residual y movilidad la atrazina puede causar grave contaminación al medio ambiente y graves amenazas para la salud humana (Maqbool et al., 2016; Singh et al., 2018). Estudios han reportado que este herbicida puede inducir efectos nocivos en los ecosistemas acuáticos y terrestres, siendo detectada en el suelo, aguas subterráneas y superficiales (Graymore et al., 2001; Khan and Saidak, 1981). Debido a su omnipresencia puede entrar en el cuerpo humano a través de la cadena alimentaria y acumularse, dañando el sistema cardiovascular, alterando el equilibrio hormonal (disruptor endocrino) general y reproductivo e induciendo cáncer y mutaciones (Hincapié et al., 2005; Kucka et al., 2012; Wirbisky et al., 2016). Se reportó que la exposición a largo plazo de ATZ en seres humanos tuvo un efecto negativo en el sistema inmunitario humano (Agopian et al., 2013). El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) categorizó la atrazina en la lista de pesticidas carcinogénicos (Kucka et al., 2012; Liu et al., 2014b; Mahler et al., 2017).

La atrazina tiene gran potencial de contaminación de campos agrícolas, aguas subterráneas y superficiales, debido a su vida media de 41-231 días (Karlsson et al., 2016), baja adsorción en los suelos y moderada solubilidad acuosa. Tiene mayor movilidad que otros herbicidas, y se considera que las transformaciones bióticas son una de las principales vías de descomposición de la atrazina en la mayoría de los suelos (Kaufman and Kearney, 1970). Al ser catiónica, la atrazina tiene una alta afinidad molecular por los complejos arcilla-materia orgánica del suelo (Khan, 1978) y su sorción en los suelos se correlaciona positivamente con

el contenido de carbono orgánico (Barriuso et al., 1992; Park et al., 2004). La sorción de la atrazina a la materia orgánica disminuye su biodisponibilidad (Demon et al., 1994; Houot et al., 1998) lo que aumenta su persistencia a pesar de su susceptibilidad a la degradación abiótica y biótica (Radosevich et al., 1997).

La atrazina, como los productos químicos agrícolas, tiene el potencial de alterar la composición de especies, disminuir la diversidad y alterar las redes alimentarias (Lin et al., 2016a; Lin et al., 2016b). Se caracteriza por tener una alta toxicidad a organismos no objetivo, logrando la muerte completa o el retraso en el crecimiento, la translocación, absorción de las raíces o los brotes, alteración del fenotipo, mutación y la resistencia (Alla and Hassan, 2006; Burken and Schnoor, 1997). Las plantas objetivo y no objetivo expuestas a ATZ suelen sufrir estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (Alla and Hassan, 2006; Burken and Schnoor, 1997; Su and Zhu, 2006).

El principal modo de acción pesticida de las clorotriazinas es inhibir la fotosíntesis tras impedir la transferencia de electrones en el sitio reductor del complejo II de la fotosíntesis en los cloroplastos (Gysin and Knusli, 1960). La atrazina ha sido históricamente reconocida por ser un producto perturbador endocrino que tiene efectos en las vías de señalización del sistema neuroendocrino, sin embargo, es difícil definir estos mecanismos ya que hay muchos factores que desempeñan un papel en los resultados adversos observados, como el momento en que se produce la exposición, su duración y dosis. Son muchas las hormonas neuroendocrinas afectadas que juegan un papel en diferentes aspectos de la reproducción. La atrazina tiene efectos en el desarrollo de los organismos, así como en los organismos adultos maduros (Rayner et al., 2005; Wirbisky and Freeman, 2015). En general se sabe que la exposición a la atrazina afecta al eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG). Estudios han demostrado efectos negativos en el sistema reproductivo de ratas (Foradori et al., 2013; Laws et al., 2000) La ruta más común de exposición ambiental a este herbicida es a través de la ingestión de agua contaminada o por adsorción dérmica (Ochoa-Acuña et al., 2009; Rinsky et al., 2012).

La atrazina es estable a pH neutral, tiene una rápida hidrólisis en condiciones muy ácidas o alcalinas (Armstrong et al., 1967). En los suelos, la degradación de la atrazina es principalmente el resultado de la actividad microbiana a través de procesos co-metabólicos que conducen a la formación y acumulación de metabolitos de atrazina (Hickey et al., 1994; Scheunert, 1992), mientras que otros organismos obtienen nutrientes y energía al mineralizar completamente la atrazina a CO₂.

En 1992 la Unión Europea prohibió la atrazina ya que sus metabolitos tenían el potencial de persistir en los campos y aguas superficiales durante varios años (Bethsass and Colangelo, 2006; Nousiainen et al., 2015). A diferencia, según la declaración de ventas de plaguicidas del año 2019 emitida por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura de Chile, se comercializó un volumen de 92.966 litros de atrazina, siendo el 19° herbicida más vendido de la serie 3.000. Según las instrucciones de uso de los productos autorizados por el SAG y que son formulados con atrazina, las dosis de aplicación varían desde 2,0 L/Ha para cultivos como Maíz y Sorgo a 5,0 L/Ha para plantaciones de Pino, Ecuapiltus y malezas como el Cardo y Manzanillón (atrazina 90 WG autorización N°3.473, atrazina 500 SC autorización N° 3.467).

Tabla 1: propiedades de la atrazina

Propiedades de la atrazina

Fórmula molecular	C ₈ H ₁₄ ClN ₅
CAS	1912-24-9
Solubilidad en agua (26°C) [mg/L]	34,7
Log Kow	2,61
Log Koc	2,36
pKa	1,70
presión de vapor (25°C) [mm Hg]	2,89E-07
Vida media [días]	41-231

Fuente: (Hüffer et al., 2019; Karlsson et al., 2016)

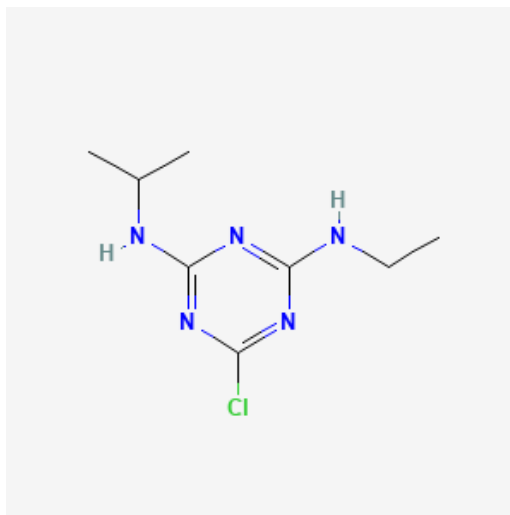


Figura 2: Estructura de la atrazina

2.7 Bioindicadores y Biomarcadores

Una forma de evaluar los efectos de los contaminantes (como los MPs y pesticidas) se utilizan bioindicadores. El término bioindicador puede definirse como “Un organismo que brinda información sobre las condiciones ambientales de su hábitat por su presencia o ausencia y su comportamiento (Van Gestel and Van Brummelen, 1996). Las lombrices son consideradas excelentes bioindicadores de la contaminación del suelo (Cortet et al., 1999; Lanno et al., 2004), pues ingieren grandes cantidades de suelo y materia orgánica por lo que están continuamente expuestos a los contaminantes (Morgan et al., 2004; Sanchez-Hernandez, 2006).

Los biomarcadores son cualquier respuesta biológica a nivel subindividual que indica la exposición a uno o más contaminantes y sus efectos tóxicos (Peakall, 1994). Los biomarcadores se utilizan para evaluar los efectos de los contaminantes, con el fin de distinguir la exposición a corto plazo de la exposición crónica, proporcionar una interpretación de las respuestas de los bioindicadores ya que pueden influir los factores fisicoquímicos y biológicos, y para establecer una relación causa-efecto entre los contaminantes y los efectos ecológicos (Hagger et al., 2006).

Sanchez-Hernandez clasifica los biomarcadores en cuatro grupos (Sanchez-Hernandez, 2006):

- Respuestas moleculares/bioquímicas: inducción/inhibición de enzimas, producción de genes mutantes, inducción de proteínas (metalotioneinas, proteínas de estrés), nivel de metabolitos.
- Respuestas fisiológicas: metabolismo, equilibrio hormonal, actividad locomotora, equilibrio hídrico/mineral
- Respuestas citológicas/morfológicas: fragilidad lisosomal, lesiones histopatológicas, índices macroscópicos.
- Respuestas conductuales: evitación, madrigueras, apareamiento, alimentación, migración a la superficie. Los cambios de comportamiento son el resultado de la integración de varios sistemas fisiológicos afectados por los contaminantes.

Los ensayos de toxicidad constituyen un elemento esencial del esquema de la evaluación de la exposición y efectos, y se utilizan para predecir los efectos agudos y/o crónicos de nuevas sustancias químicas antes de su liberación en el medio ambiente o para evaluar el impacto ecológico de una nueva fuente de emisión acuosa o atmosférica.

2.7.1 Biomarcadores para microplásticos

La exposición a xenobióticos puede aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno o hidrógeno y/o disminuir la respuesta antioxidante, resultando en el estrés oxidativo. La medición de los niveles de estrés oxidativo es utilizada en estudios sobre los mecanismos de toxicidad ambiental y ecotoxicidad en organismos expuestos a contaminantes (Bartoskova et al., 2013; Faggio et al., 2016; Regoli and Giuliani, 2014). Las enzimas utilizadas para el estudio de los efectos de los microplásticos son las implicadas en el estrés oxidativo: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión S-transferasa (GST) y malondialdehído (MDA) (Prokić et al., 2019).

2.7.2 Biomarcadores para pesticidas

La exposición a productos agroquímicos como los insecticidas organofosforados (OF) se suelen evaluar mediante la determinación de la inhibición de la acetilcolinesterasa en el tejido nervioso (Sultatos, 2006). En la lombriz de tierra la actividad de la acetilcolinesterasa es muy sensible a la inhibición por los OF (Booth et al., 2000) y muestra una recuperación extremadamente lenta cuando es inhibida drásticamente, en comparación a la actividad normal (Aamodt et al., 2007; Rault et al., 2008).

Las colinesterasas (ChE) pertenecen a una familia de enzimas que hidrolizan la acetilcolina en colina y ácido acético. Forman parte del grupo de las esterasas o hidrolasas de los enlaces tipo éster, es decir, los constituidos por la unión de ácidos orgánicos o inorgánicos con alcoholes o tioles de muy diferente naturaleza (SANZ and REPETTO, 1995). En este grupo participan la acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), también conocida como pseudocolinesterasa o colinesterasa plasmática (Massoulié et al., 1993).

La acetilcolinesterasa es una enzima clave en el sistema nervioso, ya que participa en la transmisión de los impulsos nerviosos catalizando la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (Fukuto, 1990). La AChE es el sitio objetivo de la inhibición de los pesticidas organofosforados y carbamatos. En particular, los pesticidas organofosforados inhiben la actividad de la enzima mediante la fosforilación covalente del residuo de serina dentro del grupo del sitio activo. Estos inhiben de forma irreversible la AChE, lo que da lugar a una acumulación excesiva de acetilcolina, que conduce a la hiperactividad y, como resultado a la parálisis del sistema neural y muscular. La consecuencia del bloqueo del metabolismo de la acetilcolina es su acumulación en la hendidura sináptica y la alteración de la transmisión del impulso nervioso. Aunque los insecticidas organofosforados y carbamatos son los más conocidos, otras sustancias químicas también pueden inactivar esta enzima (Lionetto et al., 2011)

Las carboxilesterasas (CbEs) son un grupo de enzimas serina hidrolasas presentes en tejidos de vertebrados e invertebrados, capaces de hidrolizar una amplia variedad de ésteres (Picco et al., 2010), participan en el modo de acción

tóxica y en la desintoxicación de los plaguicidas OF por lo cual son utilizadas como biomarcadores de su exposición (Vejares et al., 2010). Son frecuentemente más sensibles a la inhibición de OF que las colinesterasas (Wheelock et al., 2008). En las lombrices de tierra están presentes múltiples isozimas de CbE (Haites et al., 1972) y muestran sensibilidad tejido-dependiente a los OF (Sanchez-Hernandez et al., 2009; Sanchez-Hernandez and Wheelock, 2009) que son particularmente abundantes en el intestino de las lombrices de tierra (Prentø, 1987).

La toxicidad aguda de los OF se debe a la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasas (EC 3.1.1.7), asimismo el sitio activo de la carboxilesterasa (EC 3.1.1.1) se unen a las moléculas de OF lo que conduce a su inactivación (Sanchez-Hernandez et al., 2018b; Sogorb and Vilanova, 2011).

En particular, las carboxilesterasas detoxifican los pesticidas OF por detoxificación no catalítica, esta detoxificación se produce por fosforilación del sitio activo de la carboxilesterasa por el metabolito oxón de los pesticidas OF (altamente tóxico), formando un complejo enzima-inhibidor estable y en consecuencia inactivando el pesticida. Este mecanismo de detoxificación es eficiente siempre que los OF se bioactiven previamente a sus metabolitos oxónicos (análogos del oxígeno), en esta configuración química los OF muestran una mayor afinidad por los sitios activos de las colinesterasas y carboxilesterasas en comparación con sus químicos originales (Chambers et al., 2010; Wheelock and Nakagawa, 2010). En *Lumbricus terrestris* se utiliza la variación de actividad de carboxilesterasa como biomarcador de exposición a OF en los tejidos digestivos (Sanchez-Hernandez et al., 2018b), musculo de la pared corporal y órganos reproductivos (Vejares et al., 2010)

Los plaguicidas también alteran las enzimas implicadas en el estrés oxidativo como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión-S-transferasa las cuales son utilizadas como biomarcadores (Booth et al., 2001; Schreck et al., 2008; Wang et al., 2012).

Los biomarcadores de comportamiento o efecto se utilizan como herramienta complementaria para evaluar los suelos contaminados con agroquímicos

(Marques et al., 2009), sin embargo, estudios han demostrado que no son tan sensibles a los OF en lombrices (García-Santos and Keller-Forrer, 2011; Hodge et al., 2000), debido al mecanismo estequiométrico de detoxificación de OF comparten el mismo grupo de enzimas esterasas que el mecanismo de acción tóxica de los OF. Según Morcillo et al 2013, la ausencia de la respuesta de evasión no indica que las concentraciones de plaguicidas OF sean inocuas para las lombrices, y la inhibición de AChE no implica una respuesta de evasión (Morcillo et al., 2013)

Otro biomarcador es la producción de eyecciones (fecas), es un indicador de la actividad de la lombriz, el clorpirifós ha demostrado inducir una disminución significativa de la producción de eyecciones en *Aporrectodea caliginosa* (Capowiez et al., 2010). Los rangos de ingestión son utilizados como un biomarcador, para determinar si son reducidos después de tratamientos a exposición con pesticidas. En cuanto a biomarcadores fisiológicos, está el cambio en la biomasa que puede ser una indicación de la salud general del bioindicador.

Biomarcadores utilizados en lombrices (*Eisenia foetida*) expuestas a herbicidas son la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST Y POD), acumulación de especies reactivas de oxígeno y daño al ADN y cambios en la expresión genética (Cheng et al., 2020; Song et al., 2009)

2.8 *Lumbricus terrestris*

La lombriz *Lumbricus terrestris* pertenece al grupo de los lumbrícidos anécicos, es decir, viven alternando entre la superficie y la profundidad. Poseen respiración cutánea y se reproduce mediante huevos llamados cocones (Butt et al., 1992). Es un macroinvertebrado considerado especie clave presente en los suelos naturales pues son capaces de llevar a cabo diversas funciones sobre la estructura del suelo y la degradación de la materia orgánica (Edwards and Lofty, 1972). La especie de *L. terrestris*, ha sido estudiada como bioindicador de la

contaminación de suelos. Generalmente se encuentran en suelos alcalinos con pH entre 6.2-10.0 y son muy abundantes en suelos de tipo arcilloso (Mamani Alejo, 2019; Sims and Gerard, 1999). Su sistema nervioso central consiste en un par de ganglios suprafaríngeos, poseen receptores conductores y efectores (Hess, 1925).

Es un importante contribuyente al desarrollo de trayectorias de flujo preferencial en los suelos ya que tiende a crear madrigueras verticales que están abiertas en la superficie y pueden extenderse a una profundidad de 3 m (Lee, 1985). La cantidad de suelo que pasa por sus cuerpos anualmente puede equivaler a 6,3 ton de tierra seca por hectárea (Mosleh et al., 2003).

Esta lombriz de tierra anécica ingiere suelo mezclado con materia orgánica y se alimenta de hojarasca y restos vegetales de la superficie del suelo, incorporando la materia orgánica al arrastrarla a su madriguera y creando focos de actividad microbiana (Griffith et al., 2013; Jouquet et al., 2006). Por su forma de alimentación, se plantea que la exposición a plaguicidas tiene lugar principalmente por la ingestión de plantas y suelo contaminado, estas también dependen del apoyo enzimático de los simbiontes microbianos que habitan en su lumen gastrointestinal y los del suelo ingerido para afrontar los procesos digestivos (Drake and Horn, 2007; Sanchez-Hernandez et al., 2018b). Las lombrices de tierra pueden absorber compuestos orgánicos a través de la piel y de la ingestión de partículas del suelo, siendo esta última la principal para cuando el log K_{ow} de los compuestos orgánicos es mayor a 5 (Jager et al., 2003; Miao et al., 2018). Luego de la ingestión estos materiales pasan a través del cuerpo de las lombrices y se depositan más profundamente en el perfil del suelo en forma de eyección (Lee, 1985).

Los efectos de *L. terrestris* en las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos influyen en la persistencia, biodisponibilidad y transporte de los plaguicidas (Gilman and Vardanis, 1974; Stenersen et al., 1974). En suelos de siembra directa con grandes cantidades de residuos de cultivos en la superficie, se encontró que más de dos tercios de los herbicidas aplicados fueron interceptados por los residuos de cultivos y la vegetación viva, por lo que se

deduce que es probable que *L. terrestris* traslade una parte importante de estos herbicidas al suelo enterrando los residuos de los cultivos, o ingiriendo y luego egestando estos materiales en profundidad en forma de excrementos (Farenhorst et al., 2000; Isensee and Sadeghi, 1994)

Las galerías aumentan la aireación, el drenaje del suelo y permite el transporte desde la parte inferior del suelo hacia la superficie. También produce eyecciones y middens (montículos de suelo mineral, eyecciones y material orgánico a la entrada de la madriguera) estimulando así la proliferación microbiana (Edwards, 2004), estas acciones estimulan las enzimas del suelo asociadas a la descomposición de materia orgánica y al ciclo de los nutrientes, mejorando la estructura y propiedades del suelo (Dempsey et al., 2013; Kizilkaya et al., 2011; Pelosi et al., 2014; Tao et al., 2009). A través de las galerías se infiltra agua y contaminantes (Worrall et al., 1997) hacia capas más profundas del suelo a las aguas subterráneas (Tomlin et al., 1993). Cuando hay pesticidas presentes en el suelo las madrigueras disminuyen en volumen afectando la infiltración a nivel de ecosistema (Dittbrenner et al., 2011).

Los microplásticos y los agroquímicos son contaminantes muy comunes en el ecosistema terrestre y su interacción puede influir en sus destinos y efectos sobre los organismos terrestres (Dolar et al., 2021), afectando los comportamientos de *L. terrestris* debido a su exposición continua. Por su forma de alimentación los plaguicidas también pueden alterar los procesos de digestión y procesos de asimilación de nutrientes (Sanchez-Hernandez et al., 2018b). El tegumento y su tracto gastrointestinal son las principales rutas de ingreso de los contaminantes al medio interno de la lombriz (Vijver et al., 2005).

El estudio de Huerta Lwanga demuestra que las lombrices se ven impactadas negativamente ante la presencia de microplásticos, presenta disminución en tasas de crecimiento y aumento de la mortalidad. *L. terrestris* incrementa el transporte de microplásticos desde la superficie hasta capas más profundas del suelo al formar las madrigueras; al estar expuestas a microplásticos la lombriz transporta más materia orgánica a las madrigueras resultando en paredes más densas, por lo que absorben más contaminantes (Endo and Koelmans, 2016;

Koelmans et al., 2016), por lo que los contaminantes pueden estar más disponibles para las plantas y otros organismos (Lwanga et al., 2016).

Sus funciones de formación del suelo y descomposición de la materia orgánica, además de su alta sensibilidad a contaminantes, ha dado paso a que las lombrices de tierra sean consideradas como indicadores del uso de tierra y la fertilidad de la tierra (Paoletti, 1999). Su interacción profunda con el suelo hace que sean afectadas gravemente ante el uso de sustancias tóxicas, por lo cuales las lombrices de tierra han sido utilizadas como bioindicadores convenientes de la contaminación del suelo (Cortet et al., 1999; Lanno et al., 2004).

Tabla 2: Efectos tóxicos de los microplásticos en lombrices de tierra (extraído de Ya et al., 2021)

Efectos tóxicos de los microplásticos en lombrices de tierra

Referencia	Especie	Tipo de MP	Abundancia del MP	Tamaño de la partícula de MP	Tiempo de exposición (días)	Efecto
(Chen et al., 2020b)	<i>Eisenia fetida</i>	LDPE	0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 g/kg	<400 µm	28	MP a una concentración de 1.0 g/kg causó daños en la superficie de <i>Eisenia fetida</i> , desencadenando estrés oxidativo y estimulación de reacciones neurotóxicas
(Kwak and An, 2021)	<i>Eisenia andrei</i>	PE	1000 mg/kg	180-212 µm, 250-300 µm	21	MP afectaron la actividad de los celomocitos, y hubo daño en los órganos reproductores masculinos (más graves que en hembras)
(Prendergast-Miller et al., 2019)	<i>Lumbricus terrestris</i>	poliéster	0, 0.1, 1.0%	361.6 µm	35	La ingestión de MP no tuvo efectos fatales y no mostraron evitarlos
(Lwanga et al., 2018)	<i>Lumbricus terrestris</i>	LDPE	7%	< 150 µm	60	Las bacterias aisladas del intestino de <i>L. terrestris</i> podían degradar el 60% de los microplásticos y producir nanoplasticos
(Rodríguez-Seijo et al., 2018)	<i>Eisenia fétida</i>	LDPE	62, 125, 250, 500, 1000 mg/kg	250-1000 µm	28	La exposición a MP provocó cambios en el estrés oxidativo y en el metabolismo energético
(Rodríguez-Seijo et al., 2017)	<i>Eisenia andrei</i>	PE	0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 mg/kg	250-1000 µm	56	No hubo diferencias significativas en el número medio de larvas de lombriz en los tratamientos
(Cao et al., 2017)	<i>Eisenia fétida</i>	PS	0.25-2%	58 µm	30	Concentraciones de 1% y 2% p/p de MP inhibieron el crecimiento y aumentaron la mortalidad

Lwanga et al., 2016	<i>Lumbricus terrestris</i>	PE	7%, 28%, 45% y 60%	<150 µm	60	La mortalidad aumentó en MP 28%, 45% y 60% después de 60 días de exposición y se redujo la tasa de crecimiento.
----------------------------	-----------------------------	----	--------------------	---------	----	---

3. METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo desde agosto de 2022 a abril de 2023 en los laboratorios de suelos de la Facultad de Agronomía y laboratorio de Biomarcadores del Centro EULA de la Universidad de Concepción. Para la realización de los objetivos propuestos se utilizó la siguiente metodología:

3.1 Reactivos y materiales

Para la realización del estudio se utilizó atrazina (Sigma, CAS:1912-24-9; C₈H₁₄ClN₅), polietileno (PE), 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB)(Sigma), albúmina de suero bovino (BSA)(Sigma), solución buffer de fosfato de sodio, Acetilcolina yodada (AcSCh) (Sigma), reactivo de Biuret (Diprolab), Tritón X-100, SDS, Buffer tris-HCl, acetato de naftilo, Fast Red ITR salt (Sigma), botellones, matraces, tubos de vidrio.

3.2 Suelo

El suelo utilizado en este estudio fue extraído en agosto del año 2022 del fundo agrícola Santa Carmen, Los Ángeles, Chile. Este predio agrícola posee manejo orgánico (libre de aplicación de pesticidas) desde 8 años previo a la utilización en este estudio. Se recolectaron un total de 160 kg de suelo usando palas de acero inoxidable, mezclado y transportado en recipientes plásticos. El muestreo se realizó de forma aleatoria, donde se recogieron numerosas muestras a una profundidad de 10-15 cm, en los mismos lugares de los que se recolectaron las lombrices. Estas muestras fueron almacenadas en recipientes plásticos y conservadas a temperatura ambiente. Se determinarán algunas propiedades físicas y químicas como clasificación del suelo según granulometría, contenido de humedad, contenido de materia orgánica, temperatura y el pH, debido a que estudios han demostrado que estas características influyen en el crecimiento, salud y supervivencia de lombrices de tierra (Capowiez et al., 2010; Hallam and Hodson, 2020; Lwanga et al., 2016; Perreault and Whalen, 2006). El objetivo de la investigación es evaluar los efectos de MP y los agroquímicos por lo cual se quiere eliminar cualquier otro estresor dentro del estudio.

Para la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del suelo se utilizaron 3 muestras. El suelo muestreado contenía raíces.

3.2.1 Caracterización propiedades fisicoquímicas del suelo

3.2.1.1 Granulometría

El análisis granulométrico de las muestras de suelo fue realizado con un analizador de partículas por difracción láser (Mastersizer 3000, Malvern Panalytical), para medir el tamaño de partícula y la distribución de tamaño. Para esto se utilizó aproximadamente 2 gramos de muestra con agua destilada para su disolución, se pasó por un tamiz de 2 mm, se agregó una pequeña cantidad de muestra con una pipeta en un vaso precipitado (500 mL) con agua común como dispersante

3.2.1.2 Porcentaje de humedad

Para evaluar la humedad, se utilizó la determinación de humedad gravimétrica, para lo cual se tomaron 3 muestras de suelo en capsulas metálicas, se pesaron cada una de las capsulas por si solas y luego con la muestra húmeda, estas luego fueron puestas al horno durante 24 horas a una temperatura de 105°C. Luego de transcurridas las 24 horas se pesó el recipiente con la muestra seca.

La medición se hará mediante la relación donde la humedad del suelo es la relación expresada en porcentaje entre el peso del agua existente en la masa de suelo y el peso de las partículas sólidas:

$$w (\%) = \frac{P_{agua}}{P_{suelo\ seco}} * 100$$

Donde:

w= humedad gravimétrica del suelo (%)

P_{agua}= peso del agua existente en la masa de suelo

P_{suelo seco}= peso de las partículas sólidas

3.2.1.3 Materia orgánica

Para determinar la cantidad de materia orgánica de las muestras de suelo se basó en “Métodos de Análisis recomendados para los suelos Chilenos” (2004) Método 1.1 Preparación de las muestras y Método 7.2 pérdida por calcinación.

La cantidad de materia orgánica se calculará como la diferencia entre el peso inicial y el final dividido por el peso de la muestra inicial multiplicado por 100%.

3.2.1.4 pH

El pH del suelo se determinó mediante el Método 3.1 suspensión y determinación potenciométrica de “Métodos de Análisis recomendados para los suelos Chilenos” (2004).

3.2.1.5 Fósforo Total

El fósforo total se determinó a través de “Espectroscopia de absorción molecular ML Jackson, “análisis Químico de suelos” (1976)

3.3 Prueba de adsorción a superficie de MP

3.3.1 Obtención y preparación de los MPs

Para realizar el estudio se utilizó plástico tipo polietileno (PE) de baja densidad negro, debido a que es de uso común en la agricultura. Este plástico fue limpiado con alcohol 70°, luego fue secado y triturado mecánicamente mediante un homogeneizador ultra turrax® (IKA, Alemania) con agua ultrapura para ser reducidos a partículas de menor tamaño, luego fueron tamizados mediante un tamiz de 2 mm para asegurar que estuvieran en el rango correcto de medida según la definición de MPs, fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente almacenados. Para conocer la distribución de tamaño de las partículas, se utilizó el equipo MasterSizer 3000.



Figura 3: Molienda de PE a MPs con homogeneizador ultraturrax.

3.3.2 Capacidad de adsorción a superficie de MPs

Para medir la capacidad de adsorción de la superficie de los microplásticos para atrazina se realizó un experimento. La prueba contempló el uso de 10 botellas de vidrio con 100 mL de solución a atrazina concentración 0,5 mg/L con una cantidad definida de microplástico. Las botellas se mantuvieron 14 días en agitación a 40 rpm para ver los posibles cambios de concentración remanente en la solución.

De las 10 botellas, a 6 se le adicionó una muestra de microplástico de 2% p/v (2 g) y se realizó muestreos en duplicados a los 2, 7 y 14 días. A 2 botellas se le agregó una muestra de microplástico de 5% p/v (5 g) y se muestreó en duplicados a los 7 y 14 días, mientras que las dos botellas restantes correspondientes a control se realizaron muestreo en duplicados a los 2, 7 y 14 días. Finalmente se obtuvieron 16 muestras, las cuales se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su posterior análisis.

La solución utilizada en el test de adsorción se realizó a partir de una solución stock de atrazina de formulación analítica (Sigma®, >/ 98,0% pureza) de concentración 40,04 mg L⁻¹. De la cual se extrajo 12,487 mL y se mezcló con agua para obtener la solución de 0,5 mg/L.

La concentración remanente del agroquímico se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cantidad de agroquímico adsorbida en los

MPs fue calculada utilizando un balance de materia entre la solución inicial y la final determinada en cada experimento:

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{M}$$

Donde:

q_e = masa de contaminante adsorbida

V = volumen de la solución

C_0 = concentración inicial del contaminante en la solución

C_e = concentración del contaminante en el equilibrio en solución

M = masa de microplástico

3.4 Diseño Experimental

El estudio está estructurado bajo cuatro condiciones (tratamientos): 1) Control 2) Exposición atrazina 3) Exposición a los microplásticos y 4) exposición a la combinación (MP+ATZ). Este último tiene como objetivo determinar el efecto tóxico de microplásticos en co-exposición en *L. terrestris*.

