



ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Efectos de la inoculación con microorganismos descomponedores de polímeros en el proceso de vermicompostaje con plásticos (LDPE, LLPE, PET y PS) mediante la lombriz *Eisenia fetida*.



MARIO TORIBIO BRAVO

2022



ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Curso 2021 / 2022

**Efectos de la inoculación con microorganismos  
descomponedores de polímeros en el proceso de  
vermicompostaje con plásticos (LDPE, LLPE, PET y  
PS) mediante la lombriz *Eisenia fetida*.**

Vº Bº DIRECTOR

JOSE  
ANTONIO|  
SAEZ|TOVAR  
Firmado digitalmente por  
JOSE ANTONIO|  
SAEZ|TOVAR  
Fecha: 2022.09.12  
10:08:14 +02'00'

José Antonio Sáez Tovar

Vº Bº CODIRECTOR

ENCARNACIO  
N|MARTINEZ|  
SABATER  
Firmado digitalmente por  
ENCARNACION|MARTINEZ|SABATER  
Fecha: 2022.09.12 10:38:53 +02'00'

Encarnación Martínez Sabater

ALUMNO

Firmado por Mario  
Toribio Bravo



## UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza al alumno **D. Mario Toribio Bravo**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Efectos de la inoculación con microorganismos descomponedores de polímeros en el proceso de vermicompostaje con plásticos (LDPE, LLPE, PET y PS) mediante la lombriz Eisenia fetida”, bajo la dirección de D. Jose Antonio Sáez Tovar y D<sup>a</sup>. Encarnación Martínez Sabater, debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 13 de septiembre de 2022

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos

CONCEPCION  
|PAREDES|GIL  
Firmado digitalmente por  
CONCEPCION|PAREDES|GIL  
Fecha: 2022.09.13 10:35:41  
+0200

Fdo.: Concepción Paredes Gil

TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:

## REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

### IDENTIFICACIONES

**Autor:** Mario Toribio Bravo

**Título:** Efectos de la inoculación con microorganismos descomponedores de polímeros en el proceso de vermicompostaje con plásticos (LDPE, LLPE, PET y PS) mediante la lombriz *Eisenia fetida*.

**Title:** Effects of inoculation with polymer decomposing microorganisms in the vermicomposting process with plastics (LDPE, LLPE, PET and PS) by means of the earthworm *Eisenia fetida*.

**Director/es del TFM:** José Antonio Sáez Tovar y Encarnación Martínez Sabater

**Año:** 2022

**Titulación:** Máster en Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos

**Tipo de proyecto:** Trabajo Experimental

**Palabras claves:** Lombrices, vermicompostaje, residuos plásticos agrícolas, *Eisenia fetida*, microorganismos, enzimas, biomarcadores.

**Keywords:** Earthworms, vermicomposting, agricultural plastic waste (AWP), *Eisenia fetida*, microorganisms, enzymes, biomarkers.

**Nº citas bibliográficas:** 118

**Nº de planos:**

**Nº de tablas:** 21

**Nº de figuras:** 30

**Nº de anexos:**

### RESUMEN

Los procesos industriales, agrícolas y ganaderos generan una gran cantidad de residuos plásticos que sufren el riesgo de degradarse por diversos factores y llegar al suelo como material particulado, en forma de micro o nano plástico, mezclándose y contaminando la fracción organomineral del suelo. Este proceso puede ocasionar alteraciones en las reacciones que ocurren en el suelo, al igual que los plásticos, que sufren alteraciones debido a la actividad biológica. En este trabajo se estudia la posibilidad de degradar material particulado de plásticos (LDPE, LLPE, PET y PS) mezclado con el vermicompost en presencia de lombrices *Eisenia fetida* e inoculado con un consorcio de microorganismos descomponedores de polímeros plásticos. Para ello se lleva a cabo el experimento mediante la exposición en mesocosmos de *Eisenia fetida* (EF) a diferentes tipos de plástico (NoAWP, LDPE, MIXb) y con diferentes tipos de consorcios microbianos (NoPMC, ENDO, EXO, MIXc) durante 360 horas. Para determinar el estrés oxidativo

y el daño en los tejidos que pueden sufrir las lombrices, se miden diferentes actividades enzimáticas (biomarcadores). Se realiza un seguimiento de la evolución del peso fresco y la supervivencia de la lombriz EF en los distintos tratamientos. Para evaluar las variaciones fisicoquímicas del vermicompost tras añadir el material plástico particulado se miden los parámetros fisicoquímicos y la presencia de metales pesados en el vermicompost entre otras características. Para determinar la actividad biológica se miden diferentes actividades enzimáticas del vermicompost. *Eisenia fetida* tuvo mayores tasas de supervivencia y aumento de peso por individuo en los composts inoculados con un mix de residuos plásticos procedentes de la agricultura (AWP) e inoculados con un consorcio microbiano mixto obtenido del interior del tracto digestivo de la lombriz *E. fetida* (ENDO) y de ambientes contaminados con plásticos (EXO). La actividad de las lombrices en sinergia con el consorcio microbiano mixto produjo un aumento de las actividades enzimáticas que indican una mayor tasa de actividad microbiana y con capacidad para actuar como barrera fisiológica de radicales libres. Todos los vermicompost empleados en los diferentes tratamientos mantuvieron su clasificación de clase A para el contenido en metales a lo largo del experimento.

#### ABSTRACT

Industrial, agricultural and livestock processes generate a large amount of plastic waste that is at risk of degrading due to various factors and reaching the soil as particulate material, in the form of micro or nano plastic, mixing and contaminating the organomineral fraction of the soil. This process can cause alterations in the reactions that occur in the soil, just like plastics, which suffer alterations due to biological activity. In this work, the possibility of degrading plastic particulate material (LDPE, LLPE, PET and PS) mixed with vermicompost in the presence of *Eisenia fetida* earthworms and inoculated with a consortium of plastic polymer decomposing microorganisms is studied. For this, the experiment is carried out by exposing *Eisenia fetida* (EF) mesocosms to different types of plastic (NoAWP, LDPE, MIXb) and with different types of microbial consortia (NoPMC, ENDO, EXO, MIXc) for 360 hours. To determine the oxidative stress and tissue damage that earthworms can suffer, different enzymatic activities (biomarkers) are measured. A follow-up of the evolution of the fresh weight and the survival of the EF earthworm in the different treatments is carried out. To evaluate the physicochemical variations of the vermicompost after adding the particulate plastic material, the physicochemical parameters and the presence of heavy metals in the vermicompost, among other characteristics, are measured. To determine the biological activity are measured different enzymatic activities of the vermicompost. *Eisenia fetida* had higher survival rates and weight gain per individual in composts inoculated with mix of agricultural plastic waste (AWP) and inoculated with a mixed microbial consortium obtained from inside the digestive tract of the earthworm *E. fetida* (ENDO) and from environments contaminated with plastics (EXO). The activity of the worms in synergy with the mixed microbial consortium produced an increase in enzymatic activities that indicate a higher rate of microbial activity and the ability to act as a physiological barrier against free radicals. All the vermicompost used in the different treatments of the experiment maintained their class A classification according with heavy metals content.



**INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)**

Elche, a 20 de mayo del 2022

Nombre del tutor/a	Jose Antonio Saéz Tovar
Nombre del alumno/a	Mario Toribio Bravo
Tipo de actividad	4. Trabajo técnico* de carácter intelectual (no se requiere el uso de laboratorios y/o talleres)
Título del 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)	Efectos de la inoculación de microorganismos descomponedores de polímeros en el proceso de vermicompostaje mediante la lombriz Eisenia fetida con plásticos LDPE, <del>LLPE</del> , PET y PS.
Código/s GIS estancias	
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	220513112505
Código de Investigación Responsable	TFM.MGT.JAST.MTB.220513
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Efectos de la inoculación de microorganismos descomponedores de polímeros en el proceso de vermicompostaje mediante la lombriz Eisenia fetida con plásticos LDPE, ~~LLPE~~, PET y PS.** ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", **habiéndose determinado** que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, se autoriza la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos  
Secretario del CEII  
Vicerrectorado de Investigación

Información adicional:

Domingo L. Orozco Beltrán  
Presidente del CEII  
Vicerrectorado de Investigación

## Índice del TFM

1. Introducción .....	7
1.1 Generalidades de los plásticos LDPE, LLDPE, PET, PS. Producción, recogida, gestión posconsumo y degradación .....	7
1.2 Vermicompostaje, aspectos generales y específicos.....	18
1.3 Residuos domésticos, agrícolas y agroindustriales aptos para vermicompostaje .....	20
1.4 Las lombrices: Aspectos generales y específicos de la lombriz <i>Eisenia fetida</i> .....	21
1.5 La lombriz como bioindicador ambiental.....	23
1.6 Las lombrices como servicio ecosistémico de apoyo y regulación.....	24
1.7 Microorganismos descomponedores de polímeros plásticos.....	25
2. Objetivos.....	28
3. Materiales y métodos .....	29
3.1 Diseño experimental .....	29
3.2 Preparación de los materiales utilizados en el ensayo.....	31
3.3 Parámetros analizados y métodos analíticos.....	33
3.3.1 Parámetros fisicoquímicos.....	33
3.3.2 Determinación de la actividad enzimática del vermicompost .....	36
3.3.3 Biomarcadores del tejido de la lombriz .....	37
3.4 Aislamiento e identificación de las cepas de PMC .....	39
3.5 Métodos Estadísticos .....	40
4. Resultados .....	41
4.1 Características de los consorcios microbianos PMC.....	41
4.2 Supervivencia de <i>Eisenia fetida</i> y efectos morfológicos .....	42
4.3 Daños en los tejidos de <i>Eisenia fetida</i> .....	47
4.4 Estrés oxidativo en <i>Eisenia fetida</i> .....	50
4.5 Actividades enzimáticas en el vermicompost .....	53
4.6 Principales parámetros fisicoquímicos en el vermicompost .....	56
5. Conclusiones.....	59
6. Bibliografía.....	60

## 1. Introducción

### 1.1 Generalidades de los plásticos LDPE, LLDPE, PET, PS. Producción, recogida, gestión posconsumo y degradación.

El término plástico procede del griego *plastikos* (maleable o moldeable). El plástico representa uno de los materiales más esenciales y ampliamente utilizados en el mundo (bolsas, botellas, frascos, tubos, cajas, films, etc.), debido a las propiedades deseadas (ligero peso, bajos mantenimiento, resistencia a la intemperie, baja toxicidad, transparencia y económico), lo que facilitan las aplicaciones plásticas en diversas actividades industriales, comerciales y agrícolas (*Jenkins et al.*). Los plásticos o polímeros sintéticos, generalmente se derivan de productos petroquímicos y requieren energía (a menudo basada en combustibles fósiles) para su producción. Aproximadamente el 4% de la producción mundial de petróleo y gas se convierte en plásticos y el proceso de producción de plásticos consume la energía equivalente a un 3-4% adicional. La producción mundial de plástico ha alcanzado un aumento de 1,3 millones de toneladas en 1950 a 300 millones de toneladas de plástico en 2014.

En su esencia, el plástico contiene una macromolécula orgánica llamada polímero. Los polímeros plásticos se pueden clasificar según el monómero en:

- **Naturales:** Elaborados con productos naturales como la celulosa, la caseína y el caucho.
- **Sintéticos:** Tienen su origen en productos elaborados a partir de combustibles fósiles.

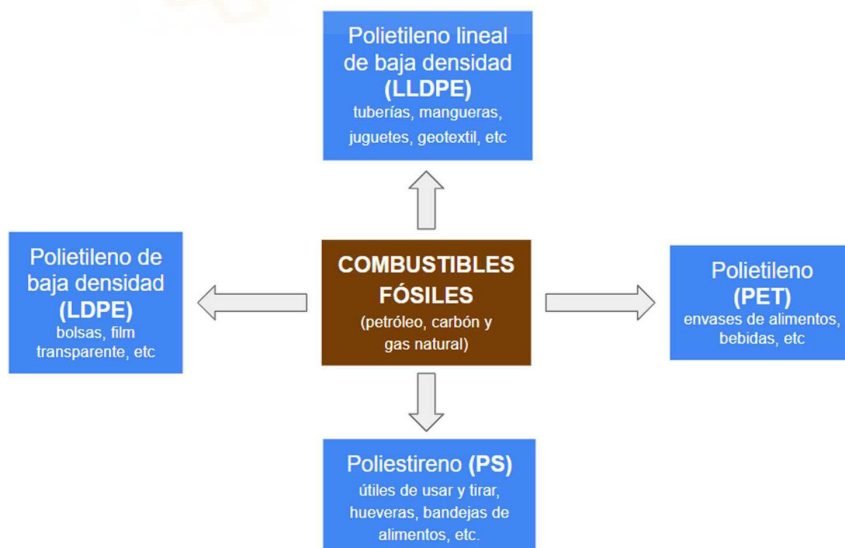


Figura 1. Los tipos de polímeros sintéticos utilizados en el estudio.  
Fuente: Elaboración propia a partir de *Al Shalem et al., 2009*.



### Plásticos agrícolas

Los plásticos agrícolas son una categoría de residuos plásticos posconsumo de bajo valor, que en muchas jurisdicciones han sido ignorados en gran medida por los recicladores. Las estimaciones de los plásticos agrícolas utilizados y los residuos plásticos agrícolas generados varían ampliamente; 2 - 6,5 millones de toneladas de residuos plásticos agrícolas generadas mundialmente/año.

El polietileno de baja densidad (LDPE) es el plástico predominante que se usa en las granjas como: película de ensilaje y envoltura de pacas (representan alrededor del 80 %), seguido de cubiertas para hileras y mantillo de plástico (con un 8%) (*CleanFARMS, 2012*). CleanFARMS informó que la mayoría de los desechos plásticos agrícolas se tiran, queman o se envían al vertedero.

Los agricultores, en general, han expresado cuán irremplazables se han vuelto los plásticos en sus operaciones diarias; por lo tanto, dichos materiales continuarán usándose y eliminándose de manera insostenible si no se dispone de soluciones fáciles de implementar. Hasta 900 Tn de desechos plásticos se generan anualmente en las granjas de Nueva Escocia (Canadá) y la mayoría no se recicla.