3.4.1 Organismos y contaminación del suelo

Para llevar a cabo el estudio se realizó un bioensayo de exposición adaptado desde lo establecido por la organización internacional de normalización (ISO 2008), teniendo en consideración los estudios desarrollados por (Araneda et al., 2016; Baeza et al., 2020; Boughattas et al., 2022; Cheng et al., 2020; Lwanga et al., 2016; 2017; Sanchez-Hernandez et al., 2018b; Song et al., 2009).

Se utilizó como bioindicador a *Lumbricus terrestris*, obtenidas del Fundo Agrícola Santa Carmen (Los Ángeles, Chile, -37.47159915939796, -72.49690296508834). Los ejemplares recogidos desde el fundo se encontraban en distintos estados de madurez, por lo cual, se mantuvieron en aclimatación en el laboratorio ($17^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$ y oscuridad permanente) en una caja plástica (50 x 37,5 x 29,5 cm) durante 2 meses previo a la realización del bioensayo, en el mismo suelo orgánico que se recolectó del lugar (con más de 10 cm de profundidad). Fueron alimentados una vez por semana con 2 gramos de abono, el cual fue desparramado en la superficie.

Para contaminar el suelo a utilizar en los tratamientos de ATZ y en combinación, se realizó una solución de ATZ a partir de la misma formulación utilizada en la prueba de adsorción. La contaminación se realizó de la siguiente manera: 1 kg de suelo húmedo se extendió homogéneamente en una bandeja de aluminio hasta lograr una altura de 0,5 cm y fueron rociados con 25 mL de la solución de 0,5 mg/L de ATZ (obtenida al extraer 312 μ L de la solución stock utilizada para el test de adsorción), resultando una concentración final de 0,5 mg ATZ kg^{-1} de suelo húmedo, y una humedad final de 60% como en (Salazar-Ledesma et al., 2018; Sanchez-Hernandez et al., 2018a). Para asegurar la extracción de todo el herbicida de la jeringa utilizada para rociar la solución, esta se enjuagó con 2 mL de agua ultra pura y se roció en el suelo. Luego el suelo fue dispuesto en un recipiente, tapado y agitados por 3 minutos para asegurar la homogeneización completa. Este procedimiento se realizó para los 12 kg de suelo. Luego de contaminado el suelo con ATZ, se dejó estabilizar por 48 horas en vasos precipitados de vidrio (n=6) a 20°C, en este punto termina la manipulación del suelo para el tratamiento de exposición con ATZ (n=6).

Luego de las 24 horas de estabilización del suelo con ATZ, para los tratamientos de exposición combinada (n=3), se extendió los 980 gr de suelo contaminado (S.C) de cada vaso precipitado en la bandeja y se agregó la concentración de MP (PEBD; 2,0% p/p; 20 g de masa seca) y se agitó por 3 minutos para asegurar la homogeneización, siguiendo el ejemplo de (Dolar et al., 2021).

Para los controles se extendió suelo orgánico en bandejas y se roció con 25 mL kg^{-1} de agua ultrapura. En el tratamiento de exposición a MP se extendieron 980 gr de suelo orgánico (S.O), se agregó el 2% p/p de MP y se roció con 25 mL kg^{-1} de agua ultrapura, se puso en agitación por 3 minutos para homogeneizar y se dejó en estabilización.

Mientras se llevó a cabo el equilibrio del suelo contaminado, se dispusieron las lombrices adultas en placas de Petri, se mantuvieron a 16°C y en oscuridad total sobre un papel húmedo para permitir el vaciado intestinal y así eliminar todos los restos nutricionales del tracto gastrointestinal y luego se registró el peso corporal (t= día 0)

La concentración a utilizar en este estudio se escogió teniendo en consideración las investigaciones de Cheng y colaboradores donde se expuso a *E. foetida* a una concentración de 0,02 mg/kg de ATZ y 0,25% p/p de PEBD (Cheng et al., 2020) y considerando el estudio de Hudu y colaboradores en el que se expuso a *L. terrestris* a concentraciones de 0,05 mg/kg de ATZ en el cual se reportaron muertes (Hudu et al., 2021).

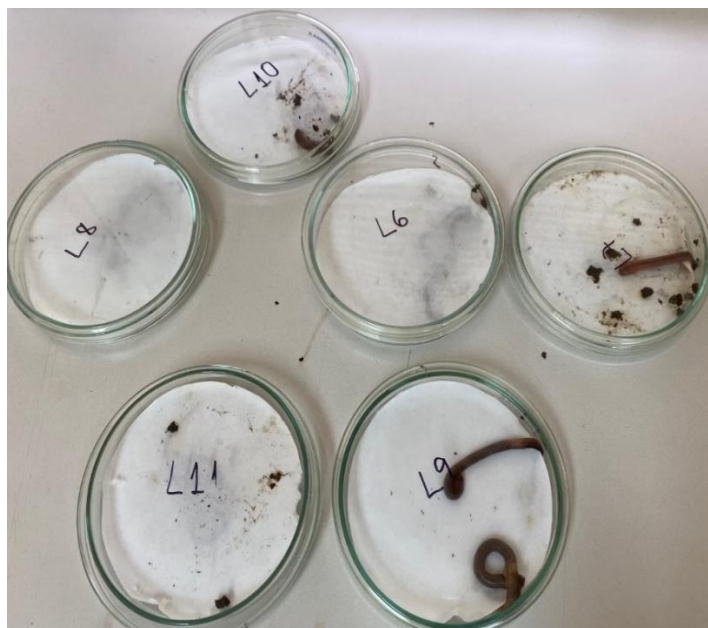


Figura 4: imagen de lombrices al final de las 24 horas de vaciado intestinal.

3.4.2 Bioensayo de exposición

Para la realización del bioensayo se seleccionaron los ejemplares en estado de madurez, es decir, los que contaban con un clitelo bien desarrollado, con tamaños y pesos parecidos. Una vez depuradas y posteriormente registrado su peso, se liberaron 5 lombrices a los vasos precipitados de acuerdo con cada tratamiento experimental y luego los contenedores fueron incubados por 42 días a temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ en oscuridad (Perreault and Whalen, 2006; Shi et al., 2016; Stellin et al., 2018; Zhu et al., 2020).

Un kilogramo del suelo previamente contaminado con microplásticos y atrazina fue añadido a cada vaso precipitado de 1000 mL con orificios en el fondo para permitir aireación para los tratamientos en condiciones de combinación ($n=3$). Para los tratamientos de exposición a microplásticos se añadió 980 g de suelo

con 20 g de MP (n=3); para los tratamientos de exposición a ATZ se añadió 1 kg de suelo contaminado previamente con 0,5 mg de ATZ y para los controles se agregó la misma cantidad de agua desionizada que la que se utilizó para contaminar con la solución de atrazina.

Todos los vasos precipitados se dispusieron sobre rejillas metálicas para permitir la aireación por la parte baja y también se sellaron con papel aluminio agujereado para evitar que las lombrices se escaparan y también para permitir el intercambio de aire. Las lombrices se alimentaron cada semana, añadiendo 2 g de guano de caballo (orgánico) en la superficie de cada vaso del ensayo. Tras 42 días de incubación, se retiraron las lombrices, se enjuagaron con agua desionizada y se mantuvieron sobre papel filtro húmedo en placas de Petri durante 24 horas para recoger las eyecciones frescas. Posteriormente se registró el peso de las lombrices luego de la depuración para evaluar el cambio de peso corporal durante el periodo de incubación.



Figura 5: Vasos precipitados con suelo del tratamiento control.

3.4.3 Concentración de atrazina en muestras de suelo

Para asegurar que la homogeneización fue exitosa, se extrajeron 3 muestras de suelo de distintos vasos precipitados del tratamiento de atrazina. Se utilizó el método de extracción asistida por ultrasonido, este consistió en tomar una muestra de 5 g del suelo (extraídas del vaso 13, 14 y 18) y un control, se dispusieron en botellas de vidrio con 10 mL de metanol y se pusieron 15 minutos en baño ultrasónico. Luego fueron dispuestas en tubos y puestas a centrifuga 2500 rpm por 7 minutos. El sobrenadante fue puesto en los viales del evaporador Rocket Synergy (Fig. 6), para concentrar las muestras, por 1 hora hasta secar, luego se le agregó 1 mL de metanol, las muestras fueron filtradas y dispuestas en viales para ser analizadas por HPLC.

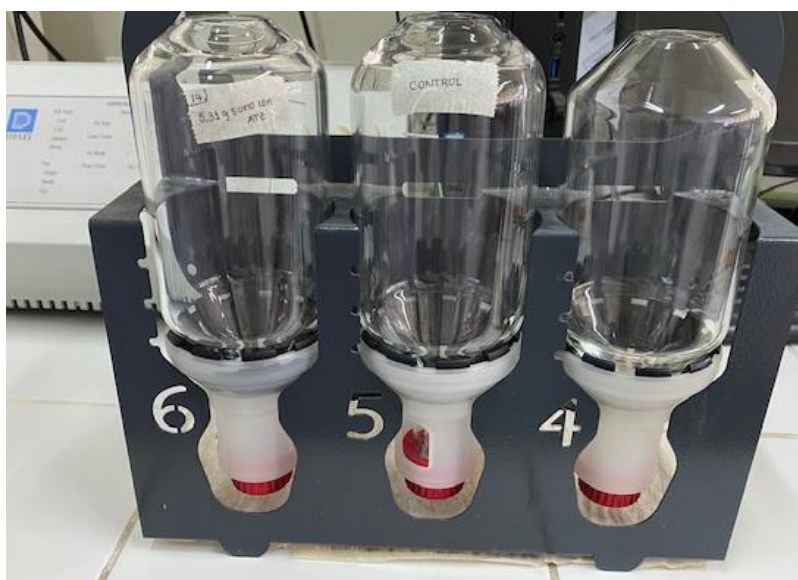


Figura 6: muestras en viales evaporador Rocket.

3.4.4 Lombrices y disección de tejidos

Al final del periodo de exposición las lombrices fueron removidas del suelo, limpiadas cuidadosamente con agua destilada, secada, y dispuestas en placas Petri con papel filtro humedecido por 24 horas para un nuevo vaciado intestinal, en el cual se guardaron las eyecciones para posterior análisis. Luego fueron determinados sus pesos frescos.

Las lombrices fueron dispuestas en tubos Falcon y fueron congeladas a -80°C hasta el momento de la disección. Esta disección se realizó longitudinalmente,

removiendo vesícula seminal/receptáculos seminales (VS), el buche y la molleja (BM), intestino anterior (IA), intestino medio (IM) y músculo de la pared (a la altura del intestino anterior y posterior) (PM).

Los órganos fueron lavados cuidadosamente con agua ultrapura para eliminar partículas de tierra, fueron dispuestos en tubos Eppendorf de 2,5 mL y se mantuvieron en hielo (Sanchez-Hernandez and Wheelock, 2009). Estos tejidos se homogeneizaron con un ultraturrax pequeño en 300 µl (para vesícula seminal/receptáculos seminales) y 250 µl (demás tejidos) de tampón Tris-HCl 25 mM (pH=8.0) frío que contenía 0,1% de Triton X-100. Estos fueron centrifugado a 10000 rpm a 4°C por 30 min (Mikro 220 R, Hettich, Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante (fracción post-mitocondrial) fue transferido a otro tubo nuevo y almacenado a -80°C hasta el análisis enzimático.

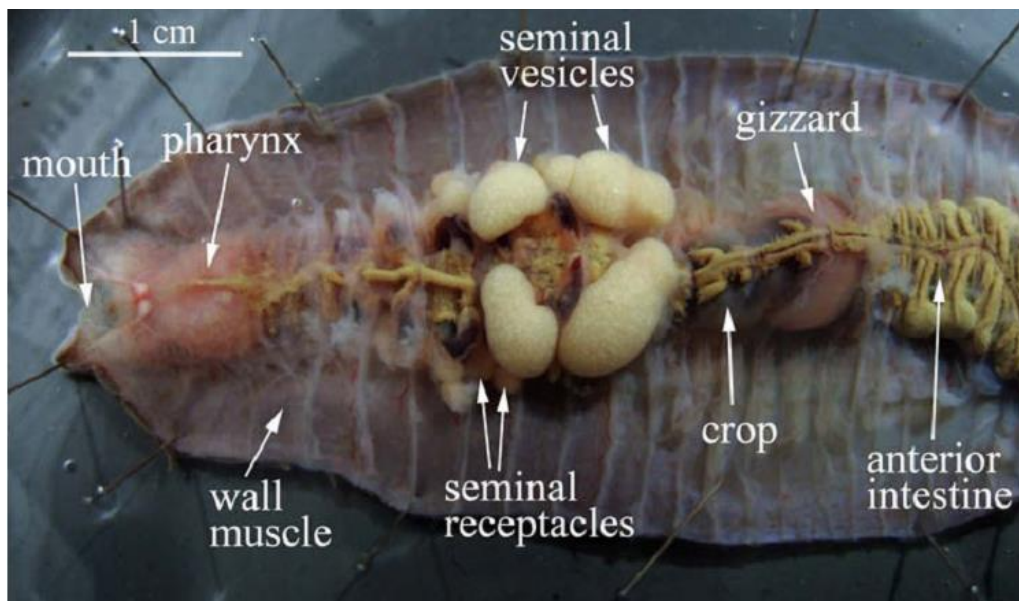


Figura 7: imagen de los órganos de Lumbricus terrestris (Sanchez-Hernandez and Wheelock, 2009)

3.4.5 Actividad de la acetilcolinesterasa

La actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) fue determinada con el método de Ellman (Ellman et al., 1961) con adaptaciones al formato de microplacas de Wheelock (Wheelock et al., 2005). La reacción enzimática se realizó en microplacas de fondo plano de 96 pocillos. A cada pocillo se añadieron 50 μl de muestra sin diluir y 130 μl de buffer fosfato de sodio (0,1 M a pH=8) que contenía 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) (Sigma). Después de 5 minutos se le añaden 20 μl de Acetiltiocolina yodada (AcSCh) (Sigma) 60 mM para la reacción. La cinética se leyó durante 10 minutos (intervalos de 1 minuto) a 412 nm y a temperatura ambiente (22°C) en un lector de microplacas. La actividad específica la colinesterasa se expresó como μmol de producto $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína total. La cantidad de proteínas se calculó sobre la base de la curva de calibración con albúmina de suero bovino utilizando el método de Biuret (Dirpolab) (Gornall et al., 1949). (Sanchez-Hernandez et al., 2018b)

3.4.6 Actividad de Carboxilesterasa

De la fracción sobrenadante de tejido postmitocondrial almacenada a -80°C, se realizaron diluciones 1:50 con tampón Tris-HCl pH=7,4. La actividad de la carboxilesterasa se realizó determinando la absorbancia del complejo rojo ITR-naftol a 530 nm en un medio de reacción con 200 μL de volumen final (Thompson, 1999, adaptado por Narváez et al., 2016); a continuación, se calculó la actividad enzimática en función del contenido proteico individual de cada muestra. El procedimiento consistió en colocar 10 μL de muestra en la microplaca de fondo plano de 96 platos (TCL, Trueline, Santiago, Chile), añadir 170 μL de solución de Tris-HCl 25 mM con CaCl_2 1 mM (pH 7,6), y añadir 20 μL de sustrato de acetato de α -naftilo (Sigma) después de un período de incubación de 5 minutos a 25 °C. La formación de naftilos se detuvo después de 15 minutos cuando se añadieron 50 μL de la mezcla 5% Triton X-100 (1,25 mL), 5% SDS (1,25 g), y 20 mg de Fast Red 0,1% (Sigma). La solución se dejó reposar en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente (20 °C). A continuación, se realizó un análisis espectrofotométrico en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, Winooski, Vermont, EE.UU.). El contenido proteico de cada muestra de tejido de lombriz se cuantificó por el método de Biuret (Diprolab) (Gornall et al., 1949) utilizando el estándar de albúmina de suero bovino. Este valor se utilizó

para calcular la actividad enzimática específica en $\mu\text{mol por minuto por miligramo de proteína } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1})$.

3.4.7 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos primero se comprobó la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Bartlett, se probó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (pruebas de más de 50 datos), y como no cumplía con la distribución se intentó la normalización de los. No fue posible normalizar los datos, por lo cual se decidió continuar con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, como una alternativa a la prueba ANOVA, con el objetivo de evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos para la variable medida (AChE) con un nivel de significancia de 0,05. Como pruebas post-hoc se utilizará la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. El análisis estadístico y los gráficos fueron realizados mediante el software RStudio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Suelo

La caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo obtenido del fondo agrícola con manejo orgánico se presenta en la tabla 3.

Tabla 3: Parámetros del suelo

Parámetros	Unidad	Suelo agrícola
Granulometría	-	Clasificación textural de limo Grueso con media de partícula 28,97 μm
Humedad	%	39
pH	-	6,33
Materia orgánica total (TOC)	%	10,8
Fosforo Total	mg/kg	578

2. Test de adsorción de ATZ a MP

Los microplásticos obtenidos mecánicamente en laboratorio presentaron una distribución de tamaño entre 0,100 y 2 milímetros (Fig. 8).

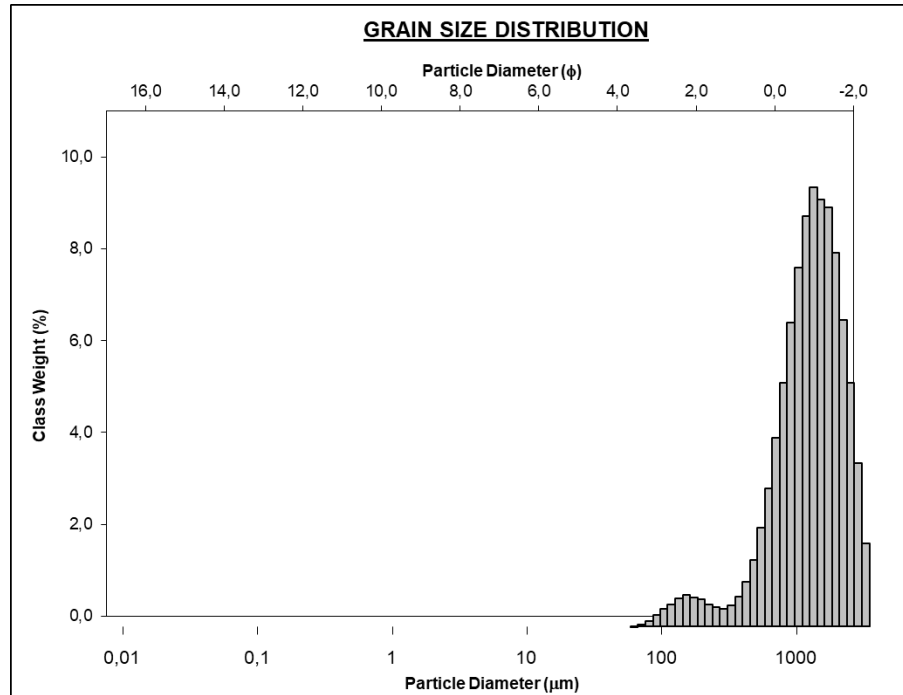


Figura 8: Distribución de tamaño de MPs obtenidos en laboratorio.



Figura 9: Tratamientos del test de adsorción y sus respectivas extracciones (muestras).

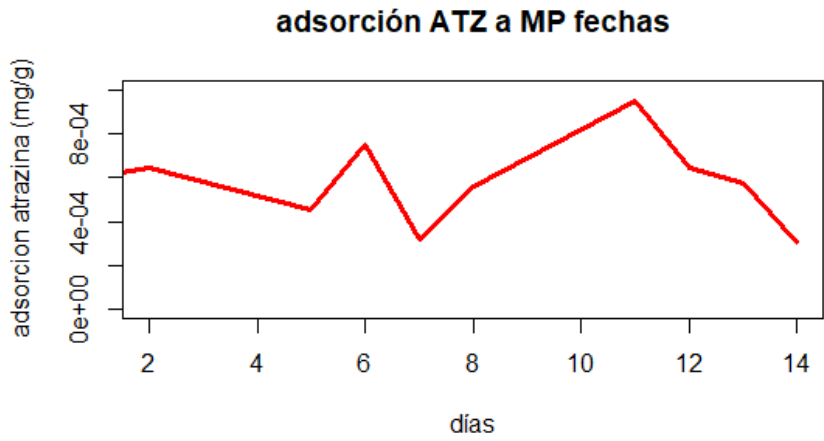


Figura 10: Comportamiento de adsorción de ATZ a la superficie de microplásticos de PE a través del tiempo.

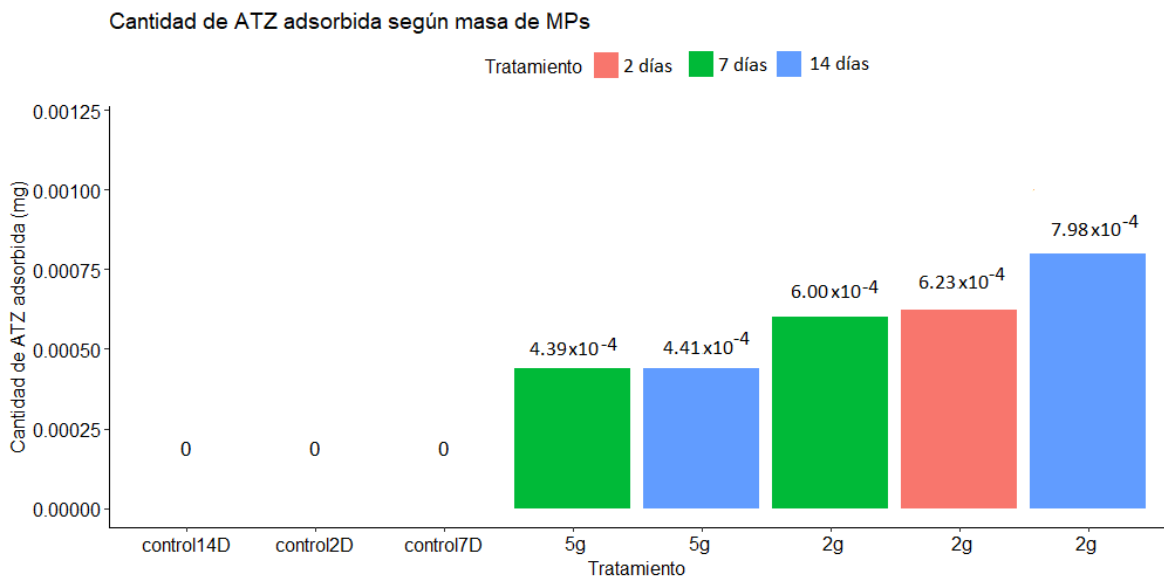


Figura 11: Comportamiento de adsorción de ATZ a la superficie de microplásticos de PE. Obtenido con software RStudio.

Tabla 4: Cantidad de ATZ adsorbida a MP PE luego de cada extracción (Test de Adsorción). Resultados a partir del balance de materia simple

Número de muestreo	Tratamiento	Cantidad de ATZ adsorbida (mg/g)	Promedio (mg/g)	Desviación estándar
Extracción 1	2g MP 2 días	0,00059940	0,0006228	3,304E-05
Extracción 2	2g MP 2 días (duplicado)	0,00064612		
Extracción 5	2g MP 1 semana	0,00044978	0,0005996	0,000211841
Extracción 6	2g MP 1 semana (duplicado)	0,00074936		
Extracción 7	5g 1 semana	0,00031946	0,0004392	0,00016935
Extracción 8	5g 1 semana (duplicado)	0,00055896		
Extracción 11	2g 2 semanas	0,00094782	0,0007978	0,000303985
Extracción 12	2g 2 semanas (duplicado)	0,00064773		
Extracción 13	5g 2 semanas	0,00057503	0,0004408	0,00018979
Extracción 14	5g 2 semanas	0,00030663		

Mediante la prueba de adsorción se evidencia que existe una pequeña cantidad de atrazina que es adsorbida a la superficie de los microplásticos de polietileno utilizados en este estudio. El tratamiento que mostró mayor cantidad de atrazina adsorbida fue el que contenía 2g de MPPE y estuvo 2 semanas en exposición. La diferencia promedio entre la cantidad de ATZ adsorbida para una cantidad de 5 g de MPPE entre 1 y 2 semanas fue muy pequeña (Tabla 4)(Fig. 11).

Se evidenció una reducción de la capacidad de adsorción de ATZ con el aumento de la dosis de MPs de 2 a 5 g, al igual que en el estudio de Wang y colaboradores donde la capacidad de adsorción de todos los pesticidas utilizados se redujo bruscamente con el aumento de la dosis de MP y se mantuvo relativamente estable con un mayor aumento de las dosis de MPs (Wang et al., 2020).

Se sugiere que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción es de horas o inclusive minutos, lo que explicaría que no existan grandes diferencias

entre las cantidades adsorbidas entre 2 días, 1 semana y dos semanas. En el estudio de Wang y colaboradores, los pesticidas utilizados (carbendazima, dipterex, diflubenzurón, malatión, difenoconazol) el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción fue de aproximadamente 120 min (Wang et al., 2020).

Para poder obtener resultados más completos, se debe estudiar la composición química del MPPE, el mecanismo de llenado microporoso, el proceso de adsorción por el cual está controlado (e.g fuerza intermolecular de Van Der Waals), pH (ya que afecta el comportamiento de degradación de la ATZ) y la superficie específica, ya que como los MPs utilizados en este estudio fueron triturados se cree que pudieron existir diferencias entre la superficie utilizada en los distintos tratamientos del test de adsorción (e.g diferencia entre pliegues y protuberancias que faciliten la adsorción del herbicida) (Li et al., 2021; Wang et al., 2020))

3. Exposiciones

3.1 Mortalidad

Se observó mortalidad durante los ensayos de toxicidad, al tercer día de exposición se registró una muerte en un vaso precipitado del tratamiento de atrazina (N°18), una muerte en el tratamiento de co-exposición (N°24) y una muerte en el tratamiento control (N°6). Todas las réplicas se realizaron utilizando las mismas concentraciones, periodos de exposición y condiciones de ensayo.

Una vez cumplido el tiempo de exposición del bioensayo, se encontró que en 8 vasos faltaban lombrices, no se encontraron cadáveres en descomposición, por lo que se cree que se escaparon de los recipientes a través de los agujeros de la parte inferior. Debido a esto, se utilizaron 3 réplicas por tratamiento (que tuvieran las lombrices suficientes) para seguir adelante con los análisis enzimáticos



Figura 12: Lombriz muerta en vaso precipitado del tratamiento de atrazina.

Se plantea que la mortalidad registrada puede deberse a la sensibilidad de los organismos a las condiciones de temperatura a la que estuvieron expuestos los vasos en los primeros días ya que la temperatura ambiente fue de aproximadamente 24°C, lo cual es superior a la temperatura óptima de las lombrices ($15 \pm 2^\circ\text{C}$).

En estudios con *L. terrestris* expuestas a MPs donde se considera como una variable de estudio la mortalidad, a concentraciones más altas de MP (7%) que la utilizada en este estudio, no fue mortal aún con una exposición más prolongada (60 días) (Lwanga et al., 2016).

3.2 Extracción de ATZ del suelo

Para corroborar que los tratamientos que utilizaron ATZ realmente tuvieran presencia del herbicida, se extrajeron muestras al azar de distintos vasos precipitados. Se encontró que en cada muestra existía presencia de ATZ, por lo que se infiere que está distribuida homogéneamente dentro de cada vaso (Tabla 5).

Tabla 5: Masa de atrazina extraída de diferentes vasos precipitados del bioensayo de exposición.

Nº de la muestra	Masa de atrazina (mg)
Muestra vaso 13	0,015
Muestra vaso 14	0,02
Muestra vaso 18	0,05

3.3 Lombrices

Como se mencionó anteriormente, se utilizaron sólo 3 réplicas por tratamiento, de las cuales se utilizaron 3 lombrices por cada uno para realizar los ensayos (n=36). De cada una de ellas se registró el peso antes y después de ser expuestas a los distintos tratamientos

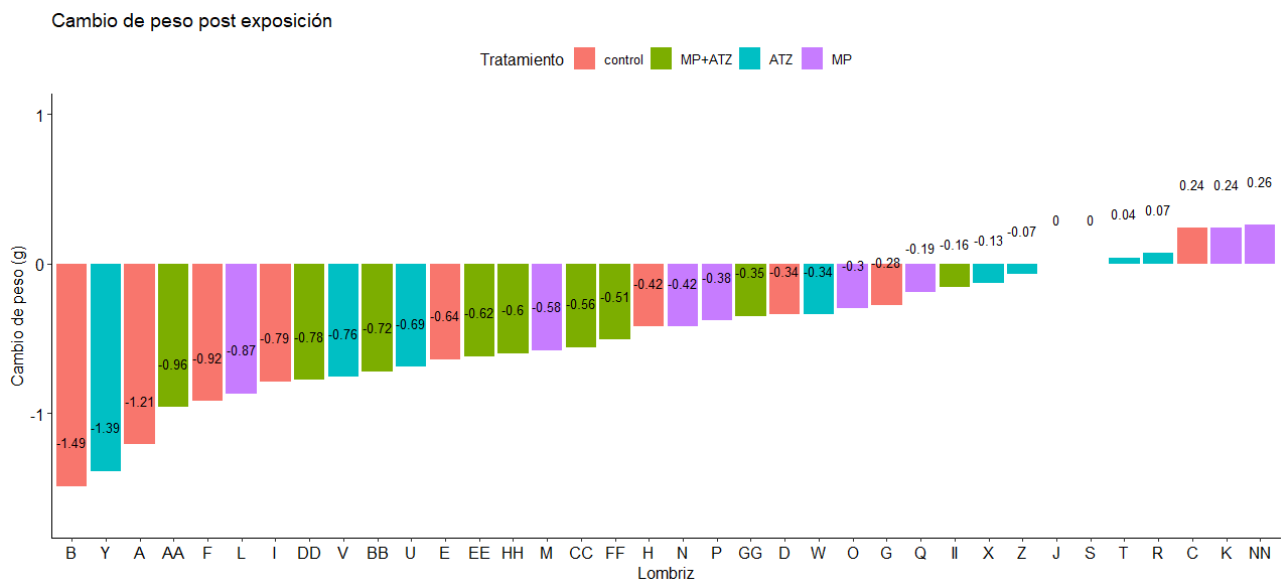


Figura 13: Cambio de peso de cada lombriz según tratamiento luego del bioensayo de exposición.

Tabla 6: Cambio de peso en *L. terrestris* según tratamiento de exposición

Número lombriz	Tratamiento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Cambio de peso (g)
1	Control	2,08	0,87	-1,21
2	Control	2,43	0,94	-1,49
3	Control	1,58	1,82	0,24
4	Control	1,25	0,91	-0,34
5	Control	1,79	1,15	-0,64
6	Control	1,5	0,58	-0,92
7	Control	1,11	0,83	-0,28
8	Control	1,34	0,92	-0,42
9	Control	1,68	0,89	-0,79
Promedio tratamiento control: -0,65 (g)				
10	MP	1,06	1,06	0
11	MP	0,77	1,01	0,24
12	MP	1,66	0,79	-0,87
13	MP	1,56	0,98	-0,58
14	MP	1,46	1,04	-0,42
15	MP	0,9	1,16	0,26
16	MP	1,07	0,77	-0,3
17	MP	1,3	0,92	-0,38
18	MP	1,09	0,9	-0,19
Promedio tratamiento MP: -0,25 (g)				
19	ATZ	0,83	0,9	0,07
20	ATZ	1,3	1,3	0
21	ATZ	1,42	1,46	0,04
22	ATZ	1,57	0,88	-0,69
23	ATZ	1,4	0,64	-0,76
24	ATZ	1,45	1,11	-0,34
25	ATZ	1,26	1,13	-0,13
26	ATZ	2,02	0,63	-1,39
27	ATZ	1,5	1,43	-0,07

Tabla 6: Cambio de peso en *L. terrestris* según tratamiento de exposición
(continuación)

Número lombriz	Tratamiento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Cambio de peso (g)
Promedio tratamiento ATZ: -0,36 (g)				
28	MP+ATZ	1,34	0,38	-0,96
29	MP+ATZ	1,79	1,07	-0,72
30	MP+ATZ	1,45	0,89	-0,56
31	MP+ATZ	1,62	0,84	-0,78
32	MP+ATZ	1,19	0,57	-0,62
33	MP+ATZ	1,28	0,77	-0,51
34	MP+ATZ	1,05	0,7	-0,35
35	MP+ATZ	0,99	0,39	-0,6
36	MP+ATZ	0,69	0,53	-0,16
Promedio tratamiento MP+ATZ: -0,58 (g)				
Promedio general				-0,461666667
Desviación estándar				0,435204385

En todos los tratamientos se evidenció una reducción del peso de las lombrices, siendo el control el que presentó mayor pérdida de peso promedio (-0,65 g). El tratamiento que presentó menor reducción del peso en promedio fue el tratamiento de exposición a MP (-0,25 g) (Tabla 6).



Figura 14: Lombriz al comienzo del bioensayo (momento del montaje del experimento, 4 noviembre 2022).



Figura 15: Lombriz tres semanas en exposición (25 noviembre 2022).



Figura 16: Lombriz al final del periodo de exposición del bioensayo (15 diciembre 2022, tratamiento de ATZ).

3.4 Análisis estadístico del cambio de peso

Para ver si los datos fueron significativamente distintos se realizó un análisis estadístico partiendo por comprobar si los datos se distribuían de forma normal, para lo cual se utilizó el test de Shapiro.

Tabla 7: Resultados del test de Shapiro-Wilk. RStudio

Shapiro-Wilk normality test

W	0.97473
p-value	0.568

Ya que el valor p es mayor a 0,05, no se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, el peso de las lombrices presenta un comportamiento normal. Para saber cómo se comporta el peso según los distintos tratamientos se propone la realización de la prueba ANOVA, por lo cual se procede a comprobar el otro supuesto de la prueba, que exista homogeneidad de varianzas.

Tabla 8: Resultados del test de Levene. RStudio

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

Df	3
F value	1.1571
Pr (>F)	0,3413

Ya que el valor p es mayor a 0,05, se mantiene la hipótesis nula, existe homogeneidad de varianzas. En este caso se decide realizar la prueba ANOVA para ver si existen diferencias entre las medias de los tratamientos.

Tabla 9: Resultados de la prueba ANOVA. RStudio

ANOVA test

	DF	Sum sq	Mean sq	F value	Pr (>F)
Cambio de peso	3	0,949	0,3165	1,783	0,17
Residuals	32	5,680	0,1775		

Como el valor p es mayor a la significancia, entonces se rechaza la hipótesis nula, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

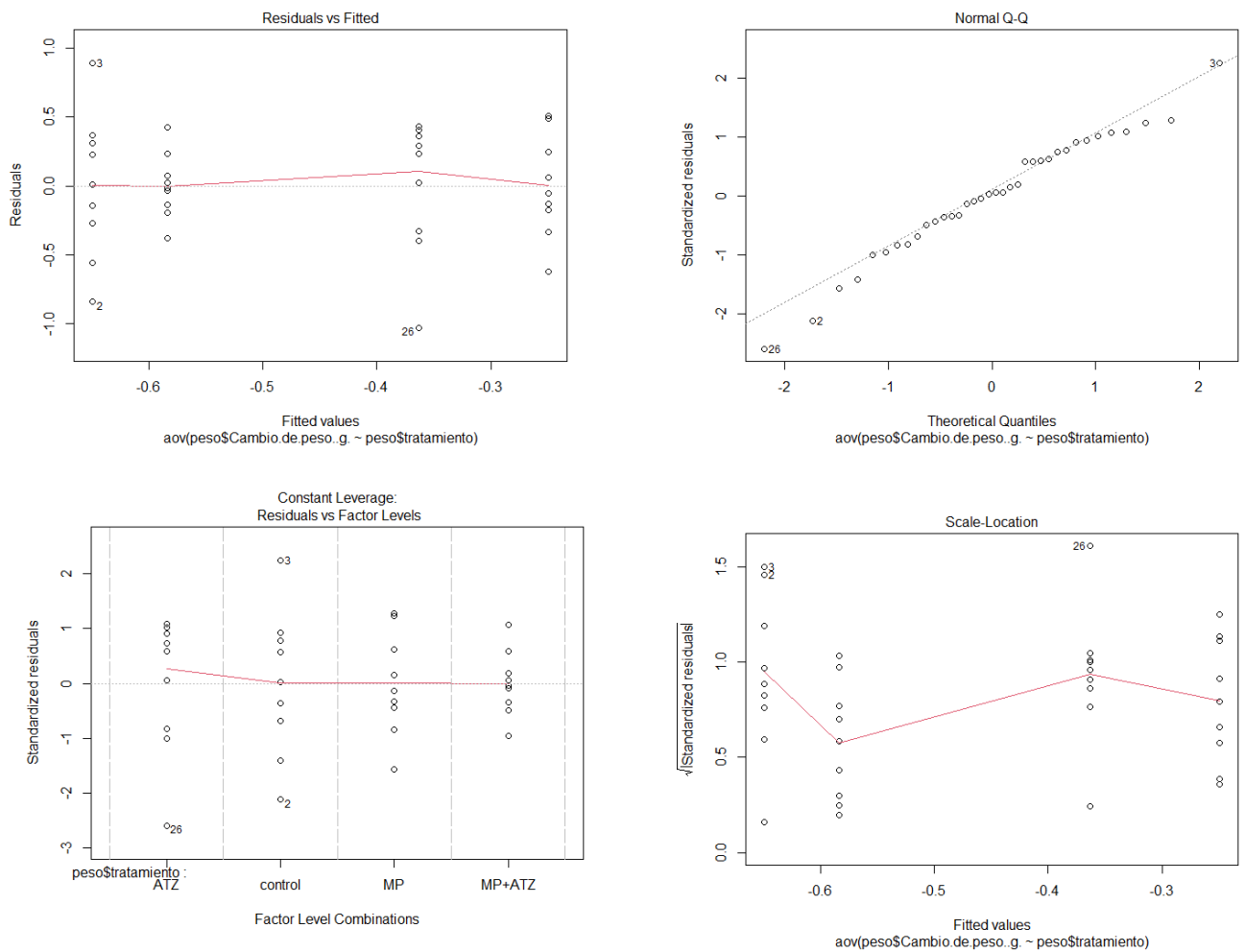


Figura 17: Gráficas de la prueba ANOVA para el cambio de peso de las lombrices.

En este estudio se evidenció una disminución en el peso en todos los tratamientos al igual que en otros estudios (Baeza et al., 2020), esta diferencia no fue estadísticamente significativa, por lo que se deduce que se debe a estrés inherente al cambio de espacio y volumen reducido a comparación del estado de libertad anterior al bioensayo. Adicionalmente, se cree que la comida suministrada no era lo suficientemente variada para suplir todos los requerimientos nutricionales.

3.5 Actividad enzimática de AChE

Luego de obtenidos los datos enzimáticos experimentales, se procedió a saber cual era la distribución de los datos, para lo cual se realizó el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 10: Resultados del test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. RStudio

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

D	0,2893
p value	< 2,2E-16

Los datos de actividad enzimática no contaban con distribución normal, por lo que se utilizó el equivalente no paramétrico del análisis ANOVA, el test de Kruskal-Wallis para definir si existían diferencias entre los distintos tratamientos. Para poder utilizar este test se tienen que cumplir los siguientes supuestos: (1) los grupos deben tener la misma distribución (asimetría hacia el mismo lado), (2) los grupos deben tener la misma varianza (Homocedasticidad)

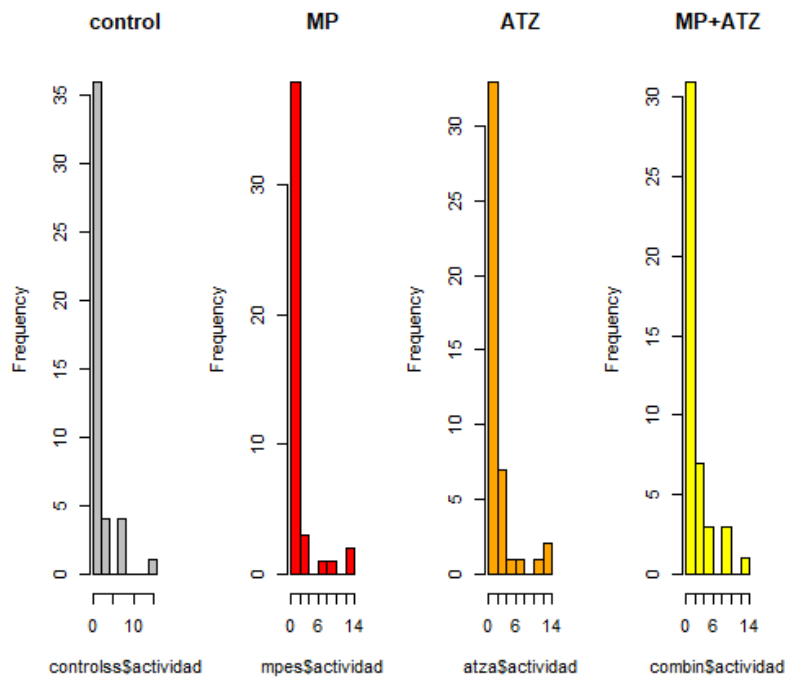


Figura 18: Supuesto de distribución de los datos para uso de test Kruskal-Wallis. RStudio

Los datos cumplen con el supuesto de tener la misma asimetría (Fig. 18), por lo cual se comprueba el supuesto de homocedasticidad a través del test de Levene

el cual entrega un valor-p de 0,768, al ser mayor a $\alpha=0,05$ se rechaza la hipótesis de que hay más de un grupo con varianza distinta, es decir, existe homogeneidad de varianzas (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados del test de Levene. RStudio

Levene's test of homogeneity of variances (center=median)

Df	3
F value	0,3793
Pr (>F)	0,768

Según el test de Kruskal-Wallis para ver el comportamiento de los datos de actividad de AChE para los distintos tratamientos, se obtuvo un valor p de 2,397E-05 con un Kruskal-Wallis chi-cuadrado de 24,086. La hipótesis nula es que los grupos independientes tienen la misma tendencia central y vienen de la misma población, la hipótesis alternativa es que al menos uno de los grupos independientes no tiene la misma tendencia central que los otros grupos y vienen de otra población. El valor-p es menor al valor de significancia $\alpha=0,05$, por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se supone que hay diferencias entre la actividad de AChE de los distintos tratamientos (Tabla 12).

Tabla 12: Resultados del test de Kruskal-Wallis. RStudio

Kruskal-Wallis rank sum test

Kruskal-Wallis chi-squared	24,086
Df	3
p-value	2,397E-05

Para definir cuáles son los grupos en los que difiere la actividad de AChE se realiza la prueba post-hoc prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney (prueba de suma de rangos Wilcoxon), el cual entrega como resultado que existen diferencias entre los tratamientos de Control-ATZ, MP-ATZ, MP+ATZ-Control y MP+ATZ-MP (Tabla 13).

Tabla 13: resultados del test de Wilcoxon. RStudio

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction

	ATZ	Control	MP
Control	0.0034	-	-
MP	0.0031	1.000	-
MP+ATZ	1.0000	0.0025	0.0013

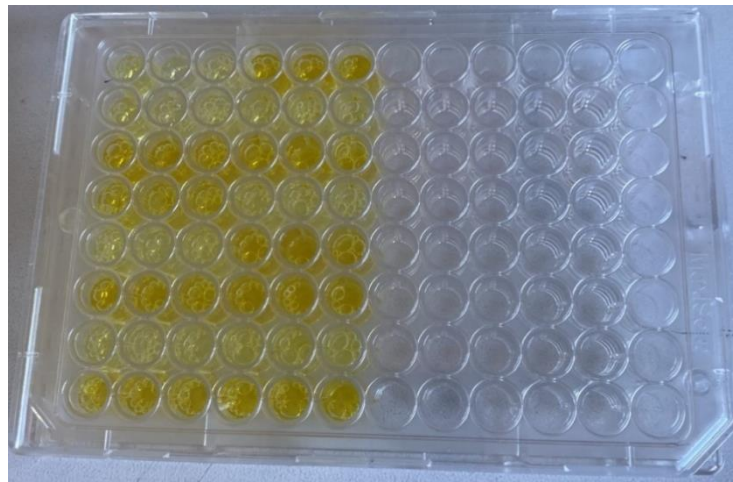


Figura 19: Microplaca con enzimas para medir absorbancia de AChE

3.5.1 Actividad AChE según tratamiento

En la figura 20 se muestran las diferencias significativas de la actividad enzimática de AChE según los distintos tratamientos de exposición utilizados en el bioensayo.

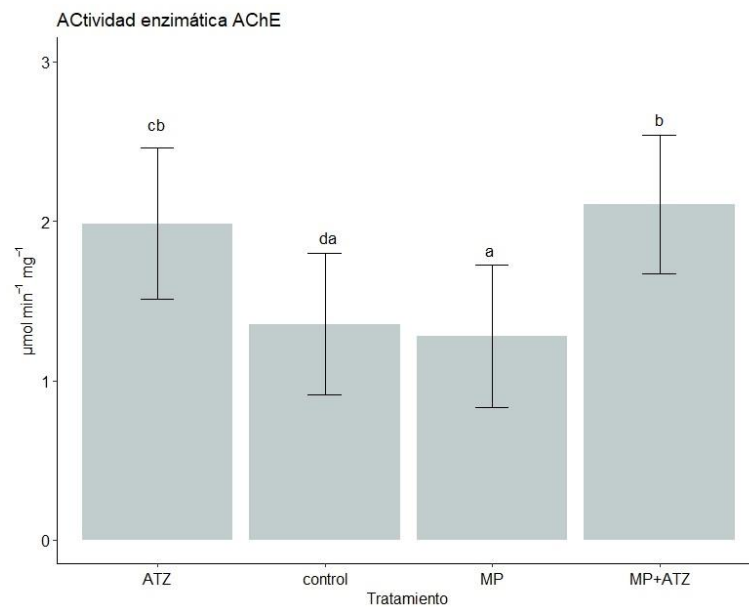


Figura 20: Diferencias significativas para la actividad enzimática de AChE para los distintos tratamientos. Data es promedio \pm error estándar; letras indican diferencia significativa

3.5.2 Actividad AChE según tejido

En la figura 21 se muestra gráficamente las actividades medias de AChE según el tratamiento y tipo de tejido de las lombrices.

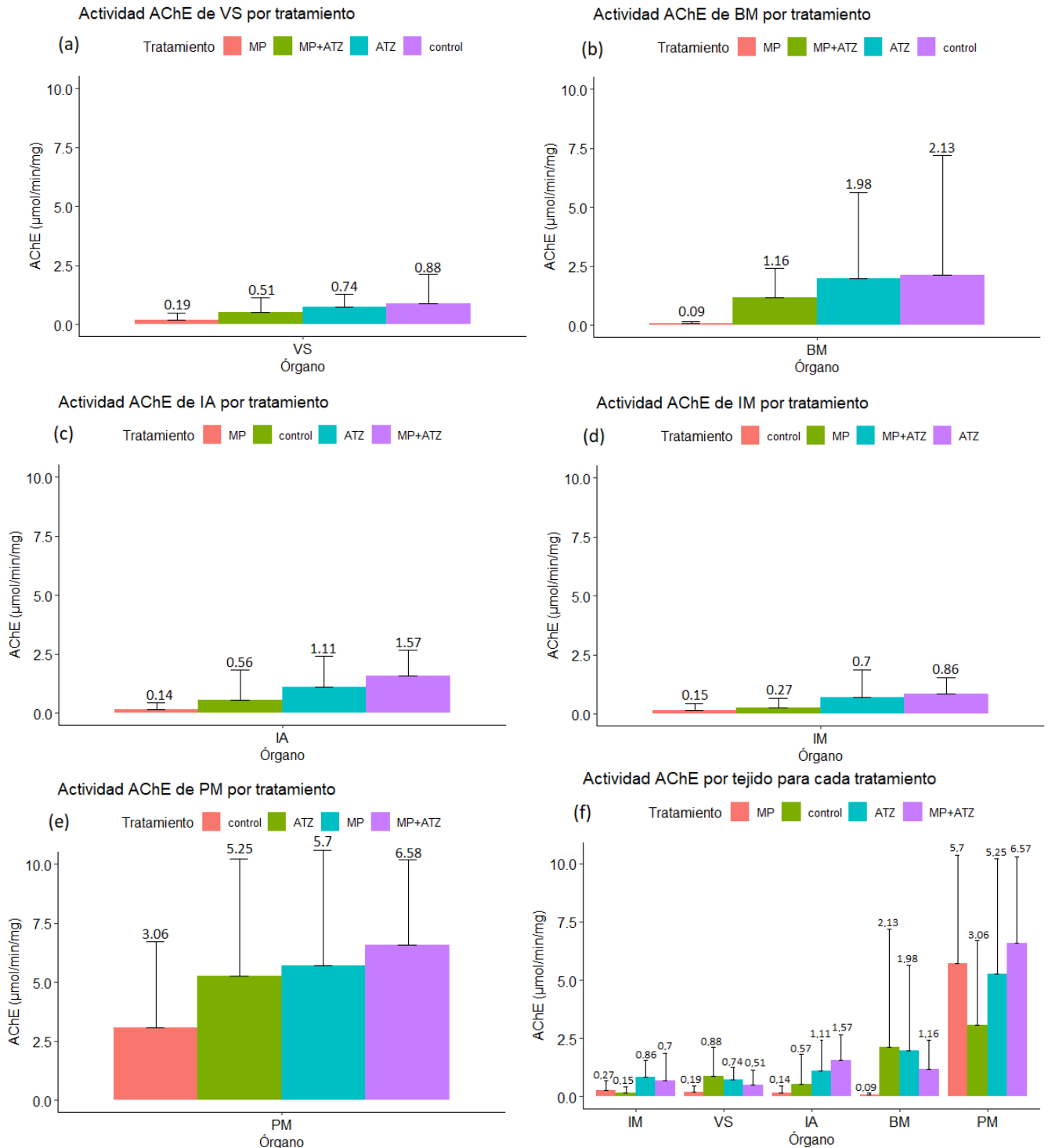


Figura 21: Promedio de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) de *Lumbricus terrestris* según el tejido **a)** vesícula/receptáculos seminales **b)** buche/molleja **c)** intestino anterior **d)** intestino medio **e)** pared muscular según tratamiento y **f)** todos los tejidos según tratamiento. Desviación estándar determinada a partir de los experimentos realizados en triplicado.

Tabla 14: Promedio de la actividad enzimática específica de AChE según tejido para los distintos tratamientos

Órgano	Tratamiento	Promedio	Valor máximo	Valor mínimo	Desviación estándar
VS	ATZ	0,7360274	1,62601872	0	0,53649907
VS	MP	0,18746684	0,78361446	0	0,27844502
VS	MP+ATZ	0,51313727	1,94424436	0	0,6195973
VS	control	0,88245585	3,34120248	0	1,24471774
BM	ATZ	1,9762944	11,4778712	0,1113976	3,6540442
BM	MP	0,08666927	0,22697894	0	0,07586967
BM	MP+ATZ	1,16430314	3,71114299	0	1,26115738
BM	control	2,1262517	15,4722894	0,07779917	5,08009923
IA	ATZ	1,11401727	4,034922	0	1,30578984
IA	MP	0,14471135	0,94736842	0	0,30345963
IA	MP+ATZ	1,5719322	3,48764297	0,25098039	1,10174709
IA	control	0,5564533	3,89716776	0	1,26371531
IM	ATZ	0,85587253	2,17583808	0,08538876	0,7011893
IM	MP	0,2740434	1,30082528	0,02239831	0,39832193
IM	MP+ATZ	0,70402169	3,76296296	0,05544589	1,16533117
IM	control	0,15344165	0,88486677	0	0,28029482
PM	ATZ	5,24867466	13,4865052	0,00365702	4,95110015
PM	MP	5,70394842	12,3566994	0	4,66277761
PM	MP+ATZ	6,57656099	13,5743995	0,79546609	3,71677318
PM	control	3,05837631	7,77551098	0	3,64621391

A nivel de tejido, para la actividad de AChE en vasícula y receptáculos seminales (VS) se presenta una inhibición en todos los tratamientos a comparación del control. La actividad del tratamiento de co-exposición ve reducida 42% ($0,51 \pm 0,62$), el tratamiento de ATZ se reduce un 17% ($0,74 \pm 0,54$) y el tratamiento que presenta la mayor inhibición de actividad enzimática es a exposición a MPs con 79% ($0,19 \pm 0,28$) (Fig. 21 a))(Tabla 14).

En cuanto a la actividad de AChE en buche y molleja (BM) se puede observar que esta se ve inhibida en todos los tratamientos a comparación del control. La

actividad del tratamiento de ATZ ($1,98 \pm 3,65$) presenta una reducción del 7%, mientras que el de co-exposición ($1,16 \pm 1,2$) una reducción del 45%. El tratamiento que presentó el mayor nivel de inhibición de la actividad enzimática fue la exposición a MPs ($0,09 \pm 0,07$) con 96% (Fig. 21 b)) (Tabla 14).

En el intestino anterior (IA) se presenta una reducción del 74% en la actividad de AChE tras la exposición a MPs ($0,14 \pm 0,3$) a comparación del control ($0,56 \pm 1,3$) (Fig. 21 c)) (Tabla 14).

La acetilcolinesterasa es una clase de enzima que cataliza la hidrólisis del agente neurotransmisor acetilcolina, cuando la enzima no es capaz de efectuar la hidrólisis de la acetilcolina se provoca una acumulación del neurotransmisor. La reducción de la actividad de AChE ha sido correlacionada con el nivel de pesticidas OP en el ambiente (Sarkar et al., 2006), pero además de estos otros tipos de contaminantes emergentes pueden afectar la AChE (Barron and Woodburn, 1995; Fu et al., 2018; Van Dyk and Pletschke, 2011).

En el tratamiento de exposición a ATZ, se evidencia una reducción de la actividad enzimática de AChE en los órganos de VS y BM, esto se puede relacionar a que este herbicida es un tóxico reproductivo y también es un neurotóxico. No se sabe claramente cuales son los mecanismos tóxicos en el organismo de las lombrices, sin embargo, se cree que puede estar relacionado a alimentación, ya que la inhibición es proporcional al orden en que se encuentra cada órgano por contacto tras la ingesta.

La acetilcolina no ha sido estudiada ampliamente a la exposición a atrazina, sin embargo, se realizó un estudio en pez cebra donde se expuso a atrazina y presentó reducción de la AChE en el cerebro y se vieron cambios en los comportamientos defensivos del pez, lo que puede estar asociado a un problema en la neurotransmisión de acetilcolina, descrito por la reducción de la actividad AChE (Schmidel et al., 2014).

La acetilcolinesterasa es un biomarcador de neurotoxicidad, en el cual se degrada la acetilcolina para remover los efectos neurotóxicos de los contaminantes, sin embargo, hay estudios que demuestran que los microplásticos no tienen efectos neurotóxicos en *Lumbricus terrestris* (Calisi et al., 2011; Rault et al., 2007). Aunque los efectos no sean neurotóxicos en este estudio, se evidencia una disminución

de la actividad de AChE en VS, BM e IA en *L. terrestris* expuestos al tratamiento de MP. Existen estudios en los que, de igual manera, se ha inhibido esta actividad en juveniles de *Pomatoschistus microps*, mussels y gobies (Avio et al., 2015; Chen et al., 2020b; Fonte et al., 2016; Luís et al., 2015).

Se teoriza que los resultados de actividad enzimática de AChE en exposición a MP de este estudio se deban a la forma de alimentación de las lombrices, ya que cuando entra el plástico al sistema pueden generar laceraciones debido a la irregularidad de los bordes y superficie en la boca, por ende, esta teoría tiene sentido considerando que se presenta una disminución de la actividad enzimática de AChE en los primeros órganos que tienen contacto con los MPs (vesícula seminal, buche/molleja e intestino anterior). El comportamiento aletargado que se ha evidenciado en otros estudio podría ser parte del mecanismo de MPs que afecta a las lombrices de tierra (Baeza et al., 2020).

En el estudio de Baeza y colaboradores, se evidencia una disminución de la actividad de AChE en el intestino medio de *L. terrestris* expuestas a 5 y 7% p/p (6,9 y 9,7 g respectivamente de MPs de PEBD) a comparación del control. Considerando estos resultados, se puede deducir que la respuesta enzimática de AChE depende de la especie utilizada, el tejido, fuente y la concentración de MPs a la que estas sean expuestas.

En VS y BM se observa una inhibición de la actividad enzimática de AChE para el tratamiento de MP+ATZ, analizandolo a mayor detalle, la actividad tras la exposición presenta mayor inhibición en el tratamiento de MP+ATZ (42 y 45% de inhibición respectivamente) a comparación con en el tratamiento de ATZ (17 y 7%), pero no logra el nivel de inhibición del tratamiento de MP (79 y 69% de inhibición respectivamente), lo cual sugiere la existencia de un posible efecto competitivo. Se teoriza que la disponibilidad de ATZ en el suelo se ve reducida debido a la capacidad de adsorción de los MPs, como se demostró en el test de adsorción. Así, existe menos biodisponibilidad de la atrazina a nivel de receptor y que permite que no exista un nivel elevado de inhibición enzimática. Se especula que dependiendo del tamaño de la partícula ingerida esta puede ser retenida dentro por organismo por un mayor o menor periodo que permita desorber o no el herbicida. Se sugiere que partículas de menor tamaño con ATZ adherida pueden

ser excretadas con mayor facilidad y producir menos inhibición enzimática como en el caso de IM y PM.

Es importante descubrir el mecanismo de inhibición de la actividad de AChE tras la exposición a estos contaminantes teniendo en consideración su rol en la transmisión del impulso nervioso, que se traduce en el movimiento de los organismos. Se debe tomar en consideración cómo una eventual reducción del movimiento pueda tener en el rol de mejora de la estructura del suelo que cumple esta especie de lombriz.

3.6 Actividad enzimática de CbE

En la figura 22 se muestra la microplaca utilizada para medir la absorbancia de la actividad CbE de los distintos tejidos de las lombrices muestra.

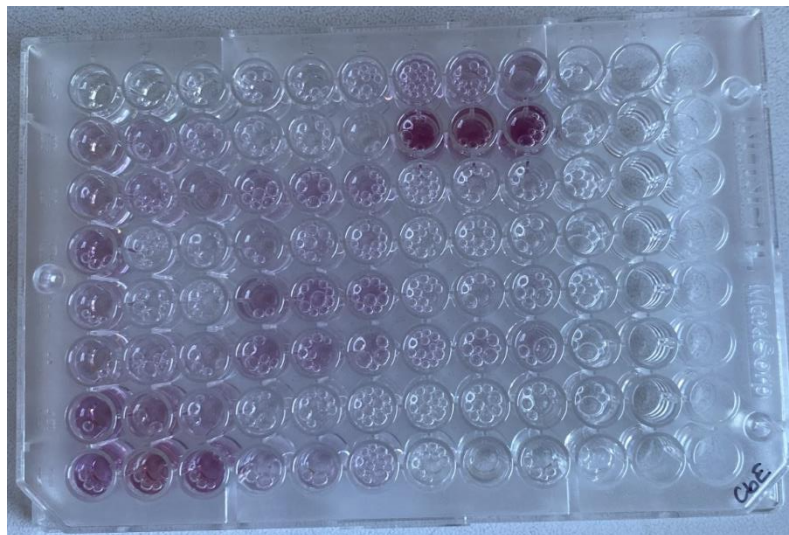


Figura 22: Microplaca con sustratos para medir actividad de CbE

Luego de obtenidos los datos enzimáticos experimentales, se procedió a saber cual era la distribución de los datos, para lo cual se realizó el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 15: Resultados del test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. RStudio

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

D	0,16972
p value	8,754E-14

Los datos no siguen una distribución normal, por lo cual se deben cumplir los supuestos para realizar un ANOVA no paramétrico o con corrección de Welch.