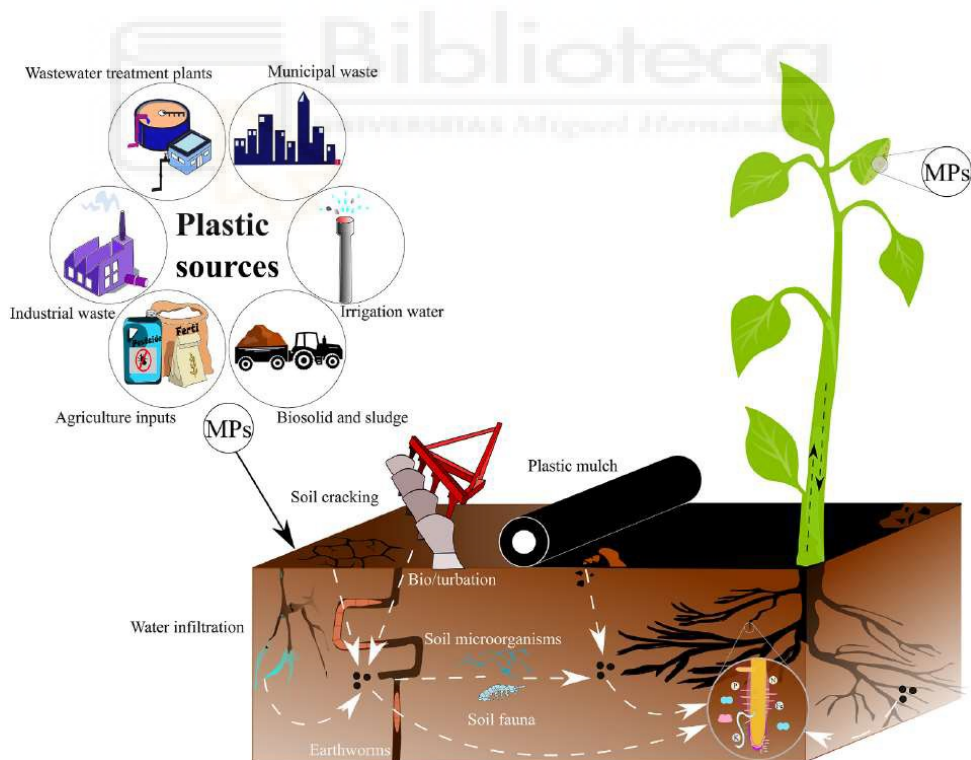


Figura 2. Potenciales fuentes del plástico y los canales de entrada en la rizosfera.

Fuente: Oussama Bouaicha et al., 2022

### Plásticos de envases comerciales

El uso de plásticos para envases representa más del 40 % de la demanda de plásticos, en gran parte para envases de un solo uso (*Jenkins et al.,*). Los envases de plástico que se consumen en todo el mundo representan el 35 % (*Al-Salem et al., 2009*). Alrededor del 60 % de todos los envases de plástico se utilizan para alimentos y bebidas, mientras que el 40% restante se destina para aplicaciones no alimentarias (salud, cosméticos, bienes de consumo, enseres del hogar, indumentaria y embalajes). La mayor parte de todos los plásticos posconsumo en los residuos sólidos urbanos (RSU) son los residuos de envases. (*Plastics Europe, 2020*). Se estima que aproximadamente el 40 % de los productos de plástico tienen una vida útil de menos de un mes (*Achillas et al., 2007*). Actualmente, los plásticos más utilizados son el polietileno (PE), el polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), polietileno tereftalato (PET) y poliuretano (PU), ver figura 3. (*Gewert et al., 2015*).

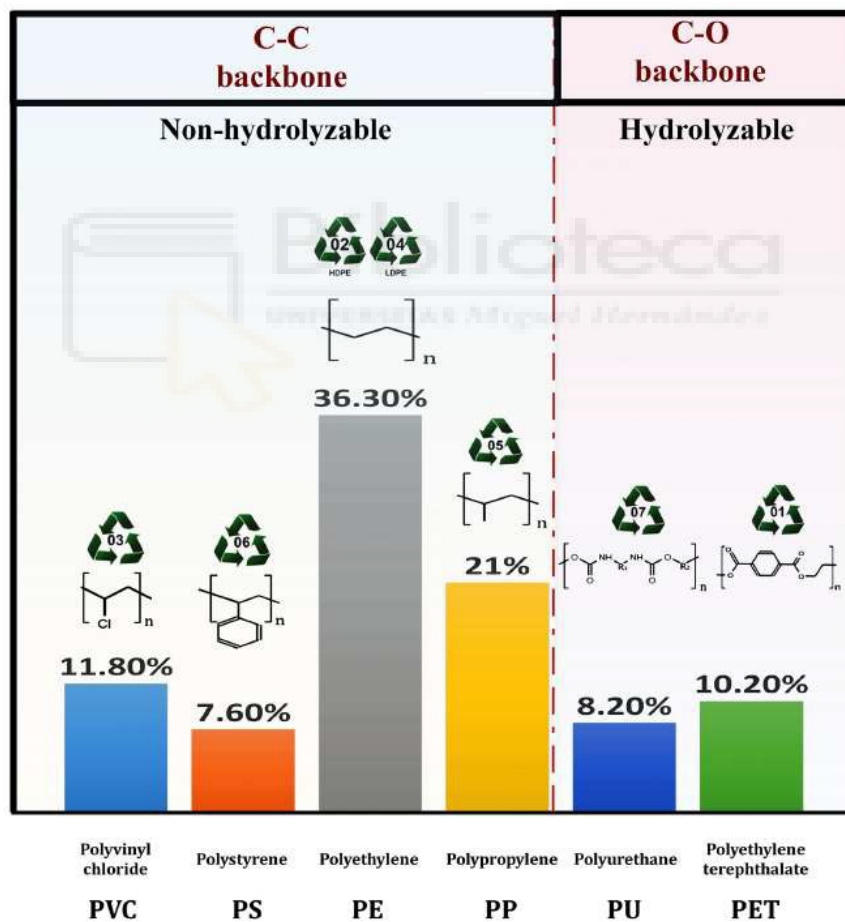


Figura 3. Los tipos de plástico más utilizados clasificados por su estructura química.  
Fuente: *Sameh Samir et al., 2021*

La mayoría de los tipos de plástico no son degradables y lleva siglos para una degradación completa. Como resultado, los plásticos tienden a acumularse en vertederos o en el entorno natural (*Barnes et al., 2009; Matjašič et al., 2021*). Los monómeros comunes utilizados para la síntesis de polímeros plásticos comúnmente derivan de hidrocarburos fósiles. Además, la estructura polimérica los hace resistentes a la degradación microbiana, mientras que su relativamente breve presencia en la naturaleza dificulta la aparición de nuevas enzimas que podría degradar los polímeros convencionales (*Mueller, 2006*).