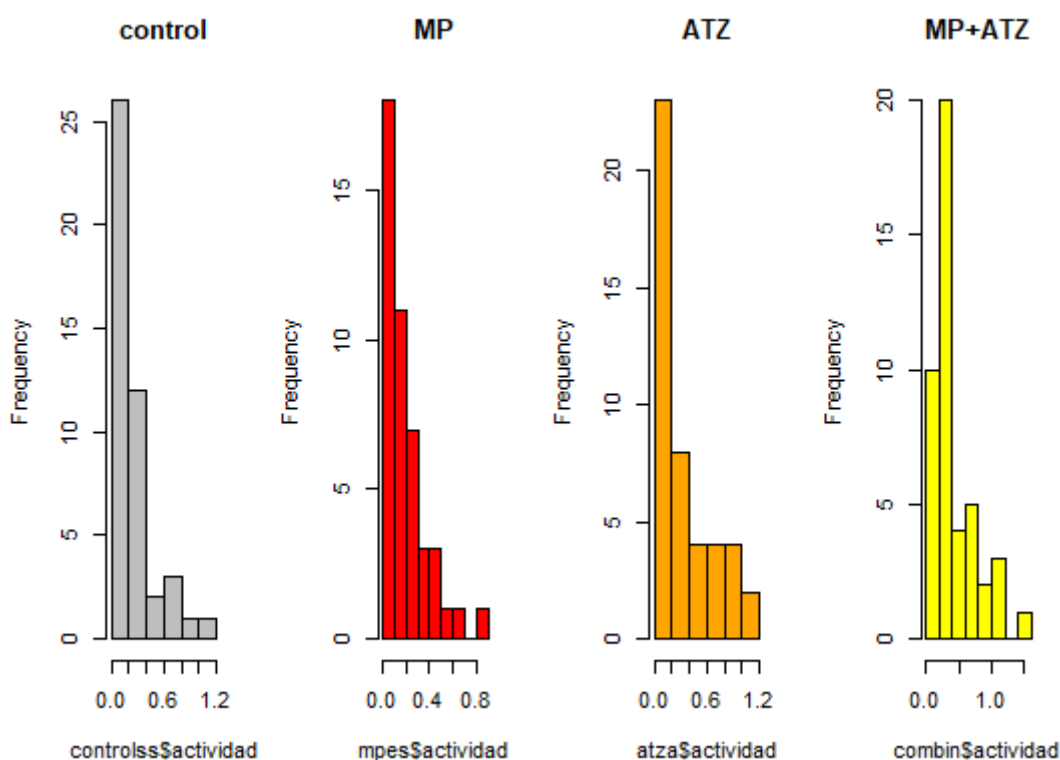


Figura 23: Supuesto de distribución de los datos de CbE para uso de test Kruskal-Wallis.

RStudio

Los datos de actividad enzimática de CbE cumplen con el supuesto de tener la misma asimetría (Fig. 23).

Tabla 16: Resultados del test de Levene. RStudio

Levene test for homogeneity of variances (center=median)

Df	3
F value	3.7293
Pr	0.01241*

El valor p es menor al valor de significancia, por lo que se rechaza la hipótesis nula y los datos no presentan varianzas homogéneas (Tabla 16). En este caso se utiliza la prueba ANOVA con corrección de Welch

Tabla 17: Resultados del test ANOVA con corrección de Welch. RStudio

ANOVA con corrección de Welch

	N	Statistic	DFn	DFd	P	Method
Actividad CbE	180	7,18	3	95,2	0,000214	Welch ANOVA

El valor p es menor a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula de que las actividades de todos los tratamientos son iguales. Se procede a realizar un test que permita saber cuáles son los grupos que difieren entre sí (Tabla 17).

Tabla 18: Resultados del test de Games-Howell. RStudio

Games-Howell test para comparaciones múltiples

	Group1	Group2	p.adj	p.adj.signif
Actividad CbE	ATZ	Control	0.415	ns
Actividad CbE	ATZ	MP	0.159	ns
Actividad CbE	ATZ	MP+ATZ	0.288	ns
Actividad CbE	Control	MP	0.941	ns
Actividad CbE	Control	MP+ATZ	0.003	**
Actividad CbE	MP	MP+ATZ	0.00021	***

Según el test de Games-Howell, existen diferencias significativas entre los tratamientos Control y MP+ATZ y diferencias muy significativas entre el tratamiento de exposición a MP y el de coexposición (Tabla 18).

3.6.1 Actividad CbE según tratamiento

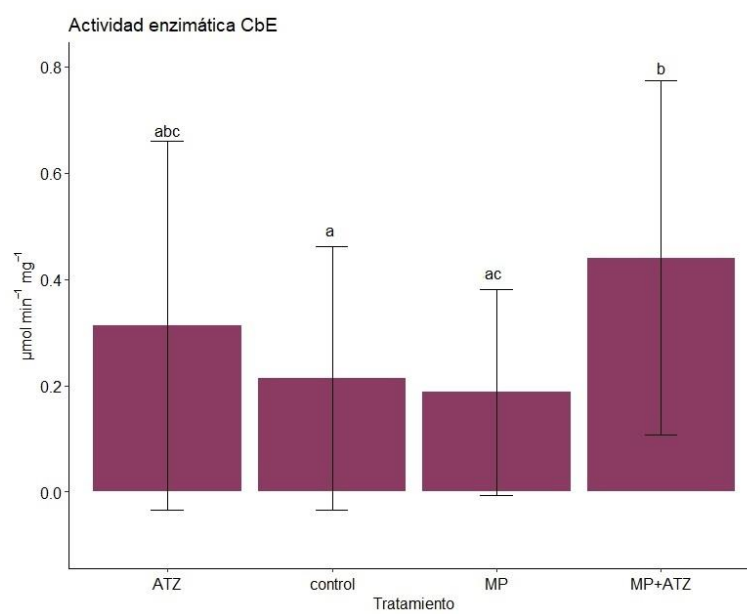


Figura 24: Diferencias significativas de actividad enzimática CbE según tratamiento. Data es promedio \pm error estándar. Letras indican diferencias significativas.

3.6.2 Actividad CbE según tejido

En la figura 25 se muestra gráficamente las actividades medias de CbE según el tratamiento y tipo de tejido de las lombrices.

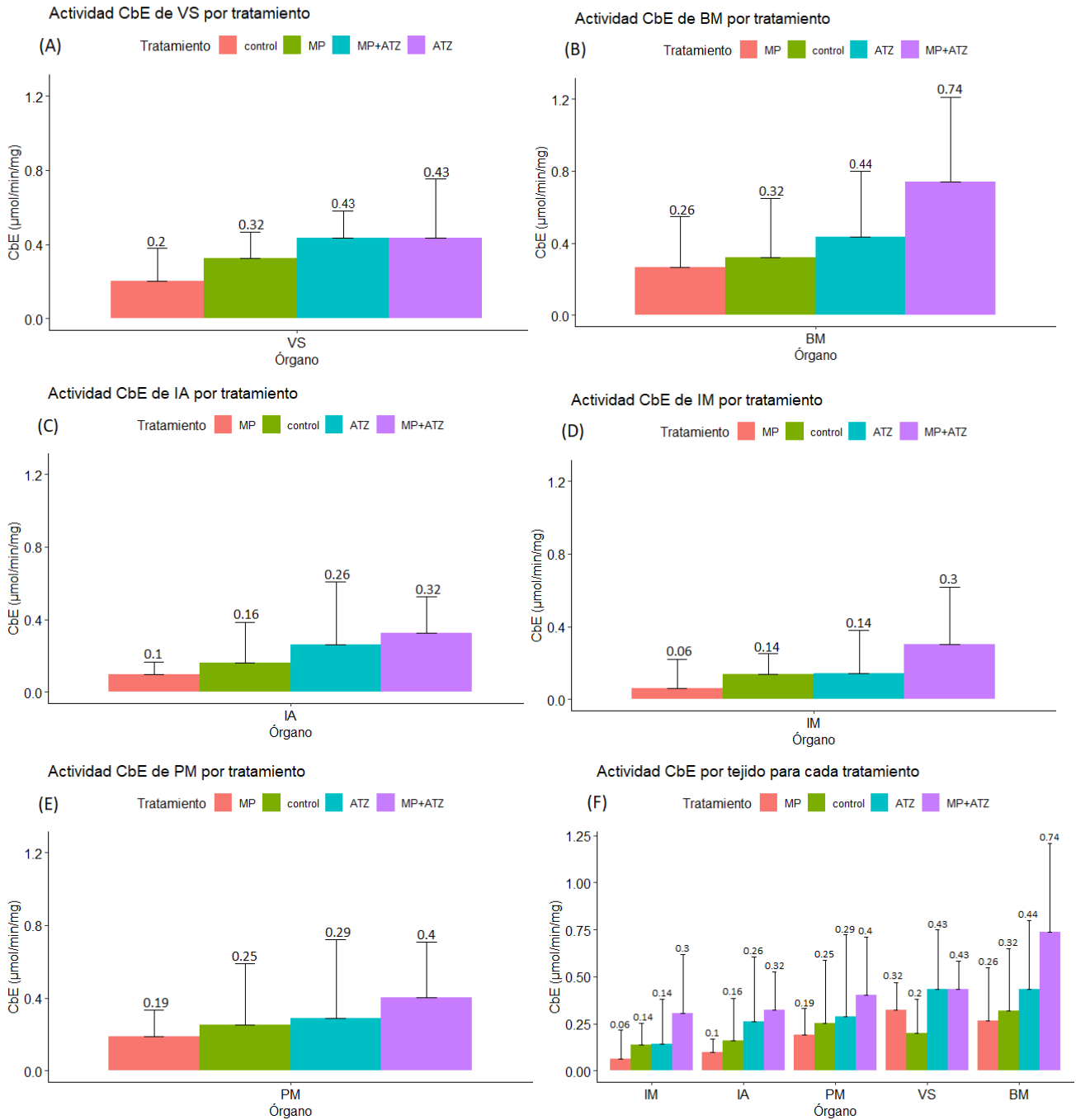


Figura 25: Actividad de la carboxilesterasa (CbE) de *Lumbricus terrestris* según el tejido **A)** vesícula/receptáculos seminales **B)** buche/molleja **C)** intestino anterior **D)** intestino medio **E)** pared muscular según tratamiento y **F)** todos los tejidos según tratamiento. Desviación estándar determinada a partir de los experimentos realizados en triplicado.

Tabla 19: Promedio de la actividad enzimática específica de CbE según tejido para los distintos tratamientos

Órgano	Tratamiento	Promedio	Valor máximo	Valor mínimo	Desviación estándar
VS	ATZ	0,4333553	0,97674947	0	0,3188889
VS	MP	0,32314737	0,63455064	0,1488604	0,14390742
VS	MP+ATZ	0,43210699	0,68804714	0,22196125	0,14948463
VS	control	0,1996734	0,53569204	0,00061705	0,17847575
BM	ATZ	0,43500632	1,05018315	0	0,36258171
BM	MP	0,26395043	0,89893162	0	0,28411565
BM	MP+ATZ	0,73859913	1,57705874	0,18576456	0,46937236
BM	control	0,31872158	0,8360114	0	0,33050983
IA	ATZ	0,26310262	0,87887668	0	0,34229479
IA	MP	0,09695286	0,20668221	0	0,06957414
IA	MP+ATZ	0,3238413	0,79289941	0,11025641	0,20094757
IA	control	0,16131548	0,64472204	0	0,22285661
IM	ATZ	0,14320756	0,69727239	0	0,23667119
IM	MP	0,06229017	0,47944372	0	0,15667566
IM	MP+ATZ	0,30430923	0,90750398	0	0,31182829
IM	control	0,13756122	0,31172474	0	0,11376762
PM	ATZ	0,28826243	1,19789402	0	0,43378642
PM	MP	0,19012635	0,40434872	0,03455329	0,14294173
PM	MP+ATZ	0,40386317	1,05248869	0,0962169	0,30574565
PM	control	0,25309214	1,08649573	0	0,33538017

A nivel de tejido, tras la exposición a MPs ($0,26 \pm 0,28$), la actividad de CbE en buche y molleja (BM) presenta una inhibición del 17% a comparación del control ($0,32 \pm 0,33$) (Fig 25 B) (Tabla 19).

En cuanto al intestino anterior (IA), este tejido presenta disminución de la actividad enzimática de CbE tras la exposición al tratamiento de MPs ($0,09 \pm 0,07$), donde

presenta una inhibición del 40% a comparación del control ($0,16 \pm 0,22$) (Fig 25 C)(Tabla 19).

En el caso del intestino medio (IM), la actividad de CbE presenta una inhibición del 55% en el tratamiento de MPs ($0,06 \pm 0,16$) a comparación del control (Fig 25 D)(Tabla 19).

En cuanto a la pared muscular (PM), la actividad de CbE presenta una inhibición del 25% en el tratamiento de MPs ($0,19 \pm 0,14$) a comparación del control ($0,25 \pm 0,34$) (Fig 25 E)(Tabla 19).

En el presente estudio se presentan valores de actividad de CbE mayores en BM que en el tejido de intestino medio, anterior, vesícula seminal y en pared muscular, al igual que en otros estudios (Araneda et al., 2016; Sanchez-Hernandez et al., 2009). De igual manera se evidencia una disminución de la actividad de CbE en el tejido de IA y de IM lo que podría deberse a la función digestiva del intestino (Brown and Doube, 2004).

Los datos demuestran una sensibilidad dependiente del tejido y según tratamiento, en IM, IA, PM y BM existe una inhibición de la actividad de CbE en presencia de microplásticos. Al igual que en la actividad de AChE, se teoriza que esta disminución de actividad enzimática de CbE se deba al posible daño a los órganos causado por los bordes irregulares de las partículas plásticas tras su ingestión.

Es importante investigar el mecanismo de acción inhibitorio de la enzima, debido al importante rol que cumple en la detoxificación de pesticidas, la implicancia que esto supone en el comportamiento y supervivencia de *L. terrestris*, y eventualmente su afectación en el rol que cumplen en el ecosistema como especie clave.

3.7 Correlaciones

En la figura 26 se muestra gráficamente la correlación entre las actividades enzimáticas de AChE y CbE de las lombrices expuestas a los distintos tratamientos.

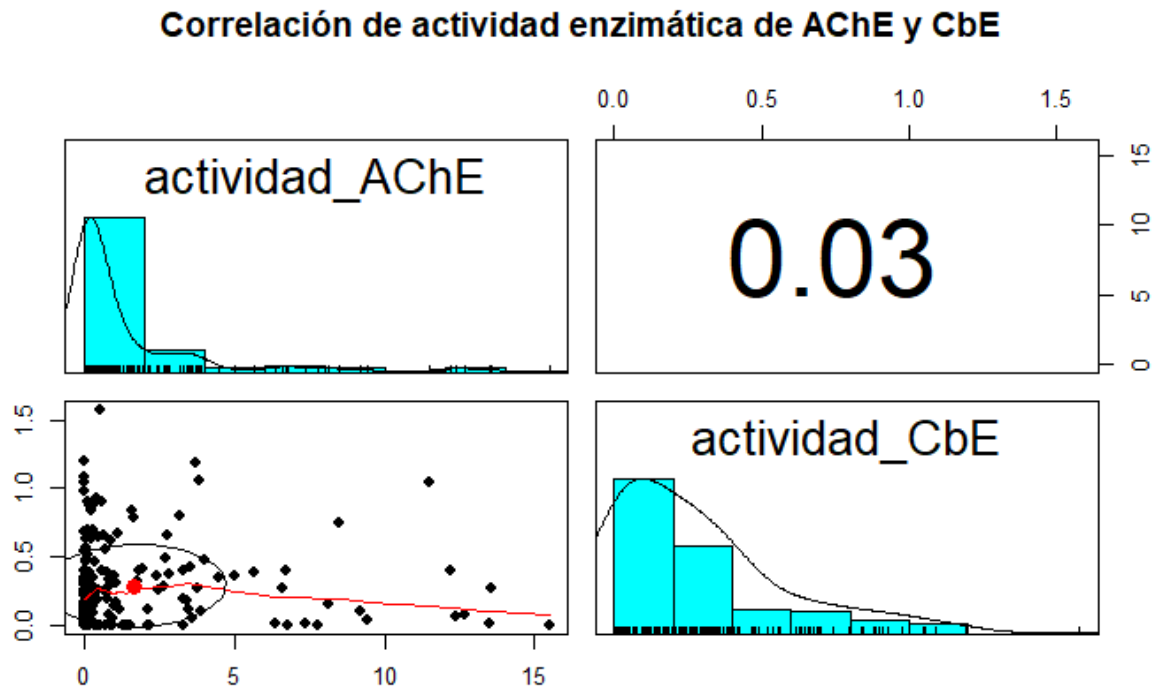


Figura 26: Gráfico de correlación entre actividad enzimática de AChE y CbE. RStudio

Se realizó un análisis de correlación mediante el método de Spearman para datos no paramétricos, para saber si existía una correlación entre las actividades de AChE y CbE. Según el resultado del test no existe una correlación estadísticamente significativa entre las variables (Fig. 26)(Tabla 20).

Tabla 20: Resultados de correlación rho de Spearman. RStudio

Spearman's rank correlation rho	
S	939763
p-value	0,6588
rho	0,03313533

5. CONCLUSIONES

El uso de bioindicadores son una herramienta importante en la ecotoxicología, ya que pueden otorgar información sobre el estado ambiental a través de sus respuestas. Para el desarrollo de este estudio se utilizó como bioindicador a la especie de lombriz *Lumbricus terrestris* debido a su importancia ecológica y agronómica, ya que posee un rol clave en el ecosistema terrestre. El objetivo fue evaluar los posibles efectos de la interacción que pudiesen existir entre los contaminantes más comunes en los suelos agrícolas: los microplásticos y pesticidas.

En este estudio, se demostró la capacidad de adsorción de ATZ a la superficie de los MPs de PE utilizados para la investigación.

La exposición de la lombriz común a la combinación entre MPs y ATZ (tratamiento de coexposición MPs+ATZ) demostró menores efectos de inhibición de la actividad enzimática de AChE. Esto podría indicar un posible efecto de competencia entre ambos contaminantes según el tipo de tejido, para el cual se teoriza que puede deberse a una reducción de la biodisponibilidad de la atrazina debido a la capacidad de adsorción de los MPs. Esta teoría se soporta según los resultados obtenidos en el test de adsorción.

Adicionalmente, la exposición singular a MPs desencadena una disminución tejido-dependiente de la actividad de AChE y CbE en las lombrices, la cual se atribuye a un daño a estos órganos como consecuencia de la ingestión de las partículas plásticas.

Finalmente, no existe suficiente información para aseverar que la coexposición a MPs y ATZ resulte en una interacción sinérgica en *L. terrestris*, sin embargo, los resultados de este estudio sugieren un comportamiento de efecto de competición ante la coexposición a MPs y ATZ en esta especie de lombriz. Se recomienda identificar los mecanismos de acción de este posible efecto de competencia

A partir de los resultados obtenidos se sugiere utilizar un mayor número de muestra para disminuir la variabilidad de datos y obtener resultados concisos. Se recomienda explorar esta interacción toxicológica con una batería de biomarcadores como respuestas conductuales y de estrés oxidativo (GST, SOD, MDA, CAT), con mayor cantidad de individuos muestra y diferenciar los efectos

según los tamaños de los MPs. Además, a través de la literatura científica revisada se detectó la necesidad de realizar más experimentos con concentraciones acordes a las presentes en el ambiente, para tener claridad del riesgo que supone el uso excesivo de estos compuestos al medio terrestre. Es importante recalcar que la hipótesis planteada en esta investigación se rechaza, ya que los resultados indicarían que, en vez de existir un efecto sinérgico, sería un efecto de competencia, del cual se deben identificar los mecanismos de acción.

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

Los objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) fueron adoptados por las Naciones Unidas en 2015 como forma de llamado universal para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y garantizar que para el 2030 todas las personas disfruten de paz y prosperidad. Los 17 ODS están interrelacionados ya que la acción en un área afectará los resultados de otras áreas.

En el marco de los objetivos de desarrollo sostenible, esta investigación tiene relación directa en los objetivos que tienen relación con la producción agrícola, pues las actividades de este rubro incluyen el uso de distintas formas de plástico y el uso de pesticidas.

Objetivo 15: Vida de ecosistemas terrestres

Los microorganismos e invertebrados son clave para los servicios de los ecosistemas, pero sus contribuciones son poco conocidas y raramente reconocidas

15.3 Rehabilitar las tierras y suelos degradados

15.5 Adoptar medidas para reducir la degradación de los hábitats naturales y detener la pérdida de la diversidad biológica.

Esta investigación pretende dar foco al rol de los invertebrados como especie clave en los servicios ecosistémicos y la importancia que tienen en el ecosistema.

Objetivo 2: Hambre Cero

Se necesita llevar a cabo un cambio profundo en el sistema agroalimentario mundial si se quiere alimentar a más de 820 millones de personas que padecen hambre, el aumento de la productividad agrícola y la producción alimentaria sostenible son cruciales para ayudar a aliviar los riesgos del hambre.

En las metas del objetivo:

2.3 para 2030, duplicar la productividad agrícola.

2.4 para 2030, asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicar prácticas agrícolas resilientes que aumenten la productividad y producción.

Esta investigación pretende exponer la insostenibilidad que significa el uso de plástico de polietileno como herramienta en los sistemas de producción de alimentos, e invita a concentrar los esfuerzos en buscar alternativas a su uso.

Objetivo 12: Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles

El consumo y la producción sostenibles consisten en hacer más y mejor con menos, además de desvincular el crecimiento económico de la degradación medioambiental, aumentar la eficiencia de recursos y promover estilos de vida sostenibles.

En las metas del objetivo se tiene incidencia en:

12.4 lograr la gestión ecológicamente racional de los productos químicos y de todos los desechos a lo largo de su ciclo de vida.

12.5 reducir considerablemente la generación de desechos mediante actividades de prevención, reducción, reciclado y reutilización.

12.8 asegurar que las personas de todo el mundo tengan información y los conocimientos pertinentes para el desarrollo sostenible y los estilos de vida en armonía con la naturaleza.

Esta investigación pretende extender los resultados científicos de los efectos que suponen las prácticas de producción en la lombriz como un bioindicador del estado de salud del ambiente.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aamodt, S., Konestabo, H.S., Sverdrup, L.E., Gudbrandsen, M., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. and Stenersen, J. 2007. Recovery of cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* Savigny following exposure to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 26(9), 1963-1967.
- Agopian, A.J., Cai, Y., Langlois, P.H., Canfield, M.A. and Lupo, P.J. 2013. Maternal residential atrazine exposure and risk for choanal atresia and stenosis in offspring. *The Journal of pediatrics* 162(3), 581-586.
- Alla, M.N. and Hassan, N. 2006. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant physiology and biochemistry* 44(4), 202-210.
- An, D., Na, J., Song, J. and Jung, J. 2021. Size-dependent chronic toxicity of fragmented polyethylene microplastics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 271, 129591.
- Andrady, A.L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin* 62(8), 1596-1605.
- Andrady, A.L. and Neal, M.A. 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526), 1977-1984.
- Araneda, A.D., Undurraga, P., Lopez, D., Saez, K. and Barra, R. 2016. Use of earthworms as a pesticide exposure indicator in soils under conventional and organic management. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(3), 356-362.
- Armstrong, D., Chesters, G. and Harris, R. 1967. Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Science Society of America Journal* 31(1), 61-66.
- Arthur, C., Baker, J.E. and Bamford, H.A. 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, September 9-11, 2008, University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L. and Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental pollution* 198, 211-222.
- Baeza, C., Cifuentes, C., Gonzalez, P., Araneda, A. and Barra, R. 2020. Experimental Exposure of *Lumbricus terrestris* to Microplastics. *Water Air and Soil Pollution* 231(6), 10.
- Bailey, G.W. and White, J.L. 1964. Soil-pesticide relationships, adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids, with implications concerning pesticide bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 12(4), 324-332.
- Bakir, A., Rowland, S.J. and Thompson, R.C. 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution* 185, 16-23.
- Bandopadhyay, S., Martin-Closas, L., Pelacho, A.M. and DeBruyn, J.M. 2018. Biodegradable plastic mulch films: impacts on soil microbial communities and ecosystem functions. *Frontiers in Microbiology* 9, 819.
- Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C. and Barlaz, M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences* 364(1526), 1985-1998.
- Barriuso, E., Koskinen, W. and Sorenson, B. 1992. Modification of atrazine desorption during field incubation experiments. *Science of the total environment* 123, 333-344.
- Barron, M.G. and Woodburn, K.B. 1995. Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, 1-93.
- Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelnickova, L., Bartos, M., Di Tocco, F.C. and Faggio, C. 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinology Letters* 34(1), 102-108.
- Bele, T.G.D., Neves, T.F., Cristale, J., Prediger, P., Constapel, M. and Dantas, R.F. 2021. Oxidation of microplastics by O₃ and O₃/H₂O₂: Surface modification and adsorption capacity. *Journal of Water Process Engineering* 41.

- Bethsass, J. and Colangelo, A. 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *International journal of occupational and environmental health* 12(3), 260-267.
- Blasing, M. and Amelung, W. 2018. Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science of the Total Environment* 612, 422-435.
- Booth, L.H., Heppelthwaite, V.J., Webster, R. and O'Halloran, K. 2001. Lysosomal neutral red retention time as a biomarker of organophosphate exposure in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*: Laboratory and semi-field experiments. *Biomarkers* 6(1), 77-82.
- Booth, L.H., Hodge, S. and O'Halloran, K. 2000. Use of cholinesterase in *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Lumbricidae) to detect organophosphate contamination: comparison of laboratory tests, mesocosms, and field studies. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 19(2), 417-422.
- Boughattas, I., Zitouni, N., Hattab, S., Mkhinini, M., Missawi, O., Helaoui, S., Mokni, M., Bousserhine, N. and Banni, M. 2022. Interactive effects of environmental microplastics and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on the earthworm *Eisenia andrei*. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127578.
- Brown, G.G. and Doube, B.M. (2004) *Earthworm ecology*, pp. 213-239, CRC Press.
- Burken, J.G. and Schnoor, J.L. 1997. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science & Technology* 31(5), 1399-1406.
- Butt, K.R., Frederickson, J. and Morris, R.M. 1992. The intensive production of *Lumbricus terrestris* L. for soil amelioration. *Soil Biology and Biochemistry* 24(12), 1321-1325.
- Calderbank, A. 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 71-103.
- Calisi, A., Lionetto, M.G. and Schettino, T. 2011. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. *Science of the Total Environment* 409(20), 4456-4464.
- Cao, D., Wang, X., Luo, X., Liu, G. and Zheng, H. 2017. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil, p. 012148, IOP Publishing.
- Capowiez, Y., Dittbrenner, N., Rault, M., Triebskorn, R., Hedde, M. and Mazzia, C. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution* 158(2), 388-393.
- Casabé, N., Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M.L., Pamparato, L., Basack, S., Giménez, R., Massaro, R., Papa, J.C. and Kesten, E. 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments* 7(4), 232-239.
- Chambers, J.E., Meek, E.C. and Chambers, H.W. (2010) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, pp. 1399-1407, Elsevier.
- Chen, C., Chen, L., Li, Y., Fu, W., Shi, X., Duan, J. and Zhang, W. 2020a. Impacts of microplastics on organotins' photodegradation in aquatic environments. *Environmental Pollution* 267, 115686.
- Chen, Y., Liu, X., Leng, Y. and Wang, J. 2020b. Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils. *Ecotoxicology and environmental safety* 187, 109788.
- Cheng, Y., Zhu, L., Song, W., Jiang, C., Li, B., Du, Z., Wang, J., Wang, J., Li, D. and Zhang, K. 2020. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). *Science of the Total Environment* 746, 141280.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. and Galloway, T.S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* 62(12), 2588-2597.
- Cooper, J. and Dobson, H. 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* 26(9), 1337-1348.
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C. and Cluzeau, D. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology* 35(3), 115-134.
- Demon, M., Schiavon, M., Portal, J.-M. and Munier-Lamy, C. 1994. Seasonal dynamics of atrazine in three soils under outdoor conditions. *Chemosphere* 28(3), 453-466.

- Dempsey, M.A., Fisk, M.C., Yavitt, J.B., Fahey, T.J. and Balsler, T.C. 2013. Exotic earthworms alter soil microbial community composition and function. *Soil Biology and Biochemistry* 67, 263-270.
- Dittbrenner, N., Schmitt, H., Capowiez, Y. and Triebkorn, R. 2011. Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. *Journal of Soils and Sediments* 11(6), 1000.
- Dolar, A., Selonen, S., van Gestel, C.A.M., Perc, V., Drobne, D. and Kokalj, A.J. 2021. Microplastics, chlorpyrifos and their mixtures modulate immune processes in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*. *Science of the Total Environment* 772.
- Dongxing, Z., Yucui, N., Congmin, J., Liyan, L., Xiaoli, P. and Xu, C. 2019. Correlation of the oxidative stress indices and Cd exposure using a mathematical model in the earthworm, *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 216, 157-167.
- Drake, H.L. and Horn, M.A. 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 169-189.
- Edwards, C. and Lofty, J. 1972. *Biology of earthworms.*—283 pp. Chapman & Hall, London.
- Edwards, C.A. 2004. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. *Earthworm ecology* 2, 3-11.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V. and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7(2), 88-95.
- Endo, S. and Koelmans, A.A. (2016) Hazardous chemicals associated with plastics in the marine environment, pp. 185-204, Springer.
- Espi, E., Salmeron, A., Fontecha, A., García, Y. and Real, A. 2006. Plastic films for agricultural applications. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 22(2), 85-102.
- Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I. and Felice, M.R. 2016. Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 180, 258-265.
- Farenhorst, A., Topp, E., Bowman, B. and Tomlin, A. 2000. Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry* 32(1), 23-33.
- Fendall, L.S. and Sewell, M.A. 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. *Marine pollution bulletin* 58(8), 1225-1228.
- Fonte, E., Ferreira, P. and Guilhermino, L. 2016. Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Aquatic toxicology* 180, 173-185.
- Foradori, C.D., Zimmerman, A.D., Hinds, L.R., Zuloaga, K.L., Breckenridge, C.B. and Handa, R.J. 2013. Atrazine inhibits pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release without altering GnRH messenger RNA or protein levels in the female rat. *Biology of reproduction* 88(1), 9, 1-7.
- Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H.Q. and Zhao, B. 2018. Acetylcholinesterase is a potential biomarker for a broad spectrum of organic environmental pollutants. *Environmental science & technology* 52(15), 8065-8074.
- Fukuto, T.R. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives* 87, 245-254.
- García-Santos, G. and Keller-Forrer, K. 2011. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere* 84(5), 651-656.
- García Fernández, A.J. and Navas Ruíz, I. 2020. Biomarcadores en Toxicología y Ecotoxicología.
- Garrido, S., Linares, M., Campillo, J.A. and Albentosa, M. 2019. Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae *Isochrysis galbana*, clone t-ISO. *Ecotoxicology and environmental safety* 173, 103-109.
- Geyer, R., Jambeck, J.R. and Law, K.L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances* 3(7), e1700782.
- Gilman, A.P. and Vardanis, A. 1974. Carbofuran. Comparative toxicity and metabolism in the worms *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Journal of agricultural and food chemistry* 22(4), 625-628.