De media en la UE, se producen 31 kg de residuos de envases de plástico/persona/año. Los residuos sólidos urbanos (RSU) contienen una mezcla de diferentes tipos de plástico, combinados con residuos orgánicos y otros residuos domésticos de distinta naturaleza. (*Eurostat, 2018*)

Los envases de plástico son diversos y están hechos de múltiples polímeros y numerosos aditivos (*MIT, 2018*). Esta diversidad complica el proceso de reciclaje, aumenta el coste y disminuye la calidad del plástico reciclado (*Comisión Europea, 2018*). Las tasas de reciclaje de residuos de envases de plástico en Europa oscilan entre el 26 % y el 52%. Este amplio rango puede explicarse por las diferencias en los planes de recogida selectiva según el territorio. En promedio, la tasa de reciclaje del 40 % de los envases de plástico representa un aumento en comparación con 2016, gracias a la mejora en la recolección selectiva de residuos (*Groh et al., 2019*).

En Europa, el vertido y la incineración son los enfoques dominantes para gestionar los residuos plásticos, con un 31 % y un 39 %, respectivamente (*Plastics Europe, 2020*). Menos del 30 % de los residuos plásticos posconsumo se recogen para su reciclaje, la mayoría de los cuales se exportan fuera de Europa o se destinan a aplicaciones de bajo valor. Los residuos plásticos exportados (3,05 millones de toneladas en 2015) se transportan principalmente a países asiáticos (*Velis, 2014; MIT, 2018*). Sin embargo, con la prohibición de China de todas las importaciones de residuos plásticos a partir de 2018, Europa deberá gestionar mejor sus plásticos a nivel local, así como cambiar las formas en que producimos y consumimos plásticos en todos los sectores de la economía (*Schweitzer et al., 2018*).

#### **Producción, distribución y gestión de los polímeros plásticos**

En 2019, la producción de plástico llegó a 368 millones de toneladas (Tn) (*Plastics Europe, 2020*), con Asia representando el 51% de esta producción y siendo China el país con mayor porcentaje de la producción de plástico (31%). Entre 1950 y 2015, la producción de plástico se estimó en 8300 Tn, con una cantidad de residuos plásticos (residuos plásticos primarios y reciclados) de 6300 Tn; El 78% se depositaba en vertederos o se libera al medio ambiente (*Geyer et al., 2017*). Además, las estrategias actuales para la gestión de residuos plásticos, como la incineración (incluida la pirólisis para la recuperación de energía) y el reciclaje, no han sido suficientes para paliar los altos y continuos problemas de los plásticos en el medio ambiente (*Dilkes-Hoffman et al., 2019*), particularmente en países en vías de desarrollo (*Browning et al., 2021*).

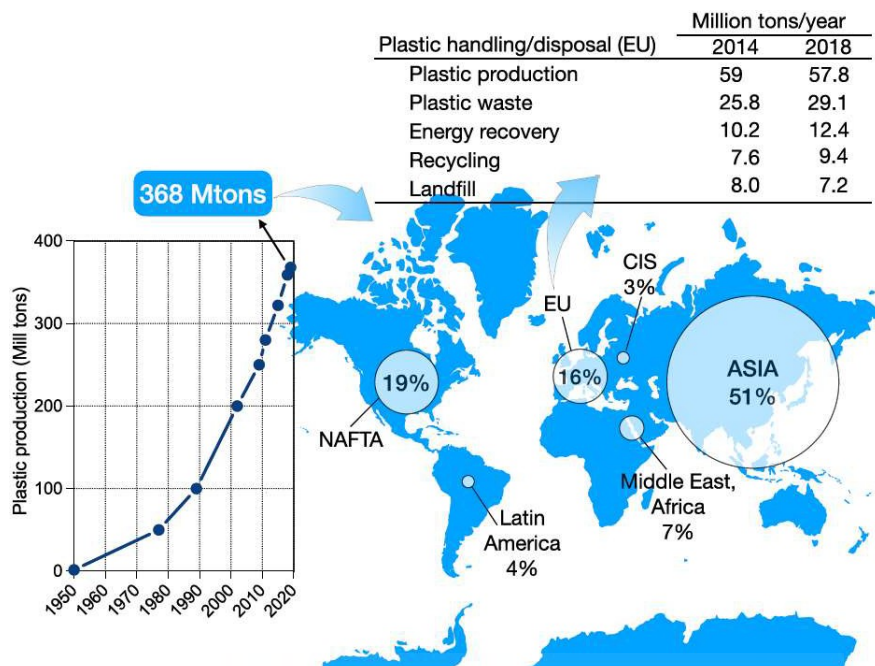


Figura 4. Tendencia anual y distribución geográfica de la producción y la gestión de los residuos plásticos. Expresado en millones de toneladas por año Fuente: Juan C. Sanchez-Hernandez, 2021.

El mismo estudio predice que la cantidad total de residuos plásticos depositados en vertederos y que llegan al medio ambiente para finales de 2050 será de 12.000 Tn si los esfuerzos para reducir los desechos plásticos no aumentan. De hecho, la producción de residuos plásticos en la Unión Europea no ha disminuido significativamente desde 2014 (59 Tn de producción de plástico y 25,8 Tn de residuos plásticos) a 2018 (57,8 Tn y 29,1 Tn de residuos plásticos) producción y residuos) (ver figura 4). Ante este escenario, es necesario adoptar e incrementar las medidas para la gestión de los residuos plásticos, como el uso de polímeros plásticos biodegradables (Lambert y Wagner, 2017) y promover regulaciones en el uso de productos plásticos.

Algunos ejemplos de esta última medida son la prohibición de utilizar algunos productos de un solo uso productos de plástico por la Comisión Europea (Directiva 2019/904 de del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de junio de 2019) o la prohibición de fabricar cosméticos que contienen microesferas de plástico en UU. (114<sup>th</sup> Congress Public Law 114, 28 de diciembre de 2015). Sin embargo, la eliminación de residuos plásticos en vertederos y el medio ambiente sigue siendo la principal opción para la gestión de residuos plásticos.

Además, los desechos plásticos que terminan en vertederos o se liberan en el medio ambiente, afectan negativamente al contenido microbiano del suelo. Los vertederos resultan generan infertilidad del suelo, ya que son necesarios más de 500 años para la descomposición completa (Chamas et al., 2020), mientras que la degradación del plástico también libera toxinas (Webb et al., 2013).

Los plásticos pueden degradarse física y químicamente, así como biodegradarse en ambientes naturales. La radiación UV es el factor dominante en la degradación física y química (Andrady, 2011), y el rendimiento de la degradación se ve afectado por la temperatura, el agua, el contenido de oxígeno y el pH (Chen et al., 2020; Pham et al., 2020; Yuan et al., 2020). En el proceso de degradación por radiación UV, los enlaces C-H se rompen para producir radicales libres, que reaccionan con el oxígeno para formar grupos insaturados como los alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas (Mao et al., 2020). La radiación UV puede hacer que los plásticos sean frágiles y reduce significativamente su peso, además, agregar un fotocatalizador puede mejorar significativamente degradación plástica (Kamalian et al., 2020). Sin embargo, el método de esta degradación no es completo y, a menudo, solo degrada los plásticos en moléculas poliméricas de menor peso molecular. No existe evidencia de que los polímeros plásticos se degradan completamente a través de este enfoque.