- Goeran, L., Hubert, R., Gert, R., Birgit, S.-K., Peter, G., Jean-Philippe, P. and Hermann, S. 2010. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry* 177(2), 751-766.
- Graymore, M., Stagnitti, F. and Allinson, G. 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International* 26(7-8), 483-495.
- Gregory, M.R. 1996. Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. *Marine pollution bulletin* 32(12), 867-871.
- Griffith, B., Türke, M., Weisser, W.W. and Eisenhauer, N. 2013. Herbivore behavior in the anecic earthworm species *Lumbricus terrestris* L.? *European Journal of Soil Biology* 55, 62-65.
- Gysin, H. and Knusli, E. 1960. Chemistry and herbicidal properties of triazine derivatives. *Adv. in Pest Control Res.* 3, 289-353.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.P., Owen, R. and Galloway, T.S. 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal* 2(4), 312-329.
- Haites, N., Don, M. and Masters, C. 1972. Heterogeneity and molecular weight inter-relationships of the esterase isoenzymes of several invertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology* (2), 303-322.
- Hallam, J. and Hodson, M.E. 2020. Impact of different earthworm ecotypes on water stable aggregates and soil water holding capacity. *Biology and Fertility of Soils* 56(5), 607-617.
- Hanvey, J.S., Lewis, P.J., Lavers, J.L., Crosbie, N.D., Pozo, K. and Clarke, B.O. 2017. A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. *Analytical Methods* 9(9), 1369-1383.
- He, D.F., Luo, Y.M., Lu, S.B., Liu, M.T., Song, Y. and Lei, L.L. 2018. Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 109, 163-172.
- Helfrich, L.A., Weigmann, D.L., Hipkins, P.A. and Stinson, E.R. 2009. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems.
- Hernandez, A.F., Gil, F. and Lacasana, M. 2017. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of Toxicology* 91(10), 3211-3223.
- Hess, W.N. 1925. Nervous system of the earthworm, *lumbricus terrestris* L. *Journal of Morphology* 40(2), 235-259.
- Hickey, W., Fuster, D. and Lamar, R. 1994. Transformation of atrazine in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biology and Biochemistry* 26(12), 1665-1671.
- Hincapié, M., Maldonado, M., Oller, I., Gernjak, W., Sánchez-Pérez, J., Ballesteros, M. and Malato, S. 2005. Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances. *Catalysis Today* 101(3-4), 203-210.
- Hodge, S., Webster, K., Booth, L., Hepplethwaite, V. and O'HALLORAN, K. 2000. Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Soil biology & biochemistry* 32(3), 425-428.
- Hodson, M.E., Duffus-Hodson, C.A., Clark, A., Prendergast-Miller, M.T. and Thorpe, K.L. 2017. Plastic Bag Derived-Microplastics as a Vector for Metal Exposure in Terrestrial Invertebrates. *Environmental Science & Technology* 51(8), 4714-4721.
- Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E. and Svendsen, C. 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment* 586, 127-141.
- Houot, S., Barriuso, E. and Bergheaud, V. 1998. Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 30(14), 2147-2157.
- Hudu, M., Issifu, A. and Zarouk, I.A. 2021. AN ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF HERBICIDES ON THE POPULATION DENSITY OF EARTHWORMS (*LUMBRICUS TERRESTRIS*) IN SOIL.
- Huerta Lwanga, E., Mendoza Vega, J., Ku Quej, V., Chi, J.d.I.A., Sanchez del Cid, L., Chi, C., Escalona Segura, G., Gertsen, H., Salánki, T. and van der Ploeg, M. 2017. Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain. *Scientific Reports* 7(1), 1-7.

- Hüffer, T., Metzelder, F., Sigmund, G., Slawek, S., Schmidt, T.C. and Hofmann, T. 2019. Polyethylene microplastics influence the transport of organic contaminants in soil. *Science of the Total Environment* 657, 242-247.
- Hüffer, T., Weniger, A.-K. and Hofmann, T. 2018. Sorption of organic compounds by aged polystyrene microplastic particles. *Environmental Pollution* 236, 218-225.
- Isensee, A.R. and Sadeghi, A.M. 1994. Effects of tillage and rainfall on atrazine residue levels in soil. *Weed Science* 42(3), 462-467.
- Jager, T., Fleuren, R.H., Hogendoorn, E.A. and De Korte, G. 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environmental science & technology* 37(15), 3399-3404.
- Jouquet, P., Dauber, J., Lagerlöf, J., Lavelle, P. and Lepage, M. 2006. Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied soil ecology* 32(2), 153-164.
- Karlsson, A.S., Weihermüller, L., Tappe, W., Mukherjee, S. and Spielvogel, S. 2016. Field scale boscalid residues and dissipation half-life estimation in a sandy soil. *Chemosphere* 145, 163-173.
- Kaufman, D. and Kearney, P. 1970. Microbial degradation of s-triazine herbicides. *Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides*, 235-265.
- Khan, S. (1978) *Developments in soil science*, pp. 137-171, Elsevier.
- Khan, S.U. and Saidak, W.J. 1981. RESIDUES OF ATRAZINE AND ITS METABOLITES AFTER PROLONGED USAGE. *Weed Research* 21(1), 9-12.
- Kim, D., Chae, Y. and An, Y.-J. 2017. Mixture toxicity of nickel and microplastics with different functional groups on *Daphnia magna*. *Environmental science & technology* 51(21), 12852-12858.
- Kim, Y.N., Yoon, J.H. and Kim, K.H. 2020. Microplastic contamination in soil environment - a review. *Soil Science Annual* 71(4), 300-308.
- Kizilkaya, R., Karaca, A., Turgay, O.C. and Cetin, S.C. (2011) *Biology of earthworms*, pp. 141-158, Springer.
- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A. and Janssen, C.R. 2016. Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental science & technology* 50(7), 3315-3326.
- Kucka, M., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Stojilkovic, S.S. and Kovacevic, R. 2012. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicology and Applied Pharmacology* 265(1), 19-26.
- Kumar, V., Upadhyay, N., Singh, S., Singh, J. and Kaur, P. 2013. Thin-layer chromatography: comparative estimation of soil's atrazine. *Current World Environment* 8(3), 469.
- Kwak, J.I. and An, Y.-J. 2021. Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability. *Journal of Hazardous Materials* 402, 124034.
- Lan, J., Jia, J., Liu, A., Yu, Z. and Zhao, Z. 2019. Pollution levels of banned and non-banned pesticides in surface sediments from the East China Sea. *Marine pollution bulletin* 139, 332-338.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K. and Basta, N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and environmental safety* 57(1), 39-47.
- Larché, J.-F., Bussi re, P.-O., Therias, S. and Gardette, J.-L. 2012. Photooxidation of polymers: Relating material properties to chemical changes. *Polymer Degradation and Stability* 97(1), 25-34.
- Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Schmid, J. and Cooper, R.L. 2000. The effects of atrazine on female Wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicological sciences* 58(2), 366-376.
- Lee, K.E. (1985) *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*, Academic Press Inc.
- Lei, L., Liu, M., Song, Y., Lu, S., Hu, J., Cao, C., Xie, B., Shi, H. and He, D. 2018. Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative damage and other adverse effects in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science: Nano* 5(8), 2009-2020.
- Li, H., Wang, F., Li, J., Deng, S. and Zhang, S. 2021. Adsorption of three pesticides on polyethylene microplastics in aqueous solutions: Kinetics, isotherms, thermodynamics, and molecular dynamics simulation. *Chemosphere* 264, 128556.

- Li, J., Zhang, K. and Zhang, H. 2018. Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental Pollution* 237, 460-467.
- Lin, J., Li, H.-X., Qin, L., Du, Z.-H., Xia, J. and Li, J.-L. 2016a. A novel mechanism underlies atrazine toxicity in quails (*Coturnix Coturnix coturnix*): triggering ionic disorder via disruption of ATPases. *Oncotarget* 7(51), 83880.
- Lin, J., Li, H.-X., Xia, J., Li, X.-N., Jiang, X.-Q., Zhu, S.-Y., Ge, J. and Li, J.-L. 2016b. The chemopreventive potential of lycopene against atrazine-induced cardiotoxicity: modulation of ionic homeostasis. *Scientific reports* 6(1), 1-12.
- Lionetto, M., Caricato, R., Calisi, A. and Schettino, T. 2011. Acetylcholinesterase inhibition as a relevant biomarker in environmental biomonitoring: new insights and perspectives. *Ecotoxicology around the globe*, 87-115.
- Liu, E., He, W. and Yan, C. 2014a. 'White revolution' to 'white pollution'—agricultural plastic film mulch in China. *Environmental Research Letters* 9(9), 091001.
- Liu, G., Zhu, Z., Yang, Y., Sun, Y., Yu, F. and Ma, J. 2019a. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. *Environmental Pollution* 246, 26-33.
- Liu, M., Lu, S., Song, Y., Lei, L., Hu, J., Lv, W., Zhou, W., Cao, C., Shi, H. and Yang, X. 2018. Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. *Environmental Pollution* 242, 855-862.
- Liu, X., Li, W.-J., Li, L., Yang, Y., Mao, L.-G. and Peng, Z. 2014b. A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for direct detection of atrazine. *Sensors and Actuators B: Chemical* 191, 408-414.
- Liu, X., Shi, H., Xie, B., Dionysiou, D.D. and Zhao, Y. 2019b. Microplastics as both a sink and a source of bisphenol A in the marine environment. *Environmental Science & Technology* 53(17), 10188-10196.
- Liu, Y., Xu, G. and Yu, Y. 2022. Effects of polystyrene microplastics on accumulation of pyrene by earthworms. *Chemosphere* 296, 134059.
- Luís, L.G., Ferreira, P., Fonte, E., Oliveira, M. and Guilhermino, L. 2015. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquatic Toxicology* 164, 163-174.
- Lwanga, E.H., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A. and Geissen, V. 2016. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental Science & Technology* 50(5), 2685-2691.
- Lwanga, E.H., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A. and Geissen, V. 2017. Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 220, 523-531.
- Lwanga, E.H., Thapa, B., Yang, X.M., Gertsen, H., Salanki, T., Geissen, V. and Garbeva, P. 2018. Decay of low-density polyethylene by bacteria extracted from earthworm's guts: A potential for soil restoration. *Science of the Total Environment* 624, 753-757.
- Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Burley, T.E., Loftin, K.A., Meyer, M.T. and Nowell, L.H. 2017. Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. *Science of the Total Environment* 579, 149-158.
- Mahmood, I., Imadi, S.R., Shazadi, K., Gul, A. and Hakeem, K.R. (2016) *Plant, soil and microbes*, pp. 253-269, Springer.
- Mamani Alejo, M. 2019. El uso de *Lumbricus terrestris* como bioindicador de suelos contaminados.
- Man, L. and Zucong, C. 2009. Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *Journal of Environmental Sciences* 21(4), 458-467.
- Maqbool, F., Mostafalou, S., Bahadar, H. and Abdollahi, M. 2016. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life sciences* 145, 265-273.

- Marques, C., Pereira, R. and Gonçalves, F. 2009. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments* 9(2), 137-147.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. and Vallette, F.-M. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology* 41(1), 31-91.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C. and Kaminuma, T. 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental science & technology* 35(2), 318-324.
- Miao, J., Chen, X., Xu, T., Yin, D., Hu, X. and Sheng, G.D. 2018. Bioaccumulation, distribution and elimination of lindane in *Eisenia foetida*: the aging effect. *Chemosphere* 190, 350-357.
- Morcillo, S.M., Yela, J.L., Capowiez, Y., Mazzia, C., Rault, M. and Sanchez-Hernandez, J.C. 2013. Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos. *Ecotoxicology* 22(4), 597-607.
- Morgan, A., Stürzenbaum, S., Winters, C., Grime, G., Aziz, N.A.A. and Kille, P. 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57(1), 11-19.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M. and Vernet, G. 2003. Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil. *Applied Soil Ecology* 23(1), 69-77.
- Müller, A., Becker, R., Dorgerloh, U., Simon, F.-G. and Braun, U. 2018. The effect of polymer aging on the uptake of fuel aromatics and ethers by microplastics. *Environmental Pollution* 240, 639-646.
- Muñoz-Quezada, M.T., Lucero, B., Iglesias, V. and Muñoz, M.P. 2014. Vías de exposición a plaguicidas en escolares de la Provincia de Talca, Chile. *Gaceta sanitaria* 28(3), 190-195.
- Nerin, C., Tornés, A., Domeno, C. and Cacho, J. 1996. Absorption of pesticides on plastic films used as agricultural soil covers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(12), 4009-4014.
- Nousiainen, A.O., Björklöf, K., Sagarkar, S., Nielsen, J.L., Kapley, A. and Jørgensen, K.S. 2015. Bioremediation strategies for removal of residual atrazine in the boreal groundwater zone. *Applied microbiology and biotechnology* 99(23), 10249-10259.
- Ochoa-Acuña, H., Frankenberger, J., Hahn, L. and Carbajo, C. 2009. Drinking-water herbicide exposure in Indiana and prevalence of small-for-gestational-age and preterm delivery. *Environmental health perspectives* 117(10), 1619-1624.
- Pandey, P.C. and Singh, G. 2001. Tetraphenylborate doped polyaniline based novel pH sensor and solid-state urea biosensor. *Talanta* 55(4), 773-782.
- Paoletti, M.G. 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74(1-3), 137-155.
- Park, J.-H., Feng, Y., Cho, S.Y., Voice, T.C. and Boyd, S.A. 2004. Sorbed atrazine shifts into non-desorbable sites of soil organic matter during aging. *Water Research* 38(18), 3881-3892.
- Pathak, R.K. and Dikshit, A.K. 2012. Effect of various environmental parameters on biosorptive removal of atrazine from Water Environment. *International journal of environmental science and development* 3(3), 289.
- Pathan, S.I., Arfaioi, P., Bardelli, T., Ceccherini, M.T., Nannipieri, P. and Pietramellara, G. 2020. Soil Pollution from Micro- and Nanoplastic Debris: A Hidden and Unknown Biohazard. *Sustainability* 12(18), 7255.
- Peakall, D.B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3(3), 157-160.
- Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M. and Vandenbulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34(1), 199-228.
- Perreault, J.M. and Whalen, J.K. 2006. Earthworm burrowing in laboratory microcosms as influenced by soil temperature and moisture. *Pedobiologia* 50(5), 397-403.
- Picco, E.J., Boggio, J.C. and Rodríguez, C. 2010. CLORPIRIFÓS: EFECTOS SOBRE LAS ESTERASAS Y REPERCUSIÓN TOXICOLÓGICA SOBRE LOS SERES VIVOS. *Panorama actual del medicamento* 34(336), 679.

- Prendergast-Miller, M.T., Katsiamides, A., Abbass, M., Sturzenbaum, S.R., Thorpe, K.L. and Hodson, M.E. 2019. Polyester-derived microfibre impacts on the soil-dwelling earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 251, 453-459.
- Prentø, P. 1987. Distribution of 20 enzymes in the midgut region of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L., with particular emphasis on the physiological role of the chloragoc tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 87(1), 135-142.
- Prokić, M.D., Radovanović, T.B., Gavrić, J.P. and Faggio, C. 2019. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. *TrAC Trends in analytical chemistry* 111, 37-46.
- Radosevich, M., Traina, S.J. and Tuovinen, O.H. 1997. Atrazine mineralization in laboratory-aged soil microcosms inoculated with s-triazine-degrading bacteria, Wiley Online Library.
- Raju, S., Carbery, M., Kuttykattil, A., Senathirajah, K., Subashchandrabose, S., Evans, G. and Thavamani, P. 2018. Transport and fate of microplastics in wastewater treatment plants: implications to environmental health. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 17(4), 637-653.
- Rault, M., Collange, B., Mazzia, C. and Capowiez, Y. 2008. Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil biology and biochemistry* 40(12), 3086-3091.
- Rault, M., Mazzia, C. and Capowiez, Y. 2007. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147(2), 340-346.
- Rayner, J.L., Enoch, R.R. and Fenton, S.E. 2005. Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicological Sciences* 87(1), 255-266.
- Regoli, F. and Giuliani, M.E. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research* 93, 106-117.
- Rillig, M.C., Ziersch, L. and Hempel, S. 2017. Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific Reports* 7.
- Rinsky, J.L., Hopenhayn, C., Golla, V., Browning, S. and Bush, H.M. 2012. Atrazine exposure in public drinking water and preterm birth. *Public health reports* 127(1), 72-80.
- Rodríguez-Seijo, A., da Costa, J.P., Rocha-Santos, T., Duarte, A.C. and Pereira, R. 2018. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* 25(33), 33599-33610.
- Rodríguez-Seijo, A., Lourenco, J., Rocha-Santos, T.A.P., da Costa, J., Duarte, A.C., Vala, H. and Pereira, R. 2017. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouche. *Environmental Pollution* 220, 495-503.
- Salazar-Ledesma, M., Prado, B., Zamora, O. and Siebe, C. 2018. Mobility of atrazine in soils of a wastewater irrigated maize field. *Agriculture, ecosystems & environment* 255, 73-83.
- Sanchez-Hernandez, J. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 85-126.
- Sanchez-Hernandez, J.C. 2021. A toxicological perspective of plastic biodegradation by insect larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 248, 109117.
- Sanchez-Hernandez, J.C., del Pino, J.N., Capowiez, Y., Mazzia, C. and Rault, M. 2018a. Soil enzyme dynamics in chlorpyrifos-treated soils under the influence of earthworms. *Science of the Total Environment* 612, 1407-1416.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Mazzia, C., Capowiez, Y. and Rault, M. 2009. Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco) toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 150(4), 503-511.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Ríos, J.M. and Attademo, A.M. 2018b. Response of digestive enzymes and esterases of ecotoxicological concern in earthworms exposed to chlorpyrifos-treated soils. *Ecotoxicology* 27(7), 890-899.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Ro, K.S., Szogi, A.A., Chang, S. and Park, B. 2021. Earthworms increase the potential for enzymatic bio-activation of biochars made from co-pyrolyzing animal manures and plastic wastes. *Journal of Hazardous Materials* 408, 124405.

- Sanchez-Hernandez, J.C. and Wheelock, C.E. 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 157(1), 264-272.
- SANZ, P. and REPETTO, M. 1995. Implicaciones toxicológicas. *Toxicología avanzada*, 117.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N. and Sarker, S. 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.
- Scheunert, I. 1992. Transformation and degradation of pesticides in soil. *Chemistry of Plant Protection* (Germany, FR).
- Schmidel, A.J., Assmann, K.L., Werlang, C.C., Bertocello, K.T., Francescon, F., Rambo, C.L., Beltrame, G.M., Calegari, D., Batista, C.B. and Blaser, R.E. 2014. Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. *Neurotoxicology and teratology* 44, 62-69.
- Schmolke, A., Thorbek, P., Chapman, P. and Grimm, V. 2010. Ecological models and pesticide risk assessment: current modeling practice. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 29(4), 1006-1012.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L. and Treilhou, M. 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71(10), 1832-1839.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2019. Declaración de ventas de plaguicidas de uso agrícola año 2019. [en línea] https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/declaracion_de_ventas_de_plaguicidas_ano_2019_0.pdf f. [Consulta: 26 octubre de 2023].
- Sharifinia, M., Bahmanbeigloo, Z.A., Keshavarzifard, M., Khanjani, M.H. and Lyons, B.P. 2020. Microplastic pollution as a grand challenge in marine research: a closer look at their adverse impacts on the immune and reproductive systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204, 111109.
- Shi, Y., Zhang, Q., Huang, D., Zheng, X. and Shi, Y. 2016. Survival, growth, detoxifying and antioxidative responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to soils with industrial DDT contamination. *Pesticide biochemistry and physiology* 128, 22-29.
- Silva, A.B., Bastos, A.S., Justino, C.I., da Costa, J.P., Duarte, A.C. and Rocha-Santos, T.A. 2018. Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry-A review. *Analytica chimica acta* 1017, 1-19.
- Sims, R.W. and Gerard, B.M. (1999) Earthworms: Notes for the identification of British species, Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences Association.
- Singh, S., Kumar, V., Chauhan, A., Datta, S., Wani, A.B., Singh, N. and Singh, J. 2018. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environmental chemistry letters* 16(1), 211-237.
- Sogorb, M.A. and Vilanova, E. 2011. Detoxication of anticholinesterase pesticides. *Anticholinesterase Pesticides* Hoboken, New Jersey, 121-132.
- Song, Y., Zhu, L., Wang, J., Wang, J., Liu, W. and Xie, H. 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry* 41(5), 905-909.
- Steinmetz, Z., Wollmann, C., Schaefer, M., Buchmann, C., David, J., Tröger, J., Muñoz, K., Frör, O. and Schaumann, G.E. 2016. Plastic mulching in agriculture. Trading short-term agronomic benefits for long-term soil degradation? *Science of the total environment* 550, 690-705.
- Stellin, F., Gavinelli, F., Stevanato, P., Concheri, G., Squartini, A. and Paoletti, M.G. 2018. Effects of different concentrations of glyphosate (Roundup 360®) on earthworms (*Octodrilus complanatus*, *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) in vineyards in the North-East of Italy. *Applied soil ecology* 123, 802-808.
- Stenersen, J., Gilman, A. and Vardanis, A. 1974. Carbofuran: Its Toxicity to and Metabolism by Earthworm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22(2), 342-342.
- Su, Y.-H. and Zhu, Y.-G. 2006. Bioconcentration of atrazine and chlorophenols into roots and shoots of rice seedlings. *Environmental Pollution* 139(1), 32-39.
- Sultatos, L.G. (2006) *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*, pp. 209-218, Elsevier.

- Tang, Y., Liu, Y., Chen, Y., Zhang, W., Zhao, J., He, S., Yang, C., Zhang, T., Tang, C. and Zhang, C. 2021. A review: Research progress on microplastic pollutants in aquatic environments. *Science of The Total Environment* 766, 142572.
- Tao, J., Griffiths, B., Zhang, S., Chen, X., Liu, M., Hu, F. and Li, H. 2009. Effects of earthworms on soil enzyme activity in an organic residue amended rice–wheat rotation agro-ecosystem. *Applied Soil Ecology* 42(3), 221-226.
- Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S. and Thompson, R.C. 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental science & technology* 41(22), 7759-7764.
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J. and Vom Saal, F.S. 2009. Our plastic age, pp. 1973-1976, The Royal Society Publishing.
- Tomlin, A., Protz, R., Martin, R., McCabe, D. and Lagace, R. (1993) Soil structure/soil biota interrelationships, pp. 89-103, Elsevier.
- Trestrail, C., Nuggeoda, D. and Shimeta, J. 2020. Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Science of The Total Environment* 734, 138559.
- van den Berg, P., Huerta-Lwanga, E., Corradini, F. and Geissen, V. 2020. Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils. *Environmental Pollution* 261, 114198.
- Van Dyk, J.S. and Pletschke, B. 2011. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* 82(3), 291-307.
- Van Gestel, C. and Van Brummelen, T. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5(4), 217-225.
- Vejares, S.G., Sabat, P. and Sanchez-Hernandez, J.C. 2010. Tissue-specific inhibition and recovery of esterase activities in *Lumbricus terrestris* experimentally exposed to chlorpyrifos. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 151(3), 351-359.
- Vijver, M.G., Wolterbeek, H.T., Vink, J.P. and van Gestel, C.A. 2005. Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to absorption in the body. *Science of the Total Environment* 340(1-3), 271-280.
- Wagner, M. and Lambert, S. (2018) *Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants?*, Springer Nature.
- Wang, J.-h., Zhu, L.-s., Liu, W., Wang, J. and Xie, H. 2012. Biochemical responses of earthworm (*Eisenia foetida*) to the pesticides chlorpyrifos and fenvalerate. *Toxicology Mechanisms and Methods* 22(3), 236-241.
- Wang, T., Yu, C., Chu, Q., Wang, F., Lan, T. and Wang, J. 2020. Adsorption behavior and mechanism of five pesticides on microplastics from agricultural polyethylene films. *Chemosphere* 244, 125491.
- Wheelock, C.E., Eder, K.J., Werner, I., Huang, H., Jones, P.D., Brammell, B.F., Elskus, A.A. and Hammock, B.D. 2005. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 74(2), 172-192.
- Wheelock, C.E. and Nakagawa, Y. 2010. Carboxylesterases—from function to the field: an overview of carboxylesterase biochemistry, structure–activity relationship, and use in environmental field monitoring. *Journal of Pesticide Science*, 1007140146-1007140146.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J. and Hammock, B.D. 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 117-178.
- Wirbisky, S.E. and Freeman, J.L. 2015. Atrazine exposure and reproductive dysfunction through the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Toxics* 3(4), 414-450.
- Wirbisky, S.E., Weber, G.J., Schlotman, K.E., Sepúlveda, M.S. and Freeman, J.L. 2016. Embryonic atrazine exposure alters zebrafish and human miRNAs associated with angiogenesis, cancer, and neurodevelopment. *Food and Chemical Toxicology* 98, 25-33.
- Worrall, F., Parker, A., Rae, J. and Johnson, A. 1997. The role of earthworm burrows in pesticide transport from ploughlands. *Toxicological & Environmental Chemistry* 61(1-4), 211-222.
- Wu, P., Tang, Y., Jin, H., Song, Y., Liu, Y. and Cai, Z. 2020. Consequential fate of bisphenol-attached PVC microplastics in water and simulated intestinal fluids. *Environmental Science and Ecotechnology* 2, 100027.

- Ya, H.B., Jiang, B., Xing, Y., Zhang, T., Lv, M.J. and Wang, X. 2021. Recent advances on ecological effects of microplastics on soil environment. *Science of the Total Environment* 798.
- Yu, X., Ladewig, S., Bao, S., Toline, C.A., Whitmire, S. and Chow, A.T. 2018. Occurrence and distribution of microplastics at selected coastal sites along the southeastern United States. *Science of the Total Environment* 613, 298-305.
- Zahra, S., Abbas, S.S., Mahsa, M.-T. and Mohsen, N. 2010. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste management* 30(3), 396-401.
- Zhang, M., Zhang, Y., Wang, W., Cui, W., Wang, L., Sun, H. and Liu, C. 2022. Combined effects of microplastics and other contaminants on earthworms: A critical review. *Applied Soil Ecology* 180, 104626.
- Zhou, D., Ning, Y., Wang, B., Wang, G., Su, Y., Li, L. and Wang, Y. 2016. Study on the influential factors of Cd²⁺ on the earthworm *Eisenia fetida* in oxidative stress based on factor analysis approach. *Chemosphere* 157, 181-189.
- Zhou, R., Lu, G., Yan, Z., Jiang, R., Bao, X. and Lu, P. 2020a. A review of the influences of microplastics on toxicity and transgenerational effects of pharmaceutical and personal care products in aquatic environment. *Science of the Total Environment* 732, 139222.
- Zhou, Y., Liu, X. and Wang, J. 2020b. Ecotoxicological effects of microplastics and cadmium on the earthworm *Eisenia foetida*. *Journal of hazardous materials* 392, 122273.
- Zhu, D., Chen, Q.L., An, X.L., Yang, X.R., Christie, P., Ke, X., Wu, L.H. and Zhu, Y.G. 2018. Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition. *Soil Biology & Biochemistry* 116, 302-310.
- Zhu, L., Li, B., Wu, R., Li, W., Wang, J., Wang, J., Du, Z., Juhasz, A. and Zhu, L. 2020. Acute toxicity, oxidative stress and DNA damage of chlorpyrifos to earthworms (*Eisenia fetida*): The difference between artificial and natural soils. *Chemosphere* 255, 126982.
- Zitko, V. and Hanlon, M. 1991. Another source of pollution by plastics: skin cleaners with plastic scrubbers. *Marine pollution bulletin* 22(1), 41-42.

7. ANEXOS

Anexo 1: tablas relacionadas a la cuantificación de atrazina adsorbida a los MPs

Botella	Volumen (L)	Peso real de MP	Volumen extraído	Volumen final (L)
1 (2g, 2 días)	0,1	2,002	0,002	0,098
2 (2g, 2 días, dup)	0,1	2,012	0,002	0,098
3 (2g, 1 sem)	0,1	2,001	0,002	0,098
4 (2g, 1 sem, dup)	0,1	2,0017	0,002	0,098
5 (2g, 2 sem)	0,1	2,0046	0,002	0,098
6 (2g, 2 sem, dup)	0,1	2,007	0,002	0,098
7 (5g, 1 sem y 2 sem)	0,1	5,0084	0,004	0,096
8 (5g, 1 sem y 2 sem dup)	0,1	5,0093	0,004	0,096
9 (control)	0,1	-	0,006	0,094
10 (control) dup	0,1	-	0,0055	0,0945

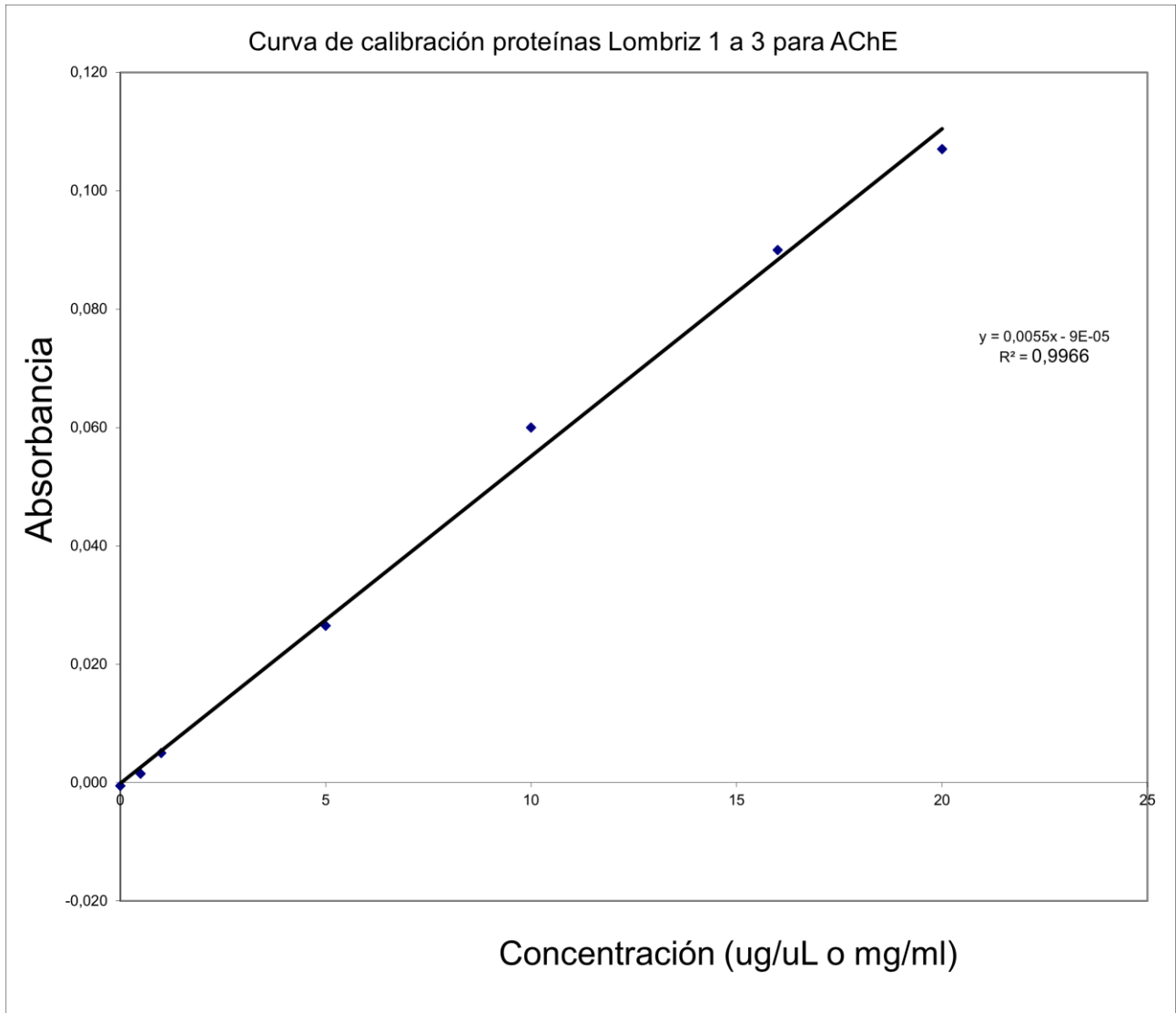
Botella	Cantidad de atrazina remanente en solución		
	02-12-2022	07-12-2022	14-12-2022
1 (2g, 2 días)	0,482		
2 (2g, 2 días, dup)	0,486		
3 (2g, 1 sem)		0,485	
4 (2g, 1 sem, dup)		0,484	
5 (2g, 2 sem)			0,489
6 (2g, 2 sem, dup)			0,482
7 (5g, 1 sem y 2 sem)		0,478	0,478
8 (5g, 1 sem y 2 sem dup)		0,471	0,479
9 (control)	0,494	0,494	0,508
10 (control) dup	0,499	0,499	0,495

Anexo 2: Curvas de calibración, tablas con datos de absorbancias y cálculo de actividad enzimática de AChE para los distintos órganos (VS, BM, IA, IM, PM) diseccionados de *L. terrestris* (n=36).

Curva Calibración proteínas

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Abs-blank	concentración	absorbancia
0	0,06	0,057	0,059	-0,001	0	-0,001
0,5	0,06	0,061	0,061	0,002	0,5	0,002

1	0,065	0,063	0,064	0,005	1	0,005
5	0,092	0,079	0,086	0,027	5	0,027
10	0,117	0,121	0,119	0,060	10	0,060
16	0,152	0,146	0,149	0,090	16	0,090
20	0,167	0,165	0,166	0,107	20	0,107
BLANCO	0,06	0,058	0,059			



Lombriz N°1 a 3	INICIAL-FINAL (delta abs)	ABS*MIN (primer paso)	PROTEINAS						UI/mg proteína	
BLK 1	0,022	0,001833333								
BLK 2	0,023	0,001916667								
BLK 3	0,009	0,00075	0,0015	0,00065085						
SPL1 1	0,06	0,005								
SPL1 2	0,081	0,00675								
SPL1 3	-0,248	-0,02066667	-	0,0153488	-	0,00447222	-0,03	0,01481818	269,93865	-
SPL2 1	1,232	0,10266667	0,00297222						0,00710133	0,71013272
SPL2 2	1,142	0,09516667								
SPL2 3	0,822	0,0685	0,08877778	0,017957	0,08727778	0,51	0,01327273	301,369863	0,15472289	15,4722894
SPL3 1	0,073	0,006083333								
SPL3 2	-0,012	-0,001								
SPL3 3	0,046	0,003833333	0,00297222	0,00361933	0,00147222	0,00866013	0,01145455	349,206349	0,00302417	0,30241726
SPL4 1	0,057	0,00475								
SPL4 2	0,117	0,00975								
SPL4 3	0,04	0,003333333	0,00594444	0,00337097	0,00444444	0,02614379	0,01181818	338,461538	0,00884867	0,88486677

SPL5 1	0,586	0,048833333									
SPL5 2	0,571	0,047583333									
SPL5 3	0,53	0,044166667	0,04686111	0,00241571	0,04536111	0,26683007	0,01572727	254,33526	0,06786429	6,78642941	
SPL6 1	-0,108	-0,009									
SPL6 2	0,068	0,005666667									
SPL6 3	0,307	0,025583333	0,00741667	0,01735796	0,00591667	0,03480392	0,01581818	252,873563	0,00880099	0,88009917	
SPL7 1	0,59	0,049166667									
SPL7 2	0,464	0,038666667									
SPL7 3	-0,039	-0,00325	0,02819444	0,02773314	0,02669444	0,00314052	0,01309091	305,555556	0,0009596	0,09596042	
SPL8 1	1,332	0,111									
SPL8 2	0,87	0,0725									
SPL8 3	1,471	0,122583333	0,10202778	0,02621947	0,10052778	0,0118268	0,07390909	54,1205412	0,00064007	0,06400727	
SPL9 1	0,774	0,0645									
SPL9 2	0,7	0,058333333									
SPL9 3	0,788	0,065666667	0,06283333	0,00394053	0,06133333	0,00721569	0,04272727	93,6170213	0,00067551	0,06755111	
SPL10 1	0,738	0,0615									
SPL10 2	0,525	0,04375									
SPL10 3	0,662	0,055166667	0,05347222	0,0089955	0,05197222	0,30571895	0,01572727	254,33526	0,07775511	7,77551098	
SPL11 1	0,894	0,0745									
SPL11 2	0,797	0,066416667									
SPL11 3	1,119	0,09325	0,07805556	0,01376548	0,07655556	0,00900654	0,027	148,148148	0,0013343	0,13343016	
SPL12 1	0,868	0,072333333									
SPL12 2	0,258	0,0215									
SPL12 3	0,224	0,018666667	0,0375	0,0301998	0,036	0,00423529	0,01590909	251,428571	0,00106487	0,10648739	
SPL13 1	0,493	0,041083333									
SPL13 2	0,46	0,038333333									
SPL13 3	0,463	0,038583333	0,03933333	0,00152069	0,03783333	0,00445098	0,05454545	73,3333333	0,00032641	0,03264052	
SPL14 1	0,209	0,017416667									
SPL14 2	-0,297	-0,02475									
SPL14 3	0,084	0,007	-	0,02196435	-	-	0,03463636	115,485564	-	-0,1094471	
			0,00011111		0,00161111	0,00947712			0,00109447		
SPL15 1	-0,112	-0,009333333									
SPL15 2	-0,728	-0,060666667									
SPL15 3	-0,028	-0,002333333	-	0,03185093	-	-	0,02127273	188,034188	-	-	
			0,02411111		0,02561111	0,00301307			0,00056656	0,05665605	

Lombriz N°4 a 9	INICIAL-FINAL	ABS*MIN	PROTEINAS					UI/mg proteina					
BLK 1	0,142	0,011833333											
BLK 2	0,031	0,002583333											
BLK 3	0,031	0,002583333	0,00566667	0,00534049									
SPL1 1	-0,098	-											
		0,008166667											
SPL1 2	-0,141	-0,01175											
SPL1 3	-0,013	-	-0,007	0,005428193	-	-0,07	0,02028846	197,156398	-	-			
		0,001083333			0,01266667			0,01469008	1,46900846				
SPL2 1	0,259	0,021583333											
SPL2 2	0,544	0,045333333											
SPL2 3	0,595	0,049583333	0,03883333	0,015089317	0,03316667	0,00	0,01423077	281,081081	0,00109677	0,10967674			
SPL3 1	-0,028	-											
		0,002333333											
SPL3 2	0,005	0,000416667											
SPL3 3	-0,03	-0,0025	-	0,00147222	0,001637947	-	0,00713889	0,00083987	0,01269231	315,151515	-	0,00026469	0,02646861
SPL4 1	0,303	0,02525											
SPL4 2	0,464	0,038666667											
SPL4 3	0,44	0,036666667	0,03352778	0,007238177	0,02786111	0,00327778	0,01980769	201,941748	0,00066192	0,06619202			
SPL5 1	-0,051	-0,00425											
SPL5 2	0,024	0,002											
SPL5 3	0,002	0,000166667	-	0,00069444	0,003212749	-	0,00636111	0,00074837	0,02567308	155,805243	-0,0001166	-	0,01165993
SPL6 1	-0,023	-											
		0,001916667											
SPL6 2	0,022	0,001833333											
SPL6 3	0,07	0,005833333	0,00191667	0,003875672	-0,00375	-	0,00044118	0,02134615	187,387387	-8,2671E-05	-	0,00826709	
SPL7 1	-0,187	-											
		0,015583333											
SPL7 2	1,037	0,086416667											
SPL7 3	1,088	0,090666667	0,05383333	0,060154142	0,04816667	0,00566667	0,01461538	273,684211	0,00155088	0,15508772			
SPL8 1	-0,098	-											
		0,008166667											
SPL8 2	-0,242	-											
		0,020166667											
SPL8 3	-0,001	-8,33333E-05	-	0,00947222	0,010105119	-	0,01513889	0,00178105	0,01423077	281,081081	-	0,00050062	0,05006183
SPL9 1	0,543	0,04525											
SPL9 2	0,872	0,072666667											
SPL9 3	0,74	0,061666667	0,05986111	0,013797225	0,05419444	0,00637582	0,01307692	305,882353	0,00195025	0,19502499			
SPL10 1	1,233	0,10275											
SPL10 2	0,932	0,077666667											
SPL10 3	1,135	0,094583333	0,09166667	0,012793499	0,086	0,50588235	0,03173077	126,060606	0,06377184	6,3771836			
SPL11 1	0,078	0,0065											
SPL11 2	0,04	0,003333333											
SPL11 3	0,062	0,005166667	0,005	0,001589899	-	0,00066667	-	0,00392157	0,01980769	201,941748	-	0,00079193	0,07919284
SPL12 1	0,693	0,05775											
SPL12 2	0,763	0,063583333											
SPL12 3	0,419	0,034916667	0,05208333	0,015150174	0,04641667	0,00546078	0,02278846	175,527426	0,00095852	0,09585174			
SPL13 1	0,753	0,06275											
SPL13 2	1,163	0,096916667											
SPL13 3	1,157	0,096416667	0,08536111	0,019583392	0,07969444	0,00937582	0,02355769	169,795918	0,00159198	0,15919755			
SPL14 1	0,172	0,014333333											
SPL14 2	-0,012	-0,001											
SPL14 3	0,005	0,000416667	0,00458333	0,008473406	-	0,00108333	-	0,00012745	0,01375	290,909091	-3,7077E-05	-	0,00370766

SPL15 1	0,272	0,022666667									
SPL15 2	0,014	0,001166667									
SPL15 3	-0,023	-	0,00730556	0,013392145	0,00163889	0,00019281	0,05201923	76,8946396	1,4826E-05	0,00148261	
SPL16 1	0,161	0,001916667									
SPL16 2	0,204	0,013416667									
SPL16 3	0,159	0,017									
SPL17 1	0,159	0,01325	0,01455556	0,002118591	0,00888889	0,05228758	0,01932692	206,965174	0,01082171	1,08217085	
SPL17 2	1,026	0,0855									
SPL17 3	1,534	0,127833333									
SPL18 1	0,999	0,08325	0,09886111	0,025115889	0,09319444	0,01096405	0,01663462	240,462428	0,00263644	0,26364426	
SPL18 2	0,188	0,015666667									
SPL18 3	0,183	0,01525									
SPL19 1	0,111	0,00925	0,01338889	0,003590432	0,00772222	0,04542484	0,03634615	110,05291	0,00499914	0,49991355	
SPL19 2	0,824	0,068666667									
SPL19 3	1,049	0,087416667									
SPL20 1	0,535	0,044583333	0,06688889	0,021471935	0,06122222	0,00720261	0,04125	96,969697	0,00069844	0,06984353	
SPL20 2	0,285	0,02375									
SPL20 3	1,02	0,085									
SPL21 1	1,098	0,0915	0,06675	0,037380643	0,06108333	0,35931373	0,02182692	183,259912	0,0658478	6,58478017	
SPL21 2	0,463	0,038583333									
SPL21 3	0,236	0,019666667									
SPL22 1	0,091	0,007583333	0,02194444	0,015625019	0,01627778	0,09575163	0,01528846	261,63522	0,025052	2,50519998	
SPL22 2	0,776	0,064666667									
SPL22 3	0,886	0,073833333									
SPL23 1	1,06	0,088333333	0,07561111	0,01193307	0,06994444	0,00822876	0,04230769	94,5454545	0,00077799	0,07779917	
SPL23 2	0,312	0,026									
SPL23 3	0,378	0,0315									
SPL24 1	0,288	0,024	0,02716667	0,003883727	0,0215	0,12647059	0,01298077	308,148148	0,03897168	3,89716776	
SPL24 2	0,956	0,079666667									
SPL24 3	0,805	0,067083333									
SPL25 1	0,312	0,026	0,05758333	0,028066266	0,05191667	0,00610784	0,08576923	46,6367713	0,00028485	0,02848501	
SPL25 2	-0,019	-									
SPL25 3	0,188	0,001583333									
SPL26 1	-0,022	-	0,00408333	0,01003224	-	-	0,04923077	81,25	-1,5135E-05	-	0,00151348
SPL26 2	0,573	0,04775			0,00158333	0,00018627					
SPL26 3	0,248	0,020666667									
SPL27 1	0,371	0,030916667	0,03311111	0,013674371	0,02744444	0,16143791	0,01932692	206,965174	0,03341202	3,34120248	
SPL27 2	0,298	0,024833333									
SPL27 3	0,371	0,030916667									
SPL28 1	0,148	0,012333333	0,02269444	0,009474503	0,01702778	0,1001634	0,01451923	275,496689	0,02759468	2,75946847	
SPL28 2	0,683	0,056916667									
SPL28 3	0,768	0,064									
SPL29 1	0,871	0,072583333	0,0645	0,007845292	0,05883333	0,00692157	0,0525	76,1904762	0,00052736	0,05273576	
SPL29 2	1,262	0,105166667									
SPL29 3	1,203	0,10025									
SPL30 1	0,998	0,083166667	0,09619444	0,011547106	0,09052778	0,01065033	0,06173077	64,7975078	0,00069011	0,06901146	
SPL30 2	0,046	0,003833333									
SPL30 3	-0,104	-									
SPL31 1	-0,02	-	0,006264982	-	-	-	0,03788462	105,583756	-9,7303E-05	-	0,00973027
SPL31 2	0,001666667	0,00216667		0,00783333	0,00092157						

Lombrices N°16 a 21	INICIAL-FINAL	ABS*MIN	PROTEINAS					UI/mg proteina				
BLK 1	0,025	0,002083333										
BLK 2	0,027	0,00225										
BLK 3	-0,017	-0,00141667	0,00097222	0,00207052								
SPL1 1	0,086	0,007166667										
SPL1 2	-0,098	-0,00816667										
SPL1 3	-0,059	-0,00491667	-	0,00807961	-	-0,02	0,02521277	158,649789	-	-	0,00274786	0,27478558
SPL2 1	0,963	0,08025										
SPL2 2	1,001	0,083416667										
SPL2 3	0,731	0,060916667	0,07486111	0,0121796	0,07388889	0,01	0,01531915	261,111111	0,00226979	0,22697894		
SPL3 1	0,156	0,013										
SPL3 2	-0,021	-0,00175										
SPL3 3	-0,298	-0,02483333	-	0,01906901	-0,0055	-	0,03235294	0,0137234	291,472868	-0,00943	-	0,94300046
SPL4 1	0,889	0,074083333										
SPL4 2	1,059	0,08825										
SPL4 3	1,019	0,084916667	0,08241667	0,00740683	0,08144444	0,0095817	0,04106383	97,4093264	0,00093335	0,09333469		
SPL5 1	0,865	0,072083333										
SPL5 2	1,216	0,101333333										
SPL5 3	1,172	0,097666667	0,09036111	0,01593484	0,08938889	0,52581699	0,01702128	235	0,12356699	12,3566993		
SPL6 1	0,25	0,020833333										
SPL6 2	0,086	0,007166667										
SPL6 3	-0,303	-0,02525	0,00091667	0,02366887	-5,5556E-05	-0,0003268	0,02106383	189,89899	-6,2058E-05	-	0,00620585	
SPL7 1	0,405	0,03375										
SPL7 2	0,493	0,041083333										
SPL7 3	0,709	0,059083333	0,04463889	0,01303556	0,04366667	0,00513725	0,01542553	81,0344828	0,00041629	0,04162948		

SPL8 1	-0,03	-0,0025									
SPL8 2	0,72	0,06									
SPL8 3	0,417	0,03475	0,03075	0,03144141	0,02977778	0,00350327	0,01468085	85,1449275	0,00029829	0,02982855	
SPL9 1	0,515	0,042916667									
SPL9 2	0,281	0,023416667									
SPL9 3	0,174	0,0145	0,02694444	0,01453309	0,02597222	0,15277778	0,01468085	85,1449275	0,01300825	1,30082528	
SPL10 1	1,293	0,10775									
SPL10 2	0,922	0,076833333									
SPL10 3	0,675	0,05625	0,08027778	0,0259222	0,07930556	0,46650327	0,01755319	71,2121212	0,03322069	3,32206873	
SPL11 1	0,067	0,005583333									
SPL11 2	-0,042	-0,0035									
SPL11 3	-0,036	-0,003	-	0,00510605	-	-	0,02510638	49,7881356	-	-	
SPL12 1	0,348	0,029	0,00030556		0,00127778	0,00751634			0,00037422	0,03742245	
SPL12 2	0,215	0,017916667									
SPL12 3	0,325	0,027083333	0,02466667	0,0059237	0,02369444	0,00278758	0,01531915	81,5972222	0,00022746	0,02274589	
SPL13 1	0,625	0,052083333									
SPL13 2	1,24	0,103333333									
SPL13 3	0,513	0,04275	0,06605556	0,03261905	0,06508333	0,00765686	0,01351064	92,519685	0,00070841	0,07084105	
SPL14 1	-0,025	-0,00208333									
SPL14 2	0,141	0,01175									
SPL14 3	0,047	0,003916667	0,00452778	0,00693688	0,00355556	0,02091503	0,01393617	89,6946565	0,00187597	0,18759667	
SPL15 1	0,521	0,043416667									
SPL15 2	0,885	0,07375									
SPL15 3	0,555	0,04625	0,05447222	0,01675504	0,0535	0,62941176	0,06468085	19,3256579	0,0121638	1,21637964	
SPL16 1	0,058	0,004833333									
SPL16 2	-0,024	-0,002									
SPL16 3	0,077	0,006416667	0,00308333	0,00447291	0,00211111	0,00024837	0,02776596	180,076628	4,4725E-05	0,00447249	
SPL17 1	0,924	0,077									
SPL17 2	0,137	0,011416667									
SPL17 3	0,6	0,05	0,04613889	0,03296171	0,04516667	0,00531373	0,01680851	237,974684	0,00126453	0,12645321	
SPL18 1	0,172	0,014333333									
SPL18 2	0,203	0,016916667									
SPL18 3	-0,348	-0,029	0,00075	0,02579661	-	-	0,01542553	259,310345	-	-	
SPL19 1	0,218	0,018166667									
SPL19 2	0,069	0,00575									
SPL19 3	0,171	0,01425	0,01272222	0,00634775	0,01175	0,06911765	0,01819149	219,883041	0,0151978	1,51977984	
SPL20 1	0,753	0,06275									
SPL20 2	1,296	0,108									
SPL20 3	1,268	0,105666667	0,09213889	0,02547825	0,09116667	0,53627451	0,01691489	236,477987	0,12681712	12,6817117	
SPL21 1	0,125	0,010416667									
SPL21 2	0,103	0,008583333									
SPL21 3	0,15	0,0125	0,0105	0,00195966	0,00952778	0,05604575	0,01723404	290,123457	0,01626019	1,62601872	
SPL22 1	0,792	0,066									
SPL22 2	1,074	0,0895									
SPL22 3	0,839	0,069916667	0,07513889	0,01259032	0,07416667	0,00872549	0,01712766	233,540373	0,00203775	0,20377542	
SPL23 1	-0,102	-0,0085									
SPL23 2	-0,078	-0,0065									
SPL23 3	-0,076	-0,00633333	-	0,00711111	-	0,00808333	-	0,01978723	202,150538	-	
SPL24 1	0,192	0,016									
SPL24 2	0,116	0,009666667									
SPL24 3	0,201	0,01675	0,01413889	0,00389117	0,01316667	0,07745098	0,02202128	181,642512	0,01406839	1,40683906	
SPL25 1	-0,042	-0,0035									
SPL25 2	-0,024	-0,002									
SPL25 3	0,373	0,031083333	0,00852778	0,01954808	0,00755556	0,00088889	0,01659574	241,025641	0,00021425	0,0214245	
SPL26 1	0,303	0,02525									
SPL26 2	-0,321	-0,02675									
SPL26 3	0,003	0,00025	-	0,00041667	0,02600641	-	0,00138889	-	0,00816993	0,02180851	
SPL27 1	0,448	0,037333333									
SPL27 2	0,632	0,052666667									
SPL27 3	0,469	0,039083333	0,04302778	0,00839326	0,04205556	0,00494771	0,01776596	225,149701	0,00111398	0,1113976	
SPL28 1	0,043	0,003583333									
SPL28 2	-0,028	-0,00233333									
SPL28 3	0,066	0,0055	0,00225	0,00408333	0,00127778	0,00751634	0,01489362	268,571429	0,00201867	0,20186741	
SPL29 1	0,574	0,047833333									
SPL29 2	1,197	0,09975									
SPL29 3	1,273	0,106083333	0,08455556	0,03195965	0,08358333	0,00983333	0,04606383	86,8360277	0,00085389	0,08538876	
SPL30 1	-0,012	-0,001									
SPL30 2	0,121	0,010083333									

Lombrices N°22 a 29	INICIAL-FINAL	ABS*MIN	PROTEINAS					UI/mg proteina		
BLK 1	-0,463	-0,03858333								
BLK 2	-0,364	-0,03033333								
BLK 3	-0,073	-0,00608333	-0,025	0,016893663						
SPL1 1	0,334	0,027833333								
SPL1 2	-0,002	-0,00016667								
SPL1 3	0,272	0,022666667	0,016777778	0,014899975	0,041777778	0,05	0,02416667	206,896552	0,01016903	1,01690331
SPL2 1	0,352	0,029333333								
SPL2 2	0,566	0,047166667								
SPL2 3	0,743	0,061916667	0,046138889	0,016315963	0,071138889	0,42	0,01458333	274,285714	0,11477871	11,4778711
SPL3 1	0,129	0,01075								
SPL3 2	0,526	0,043833333								
SPL3 3	-0,124	-0,01033333	0,01475	0,027303973	0,03975	0,04676471	0,02885417	138,628159	0,00648291	0,64829051
SPL4 1	0,559	0,046583333								
SPL4 2	0,341	0,028416667								
SPL4 3	0,35	0,029166667	0,034722222	0,010278866	0,059722222	0,07026144	0,01291667	309,677419	0,02175838	2,17583808
SPL5 1	1,229	0,102416667								
SPL5 2	0,959	0,079916667								
SPL5 3	0,943	0,078583333	0,086972222	0,013391885	0,111972222	0,13173203	0,0159375	250,980392	0,03306216	3,30621556
SPL6 1	0,175	0,014583333								
SPL6 2	0,047	0,003916667								

SPL6 3	0,124	0,010333333	0,009611111	0,005369883	0,034611111	0,04071895	0,0184375	271,186441	0,01104243	1,10424283
SPL7 1	1,381	0,115083333								
SPL7 2	1,746	0,1455								
SPL7 3	1,153	0,096083333	0,118888889	0,024927162	0,143888889	0,16928105	0,0684375	58,4474886	0,00989405	0,9894052
SPL8 1	0,768	0,064								
SPL8 2	0,894	0,0745								
SPL8 3	1,172	0,097666667	0,078722222	0,017225896	0,103722222	0,12202614	0,02270833	176,146789	0,02149451	2,14945134
SPL9 1	0,204	0,017								
SPL9 2	-0,07	-0,005833333								
SPL9 3	0,363	0,03025	0,013805556	0,018252537	0,038805556	0,04565359	0,06010417	66,5511265	0,0030383	0,30382982
SPL10 1	1,25	0,104166667								
SPL10 2	1,054	0,087833333								
SPL10 3	0,902	0,075166667	0,089055556	0,014538582	0,114055556	0,13418301	0,015	266,666667	0,03578214	3,57821351
SPL11 1	0,105	0,00875								
SPL11 2	0,208	0,017333333								
SPL11 3	-0,06	-0,005	0,007027778	0,011265832	0,032027778	0,03767974	0,020625	242,424242	0,00913448	0,91344821
SPL12 1	0,729	0,06075								
SPL12 2	0,813	0,06775								
SPL12 3	0,475	0,039583333	0,056027778	0,014665088	0,081027778	0,0953268	0,01385417	288,721805	0,02752292	2,7522925
SPL13 1	0,223	0,018583333								
SPL13 2	0,657	0,05475								
SPL13 3	0,38	0,031666667	0,035	0,018312299	0,06	0,35294118	0,09354167	42,7616927	0,01509236	1,50923621
SPL14 1	0,294	0,0245								
SPL14 2	0,152	0,012666667								
SPL14 3	0,173	0,014416667	0,017194444	0,006387017	0,042194444	0,04964052	0,04072917	98,2097187	0,00487518	0,48751818
SPL15 1	0,246	0,0205								
SPL15 2	1,33	0,110833333								
SPL15 3	1,178	0,098166667	0,0765	0,048909213	0,1015	0,59705882	0,01770833	225,882353	0,13486505	13,4865052
SPL16 1	0,022	0,001833333								
SPL16 2	0,021	0,00175								
SPL16 3	0,049	0,004083333	0,002555556	0,00132375	0,027555556	0,0324183	0,01802083	277,456647	0,00899467	0,8994673
SPL17 1	0,306	0,0255								
SPL17 2	0,569	0,047416667								
SPL17 3	0,573	0,04775	0,040222222	0,012750908	0,065222222	0,07673203	0,0675	59,2592593	0,00454708	0,4547083
SPL18 1	1,086	0,0905								
SPL18 2	1,193	0,099416667								
SPL18 3	1,226	0,102166667	0,097361111	0,006098915	0,122361111	0,14395425	0,01427083	280,291971	0,04034922	4,034922
SPL19 1	0,044	0,003666667								
SPL19 2	-0,094	-0,007833333								
SPL19 3	-0,001	-8,3333E-05	-0,00141667	0,005864796	0,023583333	0,0277451	0,03760417	106,371191	0,00295128	0,29512791
SPL20 1	1,235	0,102916667								
SPL20 2	1,29	0,1075								
SPL20 3	1,287	0,10725	0,105888889	0,002577053	0,130888889	0,15398693	0,019375	206,451613	0,03179085	3,17908497
SPL21 1	-0,161	-0,01341667								
SPL21 2	-0,02	-0,001666667								
SPL21 3	0,011	0,000916667	-0,00472222	0,007639596	0,020277778	0,02385621	0,01645833	303,797468	0,00724746	0,72474559
SPL22 1	0,545	0,045416667								
SPL22 2	0,476	0,039666667								
SPL22 3	0,392	0,032666667	0,03925	0,006385204	0,06425	0,07558824	0,03604167	110,982659	0,00838898	0,83889833
SPL23 1	1,019	0,084916667								
SPL23 2	1,119	0,09325								
SPL23 3	0,551	0,045916667	0,074694444	0,025268191	0,099694444	0,11728758	0,05041667	79,338843	0,00930546	0,9305461
SPL24 1	0,121	0,010083333								
SPL24 2	-0,353	-0,02941667								
SPL24 3	0,185	0,015416667	-0,00130556	0,02449055	0,023694444	0,02787582	0,01260417	317,355372	0,00884654	0,88465403
SPL25 1	0,979	0,081583333								
SPL25 2	0,869	0,072416667								
SPL25 3	1,055	0,087916667	0,080638889	0,007793041	0,105638889	0,62140523	0,03364583	118,885449	0,07387604	7,38760396
SPL26 1	0,101	0,008416667								
SPL26 2	-0,246	-0,0205								
SPL26 3	-0,392	-0,032666667	-0,01491667	0,021103087	0,010083333	0,01186275	0,01770833	282,352941	0,00334948	0,3349481
SPL27 1	0,165	0,01375								
SPL27 2	0,282	0,0235								
SPL27 3	0,403	0,033583333	0,023611111	0,009917134	0,048611111	0,05718954	0,0275	145,454545	0,00831848	0,83184789
SPL28 1	0,779	0,064916667								
SPL28 2	0,899	0,074916667								
SPL28 3	0,575	0,047916667	0,062583333	0,013650397	0,087583333	0,10303922	0,0746875	53,5564854	0,00551842	0,55184182
SPL29 1	0,549	0,04575								
SPL29 2	0,258	0,0215								
SPL29 3	0,395	0,032916667	0,033388889	0,012131895	0,058388889	0,06869281	0,05052083	79,1752577	0,00543877	0,5438771
SPL30 1	1,369	0,114083333								
SPL30 2	1,285	0,107083333								
SPL30 3	0,942	0,0785	0,099888889	0,018851086	0,124888889	0,1469281	0,01635417	244,585987	0,03593656	3,59365555
SPL31 1	0,423	0,03525								
SPL31 2	0,03	0,0025								
SPL31 3	0,469	0,039083333	0,025611111	0,020106372	0,050611111	0,05954248	0,0153125	326,530612	0,01944244	1,94424436
SPL32 1	0,334	0,027833333								
SPL32 2	0,106	0,008833333								
SPL32 3	0,219	0,01825	0,018305556	0,009500122	0,043305556	0,05094771	0,04604167	86,8778281	0,00442623	0,44262266
SPL33 1	0,402	0,0335								
SPL33 2	0,466	0,038833333								
SPL33 3	0,037	0,003083333	0,025138889	0,019285921	0,050138889	0,05898693	0,0296875	134,736842	0,00794771	0,79477124
SPL34 1	0,247	0,020583333								
SPL34 2	0,208	0,017333333								
SPL34 3	0,379	0,031583333	0,023166667	0,007467987	0,048166667	0,05666667	0,05895833	67,844523	0,00384452	0,3844523
SPL35 1	0,424	0,035333333								
SPL35 2	0,045	0,00375								
SPL35 3	0,539	0,044916667	0,028	0,02154082	0,053	0,06235294	0,03135417	127,574751	0,00795466	0,79546609
SPL36 1	0,133	0,011083333								
SPL36 2	-0,306	-0,0255								
SPL36 3	-0,199	-0,01658333	-0,01033333	0,01907569	0,014666667	0,0172549	0,0115625	432,432432	0,00746158	0,74615792
SPL37 1	0,059	0,004916667								
SPL37 2	-0,115	-0,00958333								
SPL37 3	0,126	0,0105	0,001944444	0,010366323	0,026944444	0,15849673	0,01708333	234,146341	0,03711143	3,71114299
SPL38 1	0,079	0,006583333								
SPL38 2	0,531	0,04425								
SPL38 3	0,552	0,046	0,032277778	0,022269238	0,057277778	0,06738562	0,034375	116,363636	0,00784124	0,78412359