La biodegradación de plásticos es un método prometedor, los microorganismos juegan un papel principal en el proceso de biodegradación (Auta et al., 2018). También se le atribuye la capacidad de algunos insectos para digerir plásticos a través de los microorganismos intestinales (Yang et al., 2015b; Yang et al., 2014). Además, las enzimas secretadas por algunos microorganismos también son clave para la degradación de los polímeros. En el proceso de biodegradación, los microbios son responsables de descomponer los polímeros plásticos en metano, dióxido de carbono y agua (Shah et al., 2008). La biodegradación también se ve afectada por factores ambientales como la temperatura, humedad y luz, ya que los microorganismos requieren condiciones óptimas para llevar a cabo sus procesos metabólicos (Sharma et al., 2020). La degradación microbiana puede reducir el peso molecular de los polímeros después de la erosión de la superficie. Después, el polímero puede descomponerse completamente y convertirse en una fuente de carbono utilizable para promover el crecimiento bacteriano y la reproducción (Gajendiran et al., 2016). Sin embargo, muy pocos microorganismos son capaces de degradar los polímeros plásticos. Además, la degradación de los plásticos puede llevar bastante tiempo y el efecto no es ideal. Por lo tanto, la investigación aún se encuentra en una etapa experimental y los métodos actuales no han sido optimizados para eliminar el plástico de manera eficiente.

- (1) Los efectos de los factores físicos como la trituración mecánica, temperatura, pH y radiación UV en la degradación del plástico. Entre ellos, la radiación UV juega un papel importante en la degradación del plástico, ya que separa los enlaces químicos en polímeros.
- (2) La degradación microbiana de los plásticos se desencadena por la secreción de enzimas, y enzimas intracelulares y extracelulares que juegan un papel importante en el estudio del mecanismo de biodegradación de plástico.

Tabla 1. Métodos de degradación de los polímeros plásticos, sus ventajas y desventajas.  
Fuente: Elaboración propia a partir de *Costanza Scopetani et al., 2022*.

Método	Ventaja	Desventaja
Degradación fisicoquímica	Puede hacer descomponerse al plástico y romperse	Degradación incompleta
Degradación microbiana	Puede degradar polímeros por completo en H <sub>2</sub> O y CO <sub>2</sub>	La tasa de degradación es lenta y son pocos los microorganismos que puede degradar polímeros
Degradación enzimática	Rotura, oxidación e hidrólisis de polímeros	La secreción de enzimas es escasa y el campo de acción es limitado

#### Degradación natural y envejecimiento.

La degradación de los plásticos comprende cualquier cambio de las propiedades físicas o químicas. Puede ocurrir debido a procesos biológicos, químicos o fisicoquímicos. La hidrólisis y la oxidación son los principales mecanismos de degradación provocados por causas biológicas y químicas, mientras que la fotodegradación, la degradación térmica y la mecánica se encuentran entre las causas fisicoquímicas. (*Markovičová et al., 2018*).

Tabla 2. Causas del envejecimiento de los polímeros. Fuente: Elaboración propia a partir de *Costanza Scopetani et al., 2022*.

ENVEJECIMIENTO DE LOS POLIMEROS	
TIPO	CAUSA
Natural	Entorno natural del polímero
Artificial	Entorno artificial del polímero
Climático	Condiciones climáticas
Por Ozono	Por acción del ozono
Biológico	Organismos vivos
Químico	Sustancias químicas agresivas
Mecánico	Cargas estáticas o dinámicas
Térmico	Acción del calor
Por luz	Luz visible y/o UV
Oxidativo	Acción del oxígeno
Foto oxidativo	Luz + Oxígeno
Termo oxidativo	Calor + Oxígeno

El proceso de degradación del plástico está determinado tanto por factores ambientales condiciones y propiedades fisicoquímicas de las sustancias poliméricas, como se muestra en la tabla 2. (Markovičová *et al.*, 2018).

Las propiedades fisicoquímicas del plástico juegan un papel importante en el proceso de degradación. La susceptibilidad plástica a la degradación abiótica y biótica depende de la composición de la y longitud de la cadena polimérica. Con cadena de carbono larga como el PP, hace que los polímeros sean resistentes a la degradación.

Los mecanismos de degradación abiótica de los plásticos se pueden clasificar como:

- **Físicos:** Cambios en la estructura general (agrietamiento, fragilización y descamación).
- **Químicos:** Cambios a nivel molecular (ruptura de enlaces y la oxidación de cadenas largas de polímeros para crear nuevas moléculas, generalmente con longitudes de cadena significativamente más cortas) (Chamas *et al.*, 2020).



Figura 5. Propiedades fisicoquímicas y factores ambientales que afectan en la degradación biótica de polímeros plásticos. Fuente: Sameh Samir *et al.*, 2021.