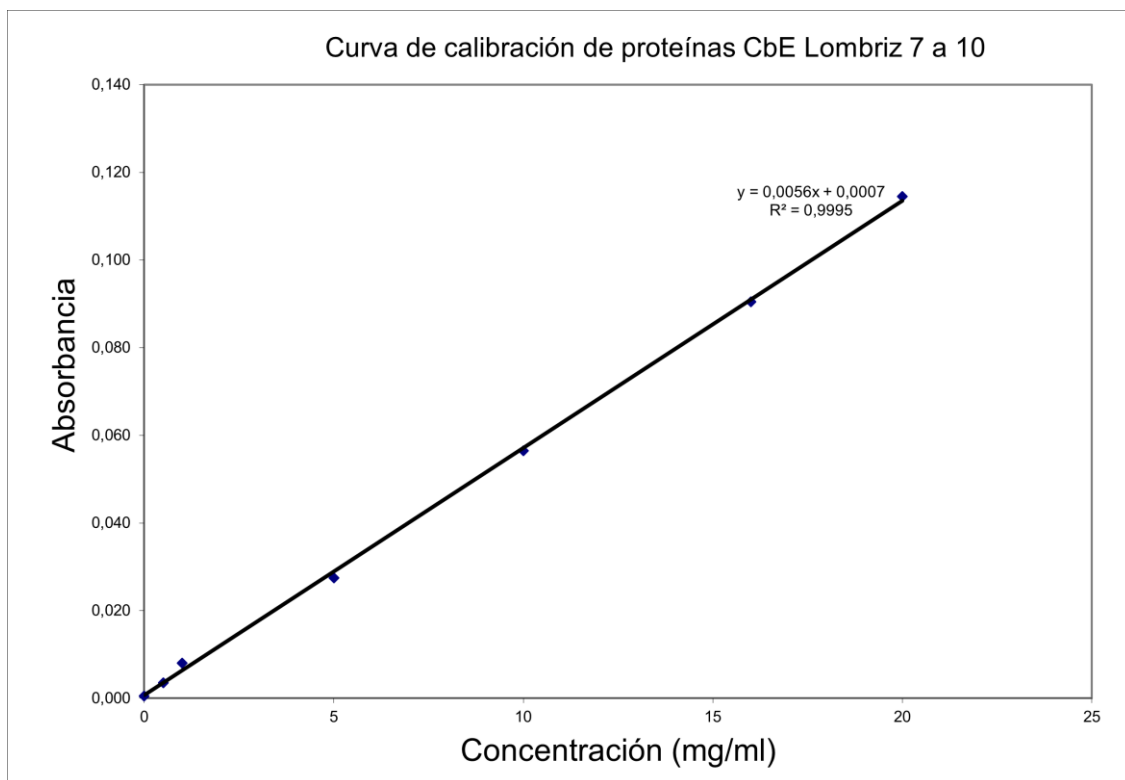
SPL39 1	1,232	0,102666667								
SPL39 2	0,957	0,07975								
SPL39 3	1,229	0,102416667	0,094944444	0,013159369	0,119944444	0,141111111	0,015	266,666667	0,03762963	3,76296296
SPL40 1	1,514	0,126166667								
SPL40 2	1,434	0,1195								

Lombriz N°30 a 32	INICIAL-FINAL	ABS*MIN	PROMEDIO	CV	ABS LIQUIDA	PROTEINAS	A*B/1000	UI/mg proteina		
BLK 1	-0,76	-								
BLK 2	0,016	0,063333333								
BLK 3	-0,049	-	-	0,03587404						
SPL 1 1	0,208	0,017333333								
SPL 1 2	0,036	0,003								
SPL 1 3	0,288	0,024	0,014777778	0,010730711	0,036805556	0,04	0,024324324	205,5555556	0,00890069	0,890068991
SPL 2 1	0,12	0,01								
SPL 2 2	0,015	0,00125								
SPL 2 3	0,011	0,000916667	0,004055556	0,005150737	0,026083333	0,15	0,054189189	73,81546135	0,011325608	1,132560755
SPL 3 1	0,561	0,04675								
SPL 3 2	1,185	0,09875								
SPL 3 3	0,98	0,081666667	0,075722222	0,02650476	0,09775	0,115	0,016351351	244,6280992	0,028132231	2,81322314
SPL 4 1	0,077	0,006416667								
SPL 4 2	0,357	0,02975								
SPL 4 3	0,112	0,009333333	0,015166667	0,012713455	0,037194444	0,04375817	0,042432432	94,26751592	0,004124974	0,412497398
SPL 5 1	0,155	0,012916667								
SPL 5 2	0,423	0,03525								
SPL 5 3	0,469	0,039083333	0,029083333	0,014131328	0,051111111	0,300653595	0,023918919	167,2316384	0,050278793	5,027879325
SPL 6 1	0,173	0,014416667								
SPL 6 2	-0,312	-0,026								
SPL 6 3	-0,077	-	-0,006	0,020211555	0,016027778	0,018856209	0,027972973	178,7439614	0,003370434	0,337043352
SPL 7 1	0,914	0,076166667								
SPL 7 2	0,576	0,048								
SPL 7 3	1,082	0,090166667	0,071444444	0,0214763	0,093472222	0,10996732	0,018108108	220,8955224	0,024291289	2,429128865
SPL 8 1	0,04	0,003333333								
SPL 8 2	0,051	0,00425								
SPL 8 3	-0,233	-	-	0,013407174	0,018083333	0,106372549	0,088513514	45,19083969	0,004807065	0,480706481
SPL 9 1	0,079	0,006583333								
SPL 9 2	-0,257	-								
SPL 9 3	0,131	0,010916667	-	0,017550984	0,020722222	0,024379085	0,065810811	60,78028747	0,001481768	0,148176779
SPL 10 1	0,588	0,049								
SPL 10 2	0,667	0,055583333								
SPL 10 3	0,575	0,047916667	0,050833333	0,00414913	0,072861111	0,428594771	0,018648649	214,4927536	0,091930473	9,193047267
SPL 11 1	-0,333	-0,02775								
SPL 11 2	-0,094	-								
SPL 11 3	0,014	0,001166667	-	0,014797788	0,010555556	0,012418301	0,024324324	205,5555556	0,002552651	0,255265069
SPL 12 1	0,096	0,008								
SPL 12 2	0,101	0,008416667								
SPL 12 3	-0,405	-0,03375	-	0,024225551	0,01625	0,095588235	0,020945946	190,9677419	0,018254269	1,825426945
SPL 13 1	0,024	0,002								
SPL 13 2	0,039	0,00325								
SPL 13 3	0,067	0,005583333	0,003611111	0,001818755	0,025638889	0,150816993	0,017297297	231,25	0,03487643	3,487642974
SPL 14 1	0,142	0,011833333								
SPL 14 2	0,158	0,013166667								
SPL 14 3	0,272	0,022666667	0,015888889	0,005907465	0,037916667	0,044607843	0,028783784	138,9671362	0,006199024	0,619902421
SPL 15 1	0,626	0,052166667								
SPL 15 2	0,013	0,001083333								
SPL 15 3	0,074	0,006166667	0,019805556	0,028140562	0,041833333	0,246078431	0,022027027	181,595092	0,044686635	4,468663539

Lombriz N°33 a 36	INICIAL-FINAL	ABS*MIN	PROMEDIO	CV	ABS LIQUIDA	PROTEINAS	A*B/1000	UI/mg proteina		
BLK 1	0,023	0,001916667								
BLK 2	0,033	0,00275								
BLK 3	0,03	0,0025	0,00238889	0,00042763						
SPL 1 1	-0,785	-0,06541667								
SPL 1 2	0,074	0,006166667								
SPL 1 3	-0,222	-0,0185	-	0,03636342	-	-0,03	0,0225	222,222222	-	-
SPL 2 1	0,288	0,024			0,02830556				0,00740015	0,74001452
SPL 2 2	0,486	0,0405								
SPL 2 3	0,493	0,041083333	0,03519444	0,00969906	0,03280556	0,04	0,018	2,22222222	8,5766E-05	0,00857662
SPL 3 1	-0,056	-0,00466667								
SPL 3 2	0,209	0,017416667								
SPL 3 3	0,161	0,013416667	0,00872222	0,01176634	0,00633333	0,0372549	0,059375	67,3684211	0,0025098	0,25098039
SPL 4 1	0,297	0,02475								
SPL 4 2	-0,095	-0,00791667								
SPL 4 3	-0,037	-0,00308333	0,00458333	0,01763125	0,00219444	0,0025817	0,018625	214,765101	0,00055446	0,05544589
SPL 5 1	1,553	0,129416667								
SPL 5 2	1,366	0,113833333								
SPL 5 3	1,165	0,097083333	0,11344444	0,01617017	0,11105556	0,65326797	0,01925	207,792208	0,13574399	13,5743995
SPL 6 1	0,086	0,007166667								
SPL 6 2	-0,024	-0,002								
SPL 6 3	0,135	0,01125	0,00547222	0,00678557	0,00308333	0,00362745	0,019625	254,77707	0,00092419	0,09241913

SPL7 1	-0,027	-0,00225													
SPL7 2	-0,065	-0,00541667													
SPL7 3	0,076	0,006333333	-	0,00044444	0,00607953	-	0,00283333	-	0,01666667	0,0275	145,454545	-	0,00242424	-	0,24242424
SPL8 1	0,768	0,064													
SPL8 2	0,924	0,077													
SPL8 3	1,084	0,090333333	0,07711111	0,01316702	0,07472222	0,0879085	0,016625	240,601504	0,02115092	2,11509165					
SPL9 1	0,041	0,003416667													
SPL9 2	0,33	0,0275													
SPL9 3	0,104	0,008666667	0,01319444	0,01266402	0,01080556	0,01271242	0,02675	149,53271	0,00190092	0,19009224					
SPL10 1	1,243	0,103583333													
SPL10 2	0,872	0,072666667													
SPL10 3	0,934	0,077833333	0,08469444	0,01656098	0,08230556	0,48415033	0,022875	174,863388	0,08466017	8,46601664					
SPL11 1	0,163	0,013583333													
SPL11 2	0,125	0,010416667													
SPL11 3	0,168	0,014	0,01266667	0,00195966	0,01027778	0,0120915	0,017125	291,970803	0,00353037	0,35303659					
SPL12 1	0,599	0,049916667													
SPL12 2	0,021	0,00175													
SPL12 3	0,038	0,003166667	0,01827778	0,02740924	0,01588889	0,01869281	0,01875	213,333333	0,0039878	0,39877996					
SPL13 1	0,373	0,031083333													
SPL13 2	0,509	0,042416667													
SPL13 3	0,403	0,033583333	0,03569444	0,0059543	0,03330556	0,19591503	0,047375	84,4327177	0,01654164	1,65416386					
SPL14 1	0,638	0,053166667													
SPL14 2	0,7	0,058333333													
SPL14 3	0,051	0,00425	0,03858333	0,02984555	0,03619444	0,0425817	0,027625	144,79638	0,00616568	0,61656759					
SPL15 1	0,908	0,075666667													
SPL15 2	0,506	0,042166667													
SPL15 3	0,245	0,020416667	0,04608333	0,02783246	0,04369444	0,25702614	0,018125	220,689655	0,05672301	5,6723011					
SPL16 1	0,014	0,001166667													
SPL16 2	-0,166	-0,01383333													
SPL16 3	-0,007	-0,00058333	-	0,00441667	0,00820188	-	0,00680556	-	0,00800654	0,026125	191,38756	-	0,00153235	-	0,15323514
SPL17 1	1,149	0,09575													
SPL17 2	0,821	0,068416667													
SPL17 3	0,485	0,040416667	0,06819444	0,02766734	0,06580556	0,0774183	0,058375	68,5224839	0,00530489	0,53048943					
SPL18 1	1,156	0,096333333													
SPL18 2	0,936	0,078													
SPL18 3	1,339	0,111583333	0,09530556	0,01681524	0,09291667	0,10931373	0,02475	161,616162	0,01766686	1,76668647					
SPL19 1	0,061	0,005083333													
SPL19 2	0,206	0,017166667													
SPL19 3	0,009	0,00075	0,00766667	0,00850776	0,00527778	0,00620915	0,017	235,294118	0,00146098	0,14609765					
SPL20 1	0,688	0,057333333													
SPL20 2	0,975	0,08125													
SPL20 3	0,608	0,050666667	0,06308333	0,01608204	0,06069444	0,35702614	0,0175	228,571429	0,08160598	8,16059757					

Anexo 2: Curvas de calibración, tablas con datos de absorbancias y cálculo de actividad enzimática de CbE para los distintos órganos (VS, BM, IA, IM, PM) diseccionados de *L. terrestris* (n=36).



Lombriz N°1 y 2	INICIAL- FINAL (delta abs)	ABS*MIN (primer paso)	PROTEINAS							UI/mg proteina				
BLK 1	0,113	0,009416667												
BLK 2	0,135	0,01125												
BLK 3	0,135	0,01125	0,010333333	0,00129636										
SPL1 1	0,248	0,020666667												
SPL1 2	0,146	0,012166667	0,01641667	0,00601041	0,00608333	0,04	0,83783784	4,77419355	0,00017873	0,01787262				
SPL2 1	0,1	0,008333333												
SPL2 2	0,09	0,0075	0,00791667	0,00058926	-	0,00241667	-0,01	0,81756757	4,89256198	-7,2761E-05	-	0,00727612		
SPL3 1	0,3	0,025												
SPL3 2	0,123	0,01025	0,017625	0,01042983	0,00729167	0,04487179	0,81756757	4,89256198	0,00021954	0,0219538				
SPL4 1	0,304	0,025333333												
SPL4 2	0,16	0,013333333	0,01933333	0,00848528	0,009	0,05538462	0,83108108	4,81300813	0,00026657	0,02665666				
SPL5 1	0,064	0,005333333												
SPL5 2	0,079	0,006583333	0,00595833	0,00088388	-0,004375	-	0,02692308	0,7972973	5,01694915	-	0,00013507	-	0,01350717	
SPL6 1	0,091	0,007583333												
SPL6 2	0,162	0,0135	0,01054167	0,00418372	0,00020833	0,00128205	0,83108108	4,81300813	6,1705E-06	0,00061705				
SPL7 1	0,222	0,0185												
SPL7 2	0,617	0,051416667	0,03495833	0,0232756	0,024625	0,15153846	0,7972973	5,01694915	0,00076026	0,07602608				
SPL8 1	0,065	0,005416667												
SPL8 2	0,062	0,005166667	0,00529167	0,00017678	-	0,00504167	-	0,03102564	0,64864865	6,16666667	-	0,00019132	-	0,01913248
SPL9 1	0,084	0,007												
SPL9 2	0,05	0,004166667	0,00558333	0,00200347	-0,00475	-	0,02923077	4,40540541	0,90797546	-2,6541E-05	-	0,00265408		
SPL10 1	0,116	0,009666667												
SPL11 2	0,216	0,018	0,01383333	0,00589256	0,0035	0,02153846	1,65540541	2,41632653	5,2044E-05	0,0052044				

Lombriz N° 3 a 6	INICIAL- FINAL	ABS*MIN	PROTEINAS mg/mL							UI/mg proteina				
BLK 1	0,113	0,009416667												
BLK 2	0,135	0,01125												
BLK 3	0,135	0,01125	0,01063889	0,001058475										
SPL1 1	0,241	0,020083333												
SPL1 2	0,199	0,016583333												
SPL1 3	0,194	0,016166667	0,01761111	0,002151119	0,00697222	0,04	0,904411765	27,6422764	0,00118602	0,1186019				
SPL2 1	0,506	0,042166667												
SPL2 2	0,067	0,005583333												
SPL2 3	0,248	0,020666667	0,02280556	0,018385217	0,01216667	0,07	0,897058824	27,8688525	0,00208659	0,2086591				
SPL3 1	0,146	0,012166667												
SPL3 2	0,1	0,008333333												
SPL3 3	0,09	0,0075	0,00933333	0,002488864	-	0,00130556	-0,01	0,867647059	28,8135593	-	0,00023149	-	0,02314936	
SPL4 1	0,3	0,025												
SPL4 2	0,123	0,01025												
SPL4 3	0,304	0,025333333	0,02019444	0,008613754	0,00955556	0,06	0,860294118	29,0598291	0,00170882	0,17088173				
SPL5 1	0,123	0,01025												
SPL5 2	0,304	0,025333333												
SPL5 3	0,181	0,015083333	0,01688889	0,007702062	0,00625	0,04	0,794117647	31,4814815	0,00121083	0,12108262				
SPL6 1	0,162	0,0135												
SPL6 2	0,222	0,0185												
SPL6 3	0,134	0,011166667	0,01438889	0,003746603	0,00375	0,02	0,867647059	28,8135593	0,00066493	0,06649283				
SPL7 1	0,064	0,005333333												
SPL7 2	0,079	0,006583333												
SPL7 3	0,069	0,00575	0,00588889	0,000636469	-0,00475	-	0,029230769	0,845588235	29,5652174	-	0,00086421	-	0,0864214	
SPL8 1	0,05	0,004166667												
SPL8 2	0,116	0,009666667												
SPL8 3	0,051	0,00425	0,00602778	0,003151646	-	0,00461111	-	0,028376068	0,875	28,5714286	-	0,00081074	-	0,08107448
SPL9 1	0,131	0,010916667												
SPL9 2	0,188	0,015666667												
SPL9 3	0,156	0,013	0,01319444	0,002380962	0,00255556	0,015726496	0,889705882	28,0991736	0,0004419	0,04419015				
SPL10 1	0,18	0,015												
SPL10 2	0,102	0,0085												
SPL10 3	0,56	0,046666667	0,02338889	0,020419444	0,01275	0,078461538	0,875	28,5714286	0,00224176	0,22417582				
SPL11 1	0,395	0,032916667												
SPL11 2	0,356	0,029666667												
SPL11 3	0,158	0,013166667	0,02525	0,010589893	0,01461111	0,08991453	0,948529412	26,3565891	0,00236984	0,23698403				
SPL12 1	0,064	0,005333333												
SPL12 2	0,064	0,005333333												
SPL12 3	0,127	0,010583333	0,00708333	0,003031089	-	0,00355556	-	0,021880342	0,860294118	29,0598291	-	0,00063584	-	0,0635839
SPL13 1	0,087	0,00725												
SPL13 2	0,614	0,051166667												
SPL13 3	0,095	0,007916667	0,02211111	0,025165057	0,01147222	0,070598291	0,786764706	31,7757009	0,00224331	0,22433102				
SPL14 1	0,74	0,061666667												
SPL14 2	0,114	0,0095												
SPL14 3	0,123	0,01025	0,02713889	0,029904284	0,0165	0,101538462	0,852941176	29,3103448	0,00297613	0,29761273				
SPL15 1	0,07	0,005833333												
SPL15 2	0,15	0,0125												
SPL15 3	0,184	0,015333333	0,01122222	0,004877196	0,00058333	0,003589744	0,860294118	29,0598291	0,00010432	0,01043173				
SPL16 1	1,008	0,084												
SPL16 2	0,391	0,032583333												
SPL16 3	0,173	0,014416667	0,04366667	0,036091416	0,03302778	0,203247863	0,948529412	26,3565891	0,00535692	0,53569204				
SPL17 1	0,629	0,052416667												
SPL17 2	0,633	0,05275												
SPL17 3	0,062	0,005166667	0,03677778	0,027376533	0,02613889	0,160854701	0,867647059	28,8135593	0,0046348	0,46347965				
SPL18 1	0,276	0,023												

SPL18 2	0,169	0,014083333								
SPL18 3	0,077	0,006416667	0,0145	0,008299515	0,00386111	0,023760684	0,867647059	28,8135593	0,00068463	0,06846299
SPL19 1	0,256	0,021333333								
SPL19 2	0,047	0,003916667								
SPL19 3	0,213	0,01775	0,01433333	0,009197297	0,00369444	0,022735043	0,882352941	28,3333333	0,00064416	0,06441595
SPL20 1	0,259	0,021583333								
SPL20 2	0,505	0,042083333								
SPL20 3	0,153	0,01275	0,02547222	0,015048379	0,01483333	0,091282051	0,867647059	28,8135593	0,00263016	0,26301608

Lombriz N° 7 a 10	INICIAL-FINAL	ABS*MIN					PROTEINAS mg/mL			UI/mg proteina
BLK 1	0,064	0,005333333								
BLK 2	0,052	0,004333333								
BLK 3	0,059	0,004916667	0,00486111	0,000502309						
SPL1 1	0,128	0,010666667								
SPL1 2	0,139	0,011583333								
SPL1 3	0,123	0,01025	0,01083333	0,000682113	0,00597222	0,04	0,544642857	45,9016393	0,00168698	0,16869833
SPL2 1	0,375	0,03125								
SPL2 2	0,433	0,036083333								
SPL2 3	0,415	0,034583333	0,03397222	0,002473938	0,02911111	0,18	0,535714286	46,6666667	0,00836011	0,8360114
SPL3 1	0,095	0,007916667								
SPL3 2	0,099	0,00825								
SPL3 3	0,769	0,064083333	0,02675	0,032332045	0,02188889	0,13	0,522321429	47,8632479	0,00644722	0,64472204
SPL4 1	0,065	0,005416667								
SPL4 2	0,195	0,01625								
SPL4 3	0,296	0,024666667	0,01544444	0,009650249	0,01058333	0,07	0,522321429	47,8632479	0,00311725	0,31172474
SPL5 1	0,106	0,008833333								
SPL5 2	0,106	0,008833333								
SPL5 3	0,296	0,024666667	0,01411111	0,009141379	0,00925	0,06	0,535714286	46,6666667	0,00265641	0,26564103
SPL6 1	0,164	0,013666667								
SPL6 2	0,178	0,014833333								
SPL6 3	0,145	0,012083333	0,01352778	0,001380251	0,00866667	0,05	0,526785714	47,4576271	0,00253107	0,25310734
SPL7 1	0,51	0,0425								
SPL7 2	0,139	0,011583333								
SPL7 3	0,301	0,025083333	0,02638889	0,015499627	0,02152778	0,132478632	0,526785714	47,4576271	0,00628712	0,62871215
SPL8 1	0,079	0,006583333								
SPL8 2	0,165	0,01375								
SPL8 3	0,062	0,005166667	0,0085	0,004601479	0,00363889	0,022393162	0,526785714	47,4576271	0,00106273	0,10627264
SPL9 1	0,27	0,0225								
SPL9 2	0,057	0,00475								
SPL9 3	0,054	0,0045	0,01058333	0,010320893	0,00572222	0,035213675	0,526785714	47,4576271	0,00167116	0,16711575
SPL10 1	0,073	0,006083333								
SPL10 2	0,406	0,033833333								
SPL10 3	0,068	0,005666667	0,01519444	0,016143096	0,01033333	0,063589744	0,526785714	47,4576271	0,00301782	0,30178183
SPL11 1	0,252	0,021								
SPL11 2	0,268	0,022333333								
SPL11 3	0,151	0,012583333	0,01863889	0,005286469	0,01377778	0,084786325	0,53125	47,0588235	0,00398994	0,39899447
SPL12 1	0,591	0,04925								
SPL12 2	0,168	0,014								
SPL12 3	0,231	0,01925	0,0275	0,019018083	0,02263889	0,139316239	0,53125	47,0588235	0,00655606	0,65560583
SPL13 1	0,359	0,029916667								
SPL13 2	0,099	0,00825								
SPL13 3	0,201	0,01675	0,01830556	0,010916773	0,01344444	0,082735043	0,535714286	46,6666667	0,00386097	0,38609687
SPL14 1	0,057	0,00475								
SPL14 2	0,061	0,005083333								
SPL14 3	0,247	0,020583333	0,01013889	0,00904669	0,00527778	0,032478632	0,522321429	47,8632479	0,00155453	0,15545328
SPL15 1	0,589	0,049083333								
SPL15 2	0,396	0,033								
SPL15 3	0,552	0,046	0,04269444	0,008536008	0,03783333	0,232820513	0,535714286	46,6666667	0,01086496	1,08649573
SPL16 1	0,125	0,010416667								
SPL16 2	0,608	0,050666667								
SPL16 3	0,317	0,026416667	0,02916667	0,020265426	0,02430556	0,14957265	0,589285714	42,4242424	0,00634551	0,63455063
SPL17 1	0,487	0,040583333								
SPL17 2	0,609	0,05075								
SPL17 3	0,281	0,023416667	0,03825	0,013815249	0,03338889	0,205470085	0,571428571	43,75	0,00898932	0,89893162
SPL18 1	0,119	0,009916667								
SPL18 2	0,177	0,01475								
SPL18 3	0,112	0,009333333	0,01133333	0,00297326	0,00647222	0,03982906	0,544642857	45,9016393	0,00182822	0,18282191
SPL19 1	0,049	0,004083333								
SPL19 2	0,654	0,0545								
SPL19 3	0,063	0,00525	0,02127778	0,02877201	0,01641667	0,101025641	0,526785714	47,4576271	0,00479444	0,47944372
SPL20 1	0,197	0,016416667								
SPL20 2	0,349	0,029083333								
SPL20 3	0,157	0,013083333	0,01952778	0,00844152	0,01466667	0,09025641	0,558035714	44,8	0,00404349	0,40434872

Lombriz N°11 a 16	INICIAL-FINAL	ABS*MIN					PROTEINAS mg/mL			UI/mg proteina
BLK 1	0,049	0,004083333								
BLK 2	0,048	0,004								
BLK 3	0,047	0,003916667	0,004	8,33333E-05						
SPL1 1	0,126	0,0105								
SPL1 2	0,108	0,009								
SPL1 3	0,1	0,008333333	0,00927778	0,001109721	0,00527778	0,0324786	0,545454545	45,8333333	0,0014886	0,1488604
SPL2 1	0,098	0,008166667								
SPL2 2	0,1	0,008333333								
SPL2 3	0,088	0,007333333	0,00794444	0,000535758	0,00394444	0,0242735	0,531818182	47,008547	0,00114106	0,11410622
SPL3 1	0,083	0,006916667								
SPL3 2	0,06	0,005								
SPL3 3	0,059	0,004916667	0,00561111	0,001131412	0,00161111	0,0099145	0,531818182	47,008547	0,00046607	0,04660676
SPL4 1	0,055	0,004583333								
SPL4 2	0,062	0,005166667								
SPL4 3	0,048	0,004	0,00458333	0,000583333	0,00058333	0,0035897	0,540909091	46,2184874	0,00016591	0,01659125