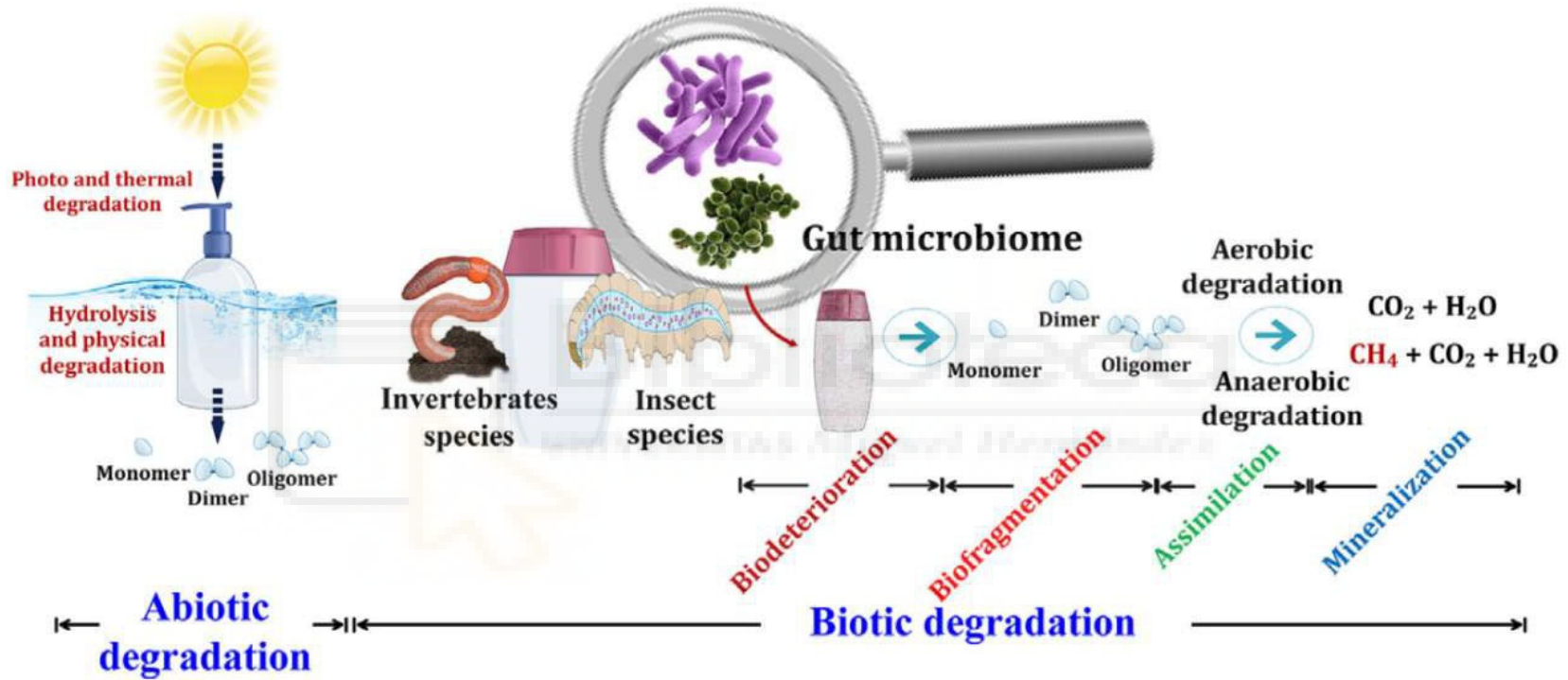


Figura 6. Esquema de la degradación de los plásticos a través de factores abióticos y bióticos.

Fuente: Sameh Samir et al., 2021



### Degradación y adaptación del entorno a polímeros plásticos

A medida que los humanos, la fauna terrestre y marina están expuestos e ingieren restos de plástico bioacumulados y resuspendidos, su fisiología puede verse afectada y tener consecuencias crónicas o letales. (Rist *et al.*, 2016; Guzzetti *et al.*, 2018). Los científicos han demostrado que el vertido de toneladas de microplásticos se acumulan en la superficie del océano cada año, y estos se degradan en nanoplásticos a medida que se hunden en los sedimentos de las profundidades marinas (Lebreton *et al.*, 2019).

Los microplásticos experimentan interacciones dinámicas en los entornos costeros y, por lo tanto, se depositan en la tierra como parte de un mecanismo de circuito de retroalimentación positiva que lleva décadas (Lebreton *et al.*, 2019). La contaminación plástica se percibe cada vez más como una amenaza emergente para los entornos terrestres, pero la dimensión espacial y temporal de la exposición plástica en los suelos es poco conocida. La bioturbación desplaza los microplásticos (>1  $\mu\text{m}$ ) en los suelos y probablemente también los nanoplásticos (<1  $\mu\text{m}$ ).

Heinze *et al.* (2021) estudiaron la distribución de los micro y nanoplásticos en los suelos y concluyeron que las madrigueras de lombrices de tierra y la drilosfera asociada pueden convertirse en puntos críticos de contaminación por nanoplásticos.

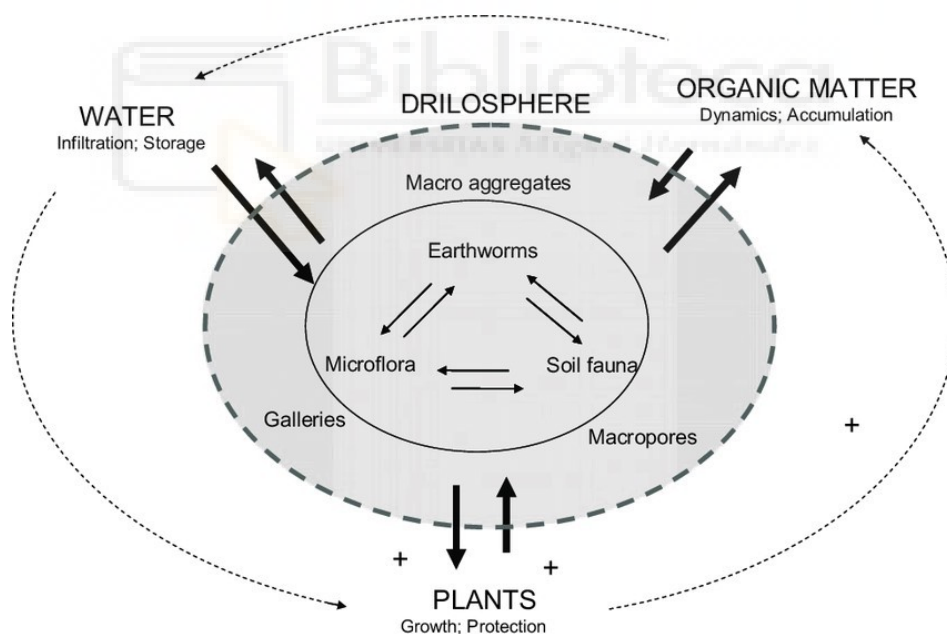


Figura 7. Modelo general del sistema de la drilosfera. El símbolo + significa retroalimentación positiva.

Fuente: Patrick Lavelle *et al.*, 2007

Las especies de lombrices de tierra, como *Lumbricus terrestris*, que se mueven repetidamente a través de las mismas madrigueras y vuelven a ingerir el material de las madrigueras y otros organismos que usan las madrigueras de las lombrices y la drilosfera como hábitat, pueden estar más expuestas incluso si las concentraciones promedio dentro de la matriz del suelo son comparativamente más bajas.

No existen estudios de investigación sobre los efectos de la exposición a corto plazo bajo la influencia de material plástico en lombrices epigeas durante el proceso de vermicompostaje. Por lo tanto, aún se requiere aclarar los posibles efectos adversos sobre la calidad del sustrato y sobre el estrés oxidativo y la neurotoxicidad de las lombrices. Además, el envejecimiento ambiental del material plástico causado por procesos biológicos, químicos, físicos o mecánicos, las propiedades físicas y químicas del plástico virgen que se usa comúnmente en las pruebas de toxicidad pueden ser diferentes de las del plástico ambiental, por lo que presentan una toxicidad diferente, por esta razón existe la necesidad de centrarse en la toxicidad de los subproductos plásticos agrícolas derivados de productos plásticos en el entorno real. (Fendall y Sewell, 2009; Browne et al., 2011; McCormick et al., 2014; Wang et al., 2016).

### **Adaptación a entornos de microplásticos**

La distribución de los microplásticos se ve afectada según sus fuentes, que se definen como:

- **Fuentes primarias:** Limpiadores exfoliantes, jabones, pastas de dientes, cosméticos, etc.
- **Fuentes secundarias:** Como resultado del deterioro químico y biológico del medio ambiente.

Existen estudios que han informado que los microplásticos están presentes en los ambientes del suelo (Scheurer y Bigalke, 2018) (Zhang y Liu, 2018). Los suelos pueden representar una gran reserva de microplásticos (Hurley y Nizzetto, 2018) (Bläsing y Amelung, 2018), procedentes de lodos de depuradora aplicados como fertilizante (Corradini et al., 2019). Por tanto, los microplásticos pueden representar una amenaza para la biodiversidad del suelo y el funcionamiento de los ecosistemas (He et al., 2018), pero aún falta información (De Souza Machado et al., 2018). Las propiedades fisicoquímicas de los microplásticos (tamaño, forma, densidad, color y composición química) afectan en gran medida su transporte en el medio ambiente y su biodisponibilidad (Wright et al., 2013).

La exposición a los microplásticos provoca una amplia gama de alteraciones fisiológicas, principalmente en los sistemas digestivo e inmunológico (Sharifinia et al., 2020; Trestrail et al., 2020). La ingestión de fragmentos de plástico puede causar efectos adversos directos como obstrucción del tubo digestivo, abrasión y destrucción del epitelio y lisis celular. Los efectos adversos dependerán del tipo, tamaño y forma de los fragmentos. También puede generar efectos indirectos, como inflamación, estrés oxidativo y alteraciones metabólicas.

Además, en organismos terrestres y marinos, la ingestión de microplásticos y sustancias tóxicas asociadas provoca una disminución en los niveles de hormonas esteroides, retrasa la ovulación y conduce también a fallas reproductivas (Azzarello y Van Vleet, 1987).

### **Adaptación a entornos nanoplásticos**

Los nanoplásticos son un contaminante emergente preocupante que está estrechamente relacionado con los microplásticos. La mayor fuente de microplásticos se origina a partir de objetos macrolásticos que se liberan en el medio ambiente y se descomponen en microplásticos secundarios (Andrady, 2017; Qi et al., 2020), con un desgaste continuo que finalmente genera nanoplásticos (Gigault et al., 2018). La mayor parte de la investigación hasta la fecha se ha centrado

en el microplástico con partículas de tamaño  $>10 \mu\text{m}$ , en gran parte debido a los límites de resolución del equipo analítico que se utiliza para identificar y cuantificar estos materiales (*Shim et al., 2017*).

Como tal, hay un número limitado de artículos que investigan nanoplásticos y especies de lombrices de tierra; en particular, el uso de materiales rastreables, como perlas de poliestireno (PS) marcadas con fluorescencia, permite la detección con una resolución especial más alta mediante el uso de microscopía de fluorescencia.

La fracción organomineral bajo la influencia de los nanoplásticos hace que sea un evento impredecible. Los estudios ecotoxicológicos sobre las lombrices de tierra son particularmente necesarios porque estas especies son organismos indicadores relevantes con respecto a la producción de alimentos y los servicios ambientales. Jiang et al. investigaron la exposición de *Eisenia fetida* a partículas de poliestireno micro (diámetro 1300 nm) y nanoplásticas (diámetro 100 nm) a  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Jiang et al., 2020). En general, los resultados muestran que la toxicidad de los micro y nanoplásticos en *E. fetida* fue bastante baja. Sin embargo, se observó una acumulación de partículas, que fue cuatro veces mayor para las micropartículas que para las nanopartículas. Además, los autores utilizaron un conjunto integral de criterios de valoración fisiológicos y bioquímicos y concluyeron que los microplásticos eran más tóxicos que los nanoplásticos. (*McCauley y Bjorndal, 1999; Wright et al., 2013b*).

En general, la literatura disponible sobre los efectos peligrosos de los nanoplásticos en las lombrices de tierra es limitada e indica que los peligros se deben principalmente al daño mecánico en el intestino. Es importante destacar que las partículas más grandes a microescala parecen ser más peligrosas que los plásticos a nanoescala según lo determinado por este criterio de valoración. Sin embargo, existe una gama de otros posibles mecanismos de toxicidad para los nanoplásticos en especies de lombrices de tierra, incluida la toxicidad causada por la lixiviación de aditivos plásticos que podrían ejercer impactos negativos adicionales después de la exposición.

En resumen, los mecanismos y efectos tóxicos potenciales de los microplásticos y nanoplásticos reportados para las lombrices de tierra producen los siguientes efectos en cinco niveles diferentes:

1. Nivel del organismo: La exposición puede provocar cambios (distribución en el medio, tasa de crecimiento, supervivencia y locomoción).
2. Órganos: Se han reportado anomalías en la barrera dérmica e intestinal.
3. Celular: Alteración celular.
4. Bioquímico: Produce estrés general y estrés oxidativo.
5. Genético: Podrían activar cascadas de señalización que modulan marcadores genéticos.

## 1.2 Vermicompostaje, aspectos generales y específicos.

El vermicompostaje es un proceso mediante el cual los desechos biodegradables (como los desechos de la cocina, los biorresiduos de las industrias basadas en la agricultura, los desechos agrícolas, los desechos del mercado y los desechos ganaderos) pasan por el intestino de las lombrices y se transforman en vermicompost rico en nutrientes. Las lombrices son agentes biológicos capaces de

consumir desechos y depositar excretas en este proceso (Adhikary, 2012). Este proceso implica una interacción simbiótica entre algunas lombrices y microorganismos (Lim et al., 2012).

Dado que la materia orgánica actúa como sustrato y alimento en el vermicompostaje, y el suelo mineral no está involucrado, solo se pueden usar lombrices epígeas en el proceso. En la tabla 4 se pueden observar las diferentes especies y características de las lombrices empleadas en vermicompostaje y lombricultura.

Tabla 3. Principales lombrices empleadas en vermicompostaje. Fuente: Bhat et al., 2017.

Nombre	<i>Eisenia foetida</i>	<i>Eisenia andrei</i>	<i>Dendrodrilus rubidus</i>	<i>Dendrobaena veneta</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>	<i>Drawida nepalensis</i>	<i>Eudrilus eugeniae</i>	<i>Perionyx excavatus</i>	<i>Lampito mauritii</i>
Clasificación ecológica	Epigea	Epigea	Epigea	Epigea	Epigea	Epigea	Epigea	Epigea	Anécica
Coloración	Marrón y bandas amarillas	Roja	Púrpura rojizo	Púrpura rojizo con bandas	Marrón rojizo	Roja	Marrón rojizo	Marrón rojizo	Ligeramente pigmentada
Tamaño adulto (mm)	4 - 8 x 50 - 100	4 - 8 x 50 - 100	3 - 4 x 35 - 60	5 - 7 x 50 - 80	4 x 70 - 150	-	5 - 7 x 80 - 190	4 - 5 x 45 - 70	5 - 6 x 14 - 160
Peso adulto (gr)	0,55	0,55	0,25	0,92	0,8	0,8	2,7 - 3,5	0,55	-
Tiempo de desarrollo	28 - 30 días	21 - 28 días	54 días	65 días	74 - 91 días	34 - 42 días	40 - 49 días	28 - 42 días	51 - 76 días
Cocones/día	0,35 - 0,5	0,35 - 0,5	0,2	0,28	0,07 - 0,25	0,15	0,42 - 0,51	1,1 - 1,4	0,05
Viabilidad eclosión	73 - 80 %	72%	85%	20%	65%	82%	80%	90%	80%
Crías/cocón	2 - 4	2 - 4	1,67	1,1	1	1,93	02-mar	1,1	1,3
Ciclo de vida (días)	45 - 51	45 - 51	75	100 - 150	120 - 170	100 - 120	50 - 70	40 - 50	89
Rango temperatura (°C)	0 - 35	0 - 35	-	15 - 25	-	-	16 - 30	25 - 37	30
Rango humedad (%)	70 - 90	70 - 90	-	65 - 85	-	-	70 - 85	-	60

El vermicompost es un material similar a la fina turba, producido a partir de desechos orgánicos en un proceso biooxidativo mesófilo en el que los microorganismos y las lombrices cooperan en un rol funcional. Este material es un excelente fertilizante que mejora la calidad del suelo y el crecimiento de las plantas, debido a características tales como: baja relación C:N, alto contenido de sustancias húmicas, alta retención de humedad capacidad y alta porosidad (Bhat et al., 2017).