SPL5 1	0,069	0,00575									
SPL5 2	0,067	0,005583333									
SPL5 3	0,062	0,005166667	0,0055	0,000300463	0,0015	0,0092308	0,536363636	46,6101695	0,00043025	0,04302477	
SPL6 1	0,167	0,013916667									
SPL6 2	0,15	0,0125									
SPL6 3	0,158	0,013166667	0,01319444	0,000708742	0,00919444	0,0565812	0,545454545	45,8333333	0,0025933	0,25933048	
SPL7 1	0,105	0,00875									
SPL7 2	0,096	0,008									
SPL7 3	0,096	0,008	0,00825	0,000433013	0,00425	0,026153846	0,536363636	46,6101695	0,00121904	0,12190352	
SPL8 1	0,058	0,004833333									
SPL8 2	0,061	0,005083333									
SPL8 3	0,144	0,012	0,00730556	0,004067429	0,00330556	0,02034188	0,536363636	46,6101695	0,00094814	0,09481385	
SPL9 1	0,054	0,0045									
SPL9 2	0,051	0,00425									
SPL9 3	0,051	0,00425	0,00433333	0,000144338	0,00033333	0,002051282	0,536363636	46,6101695	9,5611E-05	0,00956106	
SPL10 1	0,367	0,030583333									
SPL10 2	0,066	0,0055									
SPL10 3	0,065	0,005416667	0,01383333	0,014505985	0,00983333	0,060512821	0,540909091	46,2184874	0,00279681	0,2796811	
SPL11 1	0,156	0,013									
SPL11 2	0,138	0,0115									
SPL11 3	0,163	0,013583333	0,01269444	0,001074752	0,00869444	0,053504274	0,545454545	45,8333333	0,00245228	0,24522792	
SPL12 1	0,132	0,011									
SPL12 2	0,127	0,010583333									
SPL12 3	0,142	0,011833333	0,01113889	0,000636469	0,00713889	0,043931624	0,540909091	46,2184874	0,00203045	0,20304532	
SPL13 1	0,068	0,005666667									
SPL13 2	0,065	0,005416667									
SPL13 3	0,07	0,005833333	0,00563889	0,000209718	0,00163889	0,01008547	0,531818182	47,008547	0,0004741	0,04741033	
SPL14 1	0,053	0,004416667									
SPL14 2	0,053	0,004416667									
SPL14 3	0,054	0,0045	0,00444444	4,81125E-05	0,00044444	0,002735043	0,531818182	47,008547	0,00012857	0,01285704	
SPL15 1	0,055	0,004583333									
SPL15 2	0,067	0,005583333									
SPL15 3	0,065	0,005416667	0,00519444	0,000535758	0,00119444	0,007350427	0,531818182	47,008547	0,00034553	0,03455329	
SPL16 1	0,137	0,011416667									
SPL16 2	0,145	0,012083333									
SPL16 3	0,143	0,011916667	0,01180556	0,000346944	0,00780556	0,048034188	0,604545455	41,3533835	0,00198638	0,19863762	
SPL17 1	0,218	0,018166667									
SPL17 2	0,209	0,017416667									
SPL17 3	0,411	0,03425	0,02327778	0,00950962	0,01927778	0,118632479	0,554545455	45,0819672	0,00534819	0,53481855	
SPL18 1	0,202	0,016833333									
SPL18 2	0,066	0,0055									
SPL18 3	0,142	0,011833333	0,01138889	0,005679724	0,00738889	0,045470085	0,55	45,4545455	0,00206682	0,20668221	
SPL19 1	0,059	0,004916667									
SPL19 2	0,056	0,004666667									
SPL19 3	0,059	0,004916667	0,00483333	0,000144338	0,00083333	0,005128205	0,545454545	45,8333333	0,00023504	0,02350427	
SPL20 1	0,209	0,017416667									
SPL20 2	0,092	0,007666667									
SPL20 3	0,355	0,029583333	0,01822222	0,010980517	0,01422222	0,087521368	0,554545455	45,0819672	0,00394564	0,39456354	
SPL21 1	0,138	0,0115									
SPL21 2	0,157	0,013083333									
SPL21 3	0,373	0,031083333	0,01855556	0,010878219	0,01455556	0,08957265	0,559090909	44,7154472	0,00400528	0,40052811	
SPL22 1	0,171	0,01425									
SPL22 2	0,172	0,014333333									
SPL22 3	0,169	0,014083333	0,01422222	0,000127294	0,01022222	0,062905983	0,577272727	43,3070866	0,00272427	0,27242749	
SPL23 1	0,067	0,005583333									
SPL23 2	0,067	0,005583333									
SPL23 3	0,068	0,005666667	0,00561111	4,81125E-05	0,00161111	0,00991453	0,527272727	47,4137931	0,00047009	0,04700855	
SPL24 1	0,054	0,0045									
SPL24 2	0,053	0,004416667									
SPL24 3	0,062	0,005166667	0,00469444	0,000411074	0,00069444	0,004273504	0,572727273	43,6507937	0,00018654	0,01865419	
SPL25 1	0,113	0,009416667									
SPL25 2	0,17	0,014166667									
SPL25 3	0,105	0,00875	0,01077778	0,002953733	0,00677778	0,041709402	0,581818182	42,96875	0,0017922	0,17922009	
SPL26 1	0,217	0,018083333									
SPL26 2	0,165	0,01375									
SPL26 3	0,138	0,0115	0,01444444	0,003346156	0,01044444	0,064273504	0,545454545	45,8333333	0,00294587	0,29458689	
SPL21 1	0,127	0,010583333									
SPL21 2	0,13	0,010833333									
SPL21 3	0,115	0,009583333	0,01033333	0,000661438	0,00633333	0,038974359	0,536363636	46,6101695	0,0018166	0,18166015	
SPL22 1	0,064	0,005333333									
SPL22 2	0,125	0,010416667									
SPL22 3	0,081	0,00675	0,0075	0,002623346	0,0035	0,021538462	0,531818182	47,008547	0,00101249	0,10124918	
SPL23 1	0,047	0,003916667									
SPL23 2	0,049	0,004083333									
SPL24 3	0,046	0,003833333	0,00394444	0,000127294	-5,5556E-05	-0,00034188	0,545454545	45,8333333	-1,567E-05	-0,00156695	
SPL24 1	0,073	0,006083333									
SPL24 2	0,075	0,00625									
SPL24 3	0,078	0,0065	0,00627778	0,000209718	0,00227778	0,014017094	0,554545455	45,0819672	0,00063192	0,06319182	

Lombriz N°17 a 22	INICIAL-FINAL	ABS*MIN					PROTEINAS mg/mL			UI/mg proteína
BLK 1	0,051	0,00425								
BLK 2	0,047	0,003916667								
BLK 3	0,604	0,050333333	0,0195	0,02670297						
SPL1 1	0,585	0,04875								
SPL1 2	0,243	0,02025								
SPL1 3	0,357	0,02975	0,03291667	0,01451149	0,01341667	0,0825641	0,516393443	48,4126984	0,00399715	0,3997151
SPL2 1	0,126	0,0105								
SPL2 2	0,149	0,012416667								
SPL2 3	0,483	0,04025	0,02105556	0,016650478	0,00155556	0,0095726	0,491803279	50,8333333	0,00048661	0,04866097
SPL3 1	0,17	0,014166667								
SPL3 2	0,578	0,048166667								
SPL3 3	0,122	0,010166667	0,02416667	0,020880613	0,00466667	0,0287179	0,491803279	50,8333333	0,00145983	0,14598291
SPL4 1	0,164	0,013666667								

SPL4 2	0,096	0,008									
SPL4 3	0,084	0,007	0,00955556	0,003595264	-0,00994444	-0,0611966	0,508196721	49,1935484	-0,00301048	-0,3010477	
SPL5 1	0,146	0,012166667									
SPL5 2	0,546	0,0455									
SPL5 3	0,241	0,020083333	0,02591667	0,01741547	0,00641667	0,0394872	0,5	50	0,00197436	0,1974359	
SPL6 1	0,204	0,017									
SPL6 2	0,303	0,02525									
SPL6 3	0,59	0,049166667	0,03047222	0,016707104	0,01097222	0,0675214	0,516393443	48,4126984	0,00326889	0,32688916	
SPL7 1	0,08	0,006666667									
SPL7 2	0,167	0,013916667									
SPL7 3	0,074	0,006166667	0,00891667	0,004337338	-0,01058333	-0,065128205	0,495901639	50,4132231	-0,00328332	-0,32833227	
SPL8 1	0,065	0,005416667									
SPL8 2	0,4	0,033333333									
SPL8 3	0,061	0,005083333	0,01461111	0,016214777	-0,00488889	-0,03008547	0,491803279	50,8333333	-0,00152934	-0,15293447	
SPL9 1	0,06	0,005									
SPL9 2	0,413	0,034416667									
SPL9 3	0,183	0,01525	0,01822222	0,014931867	-0,00127778	-0,007863248	0,491803279	50,8333333	-0,00039972	-0,03997151	
SPL10 1	0,156	0,013									
SPL10 2	0,065	0,005416667									
SPL10 3	0,619	0,051583333	0,023333333	0,024757294	0,00383333	0,023589744	0,512295082	48,8	0,00115118	0,11511795	
SPL11 1	0,33	0,0275									
SPL11 2	0,467	0,038916667									
SPL11 3	1,104	0,092	0,05280556	0,034420029	0,03330556	0,204957265	0,524590164	47,65625	0,00976749	0,97674947	
SPL12 1	0,182	0,015166667									
SPL12 2	0,204	0,017									
SPL12 3	0,187	0,015583333	0,01591667	0,000961047	-0,00358333	-0,022051282	0,504098361	49,5934959	-0,0010936	-0,10936002	
SPL13 1	0,259	0,021583333									
SPL13 2	0,108	0,009									
SPL13 3	0,135	0,01125	0,01394444	0,006710447	-0,00555556	-0,034188034	0,5	50	-0,0017094	-0,17094017	
SPL14 1	0,078	0,0065									
SPL14 2	0,209	0,017416667									
SPL14 3	0,164	0,013666667	0,01252778	0,005546729	-0,00697222	-0,042905983	0,508196721	49,1935484	-0,0021107	-0,21106975	
SPL15 1	0,167	0,013916667									
SPL15 2	0,088	0,007333333									
SPL15 3	0,536	0,044666667	0,02197222	0,019927705	0,00247222	0,015213675	0,504098361	49,5934959	0,0007545	0,07544993	
SPL16 1	0,887	0,073916667									
SPL16 2	0,184	0,015333333									
SPL16 3	0,594	0,0495	0,04625	0,02942658	0,02675	0,164615385	0,487704918	51,2605042	0,00843827	0,84382676	
SPL17 1	0,452	0,037666667									
SPL17 2	0,183	0,01525									
SPL17 3	0,511	0,042583333	0,03183333	0,014570471	0,01233333	0,075897436	0,495901639	50,4132231	0,00382623	0,38262344	
SPL18 1	0,108	0,009									
SPL18 2	0,629	0,052416667									
SPL18 3	0,378	0,0315	0,03097222	0,021713145	0,01147222	0,070598291	0,5	50	0,00352991	0,35299145	
SPL19 1	0,21	0,0175									
SPL19 2	0,093	0,00775									
SPL19 3	0,345	0,02875	0,018	0,010508925	-0,0015	-0,009230769	0,504098361	49,5934959	-0,00045779	-0,04577861	
SPL20 1	0,873	0,07275									
SPL20 2	0,695	0,057916667									
SPL20 3	0,57	0,0475	0,05938889	0,012689216	0,03988889	0,245470085	0,512295082	48,8	0,01197894	1,19789402	
SPL21 1	0,513	0,04275									
SPL21 2	0,255	0,02125									
SPL21 3	0,318	0,0265	0,03016667	0,011209185	0,01066667	0,065641026	0,520491803	48,0314961	0,00315284	0,31528367	
SPL22 1	0,341	0,028416667									
SPL22 2	0,269	0,022416667									
SPL22 3	0,697	0,058083333	0,03630556	0,019097217	0,01680556	0,103418803	0,5	50	0,00517094	0,51709402	
SPL23 1	0,99	0,0825									
SPL23 2	0,449	0,037416667									
SPL23 3	0,266	0,022166667	0,04736111	0,03137191	0,02786111	0,171452991	0,487704918	51,2605042	0,00878877	0,87887668	
SPL24 1	0,06	0,005									
SPL24 2	0,759	0,06325									
SPL24 3	0,084	0,007	0,02508333	0,033068427	0,00558333	0,034358974	0,524590164	47,65625	0,00163742	0,16374199	
SPL25 1	0,048	0,004									
SPL25 2	0,183	0,01525									
SPL25 3	0,517	0,043083333	0,02077778	0,020119493	0,00127778	0,007863248	0,467213115	53,5087719	0,00042075	0,04207527	
SPL26 1	0,141	0,01175									
SPL26 2	0,879	0,07325									
SPL26 3	0,121	0,010083333	0,03169444	0,035997814	0,01219444	0,075042735	0,512295082	48,8	0,00366209	0,36620855	
SPL27 1	0,135	0,01125									
SPL27 2	1,073	0,089416667									
SPL27 3	0,763	0,063583333	0,05475	0,039824964	0,03525	0,216923077	0,516393443	48,4126984	0,01050183	1,05018315	
SPL28 1	0,447	0,03725									
SPL28 2	0,245	0,020416667									
SPL28 3	0,811	0,067583333	0,04175	0,023903161	0,02225	0,136923077	0,516393443	48,4126984	0,00662882	0,66288156	
SPL29 1	0,06	0,005									
SPL29 2	0,072	0,006									
SPL29 3	0,106	0,008833333	0,00661111	0,001988392	-0,01288889	-0,079316239	0,5	50	-0,00396581	-0,3965812	
SPL230 1	0,073	0,006083333									
SPL 30 2	0,075	0,00625									
SPL 30 3	0,078	0,0065	0,00627778	0,000209718	-0,01322222	-0,081367521	0,5	50	-0,00406838	-0,40683761	

Lombriz N°23 a 28	INICIAL-FINAL	ABS*MIN				PROTEINAS mg/mL			UI/mg proteina
BLK 1	0,209	0,017416667							
BLK 2	0,046	0,003833333							

BLK 3	0,047	0,003916667	0,00838889	0,007818396							
SPL1 1	0,21	0,0175									
SPL1 2	0,221	0,018416667									
SPL1 3	0,201	0,01675	0,01755556	0,000834721	0,00916667	0,0564103	0,459016393	54,4642857	0,00307234	0,30723443	
SPL2 1	0,069	0,00575									
SPL2 2	0,074	0,006166667									
SPL2 3	0,332	0,027666667	0,01319444	0,012535043	0,00480556	0,0295726	0,545081967	45,8646617	0,00135634	0,13563396	
SPL3 1	0,081	0,00675									
SPL3 2	0,152	0,012666667									
SPL3 3	0,059	0,004916667	0,00811111	0,00405032	-0,00027778	-0,0017094	0,483606557	51,6949153	-8,8367E-05	-0,00883674	
SPL4 1	0,656	0,054666667									
SPL4 2	0,278	0,023166667									
SPL4 3	0,137	0,011416667	0,02975	0,02236394	0,02136111	0,1314530	0,471311475	53,0434783	0,00697272	0,69727239	
SPL5 1	0,571	0,047583333									
SPL5 2	0,114	0,0095									
SPL5 3	0,098	0,008166667	0,02175	0,022382254	0,01336111	0,0822222	0,487704918	51,2605042	0,00421475	0,42147526	
SPL6 1	0,237	0,01975									
SPL6 2	0,22	0,018333333									
SPL6 3	0,236	0,019666667	0,01925	0,000794949	0,01086111	0,0668376	0,491803279	50,8333333	0,00339758	0,33975783	
SPL7 1	0,148	0,012333333									
SPL7 2	0,564	0,047									
SPL7 3	0,145	0,012083333	0,02380556	0,020087367	0,01541667	0,094871795	0,483606557	51,6949153	0,00490439	0,49043894	
SPL8 1	0,066	0,00575									
SPL8 2	0,067	0,005583333									
SPL8 3	0,067	0,005583333	0,00555556	4,81125E-05	-0,00283333	-0,017435897	0,479508197	52,1367521	-0,00090905	-0,00909051	
SPL9 1	0,059	0,004916667									
SPL9 2	0,062	0,005166667									
SPL9 3	0,062	0,005166667	0,00508333	0,000144338	-0,00330556	-0,02034188	0,483606557	51,6949153	-0,00105157	-0,10515718	
SPL10 1	0,084	0,007									
SPL10 2	0,128	0,010666667									
SPL10 3	0,096	0,008	0,00855556	0,001895414	0,00016667	0,001025641	0,479508197	52,1367521	5,3474E-05	0,00534736	
SPL11 1	0,511	0,042583333									
SPL11 2	0,315	0,02625									
SPL11 3	0,169	0,014083333	0,02763889	0,014300673	0,01925	0,118461538	0,483606557	51,6949153	0,00612386	0,61238592	
SPL12 1	0,174	0,0145									
SPL12 2	0,629	0,052416667									
SPL12 3	0,559	0,046583333	0,03783333	0,020416667	0,02944444	0,181196581	0,487704918	51,2605042	0,00928823	0,92882281	
SPL13 1	0,408	0,034									
SPL13 2	0,107	0,008916667									
SPL13 3	0,327	0,02725	0,02338889	0,012979774	0,015	0,092307692	0,487704918	51,2605042	0,00473174	0,47317388	
SPL14 1	0,306	0,0255									
SPL14 2	0,051	0,00425									
SPL14 3	0,051	0,00425	0,01133333	0,012268693	0,00294444	0,018119658	0,475409836	52,5862069	0,00095284	0,09528441	
SPL15 1	0,941	0,078416667									
SPL15 2	0,117	0,00975									
SPL15 3	0,135	0,01125	0,03313889	0,039218878	0,02475	0,152307692	0,479508197	52,1367521	0,00794083	0,79408284	
SPL16 1	0,079	0,006583333									
SPL16 2	0,077	0,006416667									
SPL16 3	0,08	0,006666667	0,00655556	0,000127294	-0,00183333	-0,011282051	0,483606557	51,6949153	-0,00058322	-0,05832247	
SPL17 1	0,111	0,00925									
SPL17 2	0,107	0,008916667									
SPL17 3	0,511	0,042583333	0,02025	0,019341952	0,01186111	0,072991453	0,549180328	45,5223881	0,00332275	0,33227452	
SPL18 1	0,06	0,005									
SPL18 2	0,074	0,006166667									
SPL18 3	0,062	0,005166667	0,00544444	0,00063099	-0,00294444	-0,018119658	0,487704918	51,2605042	-0,00092882	-0,09288228	
SPL19 1	0,354	0,0295									
SPL19 2	0,051	0,00425									
SPL19 3	0,318	0,0265	0,02008333	0,013793869	0,01169444	0,071965812	0,540983607	46,2121212	0,00332569	0,33256928	
SPL20 1	0,092	0,007666667									
SPL20 2	0,115	0,009583333									
SPL20 3	0,104	0,008666667	0,00863889	0,000958635	0,00025	0,001538462	0,483606557	51,6949153	7,9531E-05	0,00795306	
SPL21 1	0,145	0,012083333									
SPL21 2	0,172	0,014333333									
SPL21 3	0,15	0,0125	0,01297222	0,001197026	0,00458333	0,028205128	0,508196721	49,1935484	0,00138751	0,13875103	
SPL22 1	0,212	0,017666667									
SPL22 2	0,089	0,007416667									
SPL22 3	0,09	0,0075	0,01086111	0,005893931	0,00247222	0,015213675	0,487704918	51,2605042	0,00077986	0,07798607	
SPL23 1	0,052	0,004333333									
SPL23 2	0,052	0,004333333									
SPL23 3	0,052	0,004333333	0,00433333	0	-0,00405556	0,024957265	0,491803279	50,8333333	-0,00126866	-0,1268661	
SPL24 1	0,059	0,004916667									
SPL24 2	0,068	0,005666667									
SPL24 3	0,06	0,005	0,00519444	0,000411074	-0,00319444	-0,01965812	0,479508197	52,1367521	-0,00102491	-0,10249105	
SPL25 1	0,145	0,012083333									
SPL25 2	0,121	0,010083333									
SPL25 3	0,097	0,008083333	0,01008333	0,002	0,00169444	0,01042735	0,520491803	48,0314961	0,00050084	0,05008412	
SPL26 1	0,326	0,027166667									
SPL26 2	0,229	0,019083333									
SPL26 3	0,224	0,018666667	0,02163889	0,004791727	0,01325	0,081538462	0,487704918	51,2605042	0,0041797	0,41797027	
SPL27 1	0,183	0,01525									
SPL27 2	0,146	0,012166667									
SPL27 3	0,185	0,015416667	0,01427778	0,001830174	0,00588889	0,036239316	0,487704918	51,2605042	0,00185765	0,18576456	
SPL28 1	0,123	0,01025									
SPL28 2	0,545	0,045416667									
SPL28 3	0,062	0,005166667	0,02027778	0,021918779	0,01188889	0,073162393	0,479508197	52,1367521	0,00381445	0,38144496	
SPL29 1	0,05	0,004166667									
SPL29 2	0,059	0,004916667									
SPL29 3	0,048	0,004	0,00436111	0,000488289	-0,00402778	-0,024786325	0,483606557	51,6949153	-0,00128133	-0,1281327	
SPL230 1	0,371	0,030916667									
SPL 30 2	0,098	0,008166667									

SPL 30 3	0,094	0,007833333	0,01563889	0,013231993	0,00725	0,044615385	0,483606557	51,6949153	0,00230639	0,23063885
-----------------	-------	-------------	------------	-------------	---------	-------------	-------------	------------	------------	------------

Lombriz N°29 a 32	INICIAL- FINAL	ABS*MIN					PROTEINAS mg/mL			UI/mg proteína
BLK 1	0,047	0,003916667								
BLK 2	0,053	0,004416667								
BLK 3	0,053	0,004416667	0,00425	0,000288675						
SPL1 1	0,167	0,013916667								
SPL1 2	0,401	0,033416667								
SPL1 3	0,235	0,019583333	0,02230556	0,010030971	0,01805556	0,11111111	0,5	50	0,00555556	0,55555556
SPL2 1	0,457	0,038083333								
SPL2 2	0,525	0,04375								
SPL2 3	0,486	0,0405	0,04077778	0,002843527	0,03652778	0,2247863	0,472222222	52,9411765	0,01190045	1,19004525
SPL3 1	0,14	0,011666667								
SPL3 2	0,163	0,013583333								
SPL3 3	0,148	0,012333333	0,01252778	0,000973016	0,00827778	0,0509402	0,464285714	53,8461538	0,00274293	0,27429323
SPL4 1	0,089	0,007416667								
SPL4 2	0,099	0,00825								
SPL4 3	0,242	0,020166667	0,01194444	0,007132834	0,00769444	0,0473504	0,444444444	56,25	0,00266346	0,26634615
SPL5 1	0,686	0,057166667								
SPL5 2	0,171	0,01425								
SPL5 3	0,459	0,03825	0,03655556	0,02150845	0,03230556	0,1988034	0,472222222	52,9411765	0,01052489	1,05248869
SPL6 1	0,171	0,01425								
SPL6 2	0,173	0,014416667								
SPL6 3	0,152	0,012666667	0,01377778	0,000965852	0,00952778	0,0586325	0,503968254	49,6062992	0,00290854	0,29085403
SPL7 1	0,568	0,047333333								
SPL7 2	0,19	0,015833333								
SPL7 3	0,148	0,012333333	0,02516667	0,019276497	0,02091667	0,128717949	0,476190476	52,5	0,00675769	0,67576923
SPL8 1	0,204	0,017								
SPL8 2	0,086	0,007166667								
SPL8 3	0,276	0,023	0,01572222	0,007993632	0,01147222	0,070598291	0,476190476	52,5	0,00370641	0,37064103
SPL9 1	0,175	0,014583333								
SPL9 2	0,082	0,006833333								
SPL9 3	0,119	0,009916667	0,01044444	0,003901863	0,00619444	0,038119658	0,492063492	50,8064516	0,00193672	0,19367246
SPL10 1	0,175	0,014583333								
SPL10 2	0,198	0,0165								
SPL10 3	0,197	0,016416667	0,01583333	0,001083333	0,01158333	0,071282051	0,496031746	50,4	0,00359262	0,35926154
SPL11 1	0,225	0,01875								
SPL11 2	0,192	0,016								
SPL11 3	0,144	0,012	0,01558333	0,003394235	0,01133333	0,06974359	0,496031746	50,4	0,00351508	0,35150769
SPL12 1	0,187	0,015583333								
SPL12 2	0,212	0,017666667								
SPL12 3	0,126	0,0105	0,01458333	0,003686499	0,01033333	0,063589744	0,448412698	55,7522124	0,00354527	0,35452689
SPL13 1	0,054	0,0045								
SPL13 2	0,343	0,028583333								
SPL13 3	0,056	0,004666667	0,01258333	0,013856657	0,00833333	0,051282051	0,503968254	49,6062992	0,00254391	0,25439128
SPL14 1	0,092	0,007666667								
SPL14 2	0,054	0,0045								
SPL14 3	0,057	0,00475	0,00563889	0,00176055	0,00138889	0,008547009	0,476190476	52,5	0,00044872	0,04487179
SPL15 1	0,083	0,006916667								
SPL15 2	0,078	0,0065								
SPL15 3	0,101	0,008416667	0,00727778	0,001008069	0,00302778	0,018632479	0,484126984	51,6393443	0,00096217	0,0962169
SPL16 1	0,121	0,010083333								
SPL16 2	0,072	0,006								
SPL16 3	0,23	0,019166667	0,01175	0,006739704	0,0075	0,046153846	0,51984127	48,0916031	0,00221961	0,22196124
SPL17 1	0,298	0,024833333								
SPL17 2	0,14	0,011666667								
SPL17 3	0,162	0,0135	0,01666667	0,007131698	0,01241667	0,076410256	0,48015873	52,0661157	0,00397839	0,39783853
SPL18 1	0,1	0,008333333								
SPL18 2	0,075	0,00625								
SPL18 3	0,107	0,008916667	0,00783333	0,001401884	0,00358333	0,022051282	0,5	50	0,00110256	0,11025641
SPL19 1	0,353	0,029416667								
SPL19 2	0,182	0,015166667								
SPL19 3	0,071	0,005916667	0,01683333	0,011838321	0,01258333	0,077435897	0,484126984	51,6393443	0,00399874	0,3998739
SPL20 1	0,157	0,013083333								
SPL20 2	0,219	0,01825								
SPL20 3	0,157	0,013083333	0,01480556	0,002982976	0,01055556	0,064957265	0,468253968	53,3898305	0,00346806	0,34680574

Lombrices N°33 a 36	INICIAL- FINAL	ABS*MIN					PROTEINAS mg/mL			UI/mg proteína
BLK 1	0,049	0,004083333								
BLK 2	0,051	0,00425								
BLK 3	0,048	0,004	0,00411111	0,000127294						
SPL1 1	0,195	0,01625								
SPL1 2	0,188	0,015666667								
SPL1 3	0,125	0,010416667	0,01411111	0,003212749	0,01	0,0615385	0,458955224	54,4715447	0,0033521	0,33520951
SPL2 1	0,152	0,012666667								
SPL2 2	0,204	0,017								
SPL2 3	0,14	0,011666667	0,01377778	0,002834967	0,00966667	0,0594872	0,447761194	55,8333333	0,00332137	0,33213675
SPL3 1	0,276	0,023								
SPL3 2	0,086	0,007166667								
SPL3 3	0,088	0,007333333	0,0125	0,009093649	0,00838889	0,0516239	0,436567164	57,2649573	0,00295624	0,29562422
SPL4 1	0,137	0,011416667								
SPL4 2	0,101	0,008416667								
SPL4 3	0,093	0,00775	0,00919444	0,001953155	0,00508333	0,0312821	0,440298507	56,779661	0,00177618	0,17761843
SPL5 1	0,131	0,010916667								
SPL5 2	0,197	0,016416667								
SPL5 3	0,104	0,008666667	0,012	0,003986958	0,00788889	0,0485470	0,440298507	56,779661	0,00275648	0,27564827
SPL6 1	0,315	0,02625								
SPL6 2	0,251	0,020916667								
SPL6 3	0,16	0,013333333	0,02016667	0,006490912	0,01605556	0,0988034	0,440298507	56,779661	0,00561002	0,56100246
SPL7 1	0,38	0,031666667								
SPL7 2	0,432	0,036								

SPL7 3	0,424	0,035333333	0,03433333	0,002333333	0,03022222	0,185982906	0,444029851	56,302521	0,01047131	1,04713065
SPL8 1	0,085	0,007083333								
SPL8 2	0,083	0,006916667								
SPL8 3	0,1	0,008333333	0,00744444	0,000774298	0,003333333	0,020512821	0,447761194	55,8333333	0,0011453	0,11452991
SPL9 1	0,07	0,005833333								
SPL9 2	0,067	0,005583333								
SPL9 3	0,068	0,005666667	0,00569444	0,000127294	0,00158333	0,00974359	0,451492537	55,3719008	0,00053952	0,05395211
SPL10 1	0,428	0,035666667								
SPL10 2	0,212	0,017666667								
SPL10 3	0,273	0,02275	0,02536111	0,009279732	0,02125	0,130769231	0,440298507	56,779661	0,00742503	0,74250326
SPL11 1	0,11	0,009166667								
SPL11 2	0,404	0,033666667								
SPL11 3	0,115	0,009583333	0,01747222	0,014026348	0,01336111	0,082222222	0,440298507	56,779661	0,00466855	0,46685499
SPL12 1	0,237	0,01975								
SPL12 2	0,258	0,0215								
SPL12 3	0,567	0,04725	0,0295	0,015396834	0,02538889	0,156239316	0,440298507	56,779661	0,00887122	0,88712154
SPL13 1	0,493	0,041083333								
SPL13 2	0,296	0,024666667								
SPL13 3	0,169	0,014083333	0,02661111	0,013604619	0,0225	0,138461538	0,436567164	57,2649573	0,00792899	0,79289941
SPL14 1	0,133	0,011083333								
SPL14 2	0,071	0,005916667								
SPL14 3	0,879	0,07325	0,03008333	0,037472583	0,02597222	0,15982906	0,440298507	56,779661	0,00907504	0,90750398
SPL15 1	0,129	0,01075								
SPL15 2	0,131	0,010916667								
SPL15 3	0,29	0,024166667	0,01527778	0,007698455	0,01116667	0,068717949	0,447761194	55,8333333	0,00383675	0,38367521
SPL16 1	0,415	0,034583333								
SPL16 2	0,366	0,0305								
SPL16 3	0,16	0,013333333	0,02613889	0,011276307	0,02202778	0,135555556	0,492537313	50,7575758	0,00688047	0,68804714
SPL17 1	0,629	0,052416667								
SPL17 2	0,56	0,046666667								
SPL17 3	0,694	0,057833333	0,05230556	0,005584162	0,04819444	0,296581197	0,470149254	53,1746032	0,01577059	1,57705874
SPL18 1	0,323	0,026916667								
SPL18 2	0,077	0,006416667								
SPL18 3	0,081	0,00675	0,01336111	0,011740639	0,00925	0,056923077	0,444029851	56,302521	0,00320491	0,32049127
SPL19 1	0,157	0,013083333								
SPL19 2	0,64	0,053333333								
SPL19 3	0,067	0,005583333	0,024	0,025678704	0,01988889	0,122393162	0,440298507	56,779661	0,00694944	0,69494423
SPL20 1	0,114	0,0095								
SPL20 2	0,09	0,0075								
SPL20 3	0,096	0,008	0,00833333	0,001040833	0,00422222	0,025982906	0,440298507	56,779661	0,0014753	0,14753006