El vermicompost está representado por excrementos de lombrices de tierra, que pueden mejorar los nutrientes y el estado de salud del suelo. Se considera un biotratamiento rentable para convertir residuos orgánicos en productos húmicos estabilizados (Macci et al., 2009, Tortosa et al., 2012, Sáez et al 2021). El vermicompost mejora la fertilidad del suelo:

- Biológicamente: Aumenta la diversidad de microorganismos presentes en el suelo.
- Físicamente: Tiene mejor densidad aparente, aireación, porosidad y retención de agua.
- Químicamente: Se mejora la conductividad eléctrica, el pH y el contenido de materia orgánica, lo que conduce a un mejor rendimiento de los cultivos (Lim et al., 2015).

De hecho, el abuso de fertilizantes inorgánicos sin suplementos orgánicos deteriora las propiedades químicas y físicas de la tierra y contamina el ambiente circundante (Manivannan et al., 2009).

Se observó que la adición de vermicompost (20 Tn/Ha) al suelo agrícola, durante dos años consecutivos, mejoró significativamente la estabilidad de los agregados y la porosidad del suelo (*Bouajila y Sanaa, 2011*), mejorando la disponibilidad de aire, el agua y favoreciendo el crecimiento de raíces (*Gopinath et al., 2008*). La lombriz epígea *Eisenia fetida* ha sido ampliamente utilizada debido a su gran capacidad para descomponer la materia orgánica. Además de su uso generalizado en vermicompostaje en todo el mundo, *Eisenia fetida* también se ha utilizado como modelo ecotoxicológico del suelo, (bioindicador aceptado por la comunidad científica) debido a su fácil reproducibilidad y mantenimiento en condiciones de cautividad.

La lombriz roja californiana es una lombriz de tierra perteneciente al género *Eisenia sp.*, de la familia Lumbricidae, del orden de los haplotaxidos, perteneciente a su vez a la subclase de los oligoquetos. Viven en la franja superior del suelo (en los primeros 30 cm). Pueden llegar a tener casi 160 anillos y tiene una pigmentación púrpura rojiza ubicada a nivel subepidérmico. Es hermafrodita incompleta (tiene ambos sexos, pero para reproducirse debe aparearse).

La adición de vermicompost a suelos contaminados por contaminantes orgánicos puede considerarse de valor potencial para la biorremediación, mediante bioestimulación (la adición de materia orgánica y nutrientes que estimulan los degradadores microbianos nativos potenciales) y bioaumentación (la inoculación de microorganismos en suelos contaminados con la capacidad potencial de descomponer contaminantes) (Megharaj et al., 2011; Morillo y Villaverde, 2017). Algunos estudios han demostrado que el vermicompost acelera la biodegradación de contaminantes ambientales (*Bouajila y Sanaa, 2011*).

### 1.3 Residuos domésticos, agrícolas y agroindustriales aptos para vermicompostaje

Los residuos orgánicos son aquellos restos de origen animal o vegetal que pueden degradarse biológicamente. Los residuos orgánicos se producen en multitud de actividades humanas, desde actividades de poda, ganaderas o trabajos agrícolas hasta actividades humanas relacionadas con la alimentación, servicios de limpieza u otros procesos relacionados con la vida humana, pero se clasifican en orígenes agrícola, ganadero, agroindustrial y urbano (Universitas Miguel Hernández 2019).

- **Los biorresiduos** son los residuos orgánicos biodegradables de origen vegetal y/o animal, susceptibles de degradarse biológicamente generados en el ámbito domiciliario y comercial. Los biorresiduos según el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) se dividen en según su naturaleza:
  - **Fracción Orgánica (FO):** Cuando se recoge de forma separada se utiliza el término FORS (*fracción orgánica de recogida separada*). Está constituida por restos de la preparación de la comida y elaboración de los productos alimentarios, restos sobrantes de comida, alimentos en mal estado y excedentes alimentarios que no se han comercializado o consumido (separados de su envase o embalaje).
  - **Fracción Vegetal (FV):** En forma de restos vegetales de pequeño tamaño y de tipo no leñoso procedentes de jardinería y poda (ramos de flores mustias, malas hierbas, césped, pequeñas

ramas de poda, hojarasca, etc.). Esta fracción vegetal, considerada como similar a la FORS, puede gestionarse también “in situ” o de forma independiente a los restos de comida, según la configuración de los servicios de recogida y los niveles de generación.

- **Poda:** Constituida por la Fracción Vegetal en forma de restos vegetales de jardinería y poda de mayor tamaño y de tipo leñoso. Por sus características requiere una gestión específica por cuestiones relacionadas con logística de recogida, el tratamiento y la temporalidad de generación (frecuencia y periodo).
- **Agroalimentario:** provienen de actividades agrícolas, así como de actividades industriales de producción, tratamiento y envasado de alimentos de origen vegetal o animal.
- **Ganadero:** aquellos que proceden de actividades ganaderas tales como crianza, engorde y limpieza de camas entre otros.
- **Urbano:** proceden de los desechos de jardines, parques, actividades comerciales urbanas pequeñas y viviendas. Dentro de ellos se encuentran los biorresiduos.

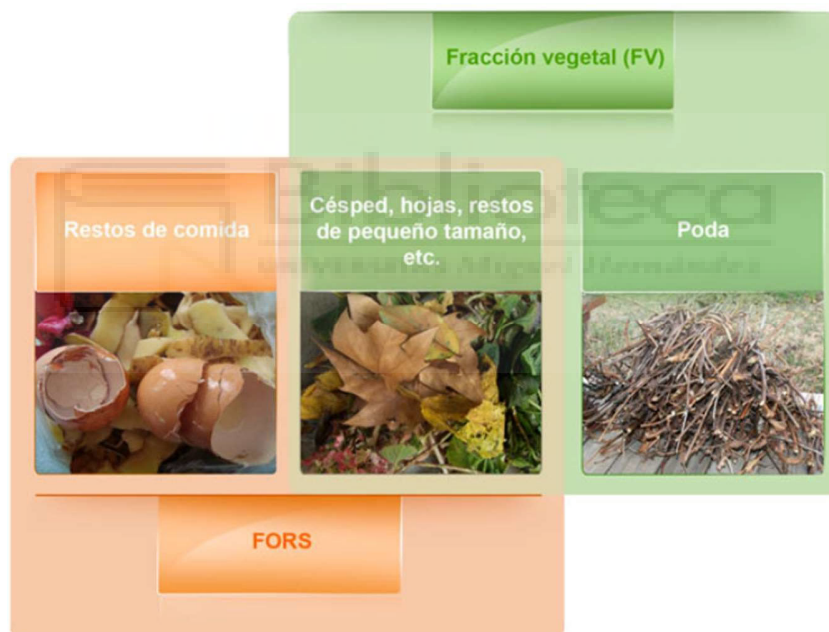


Figura 8. Clasificación de los biorresiduos domésticos. Fuente: MITECO, 2022.

#### 1.4 Las lombrices: Aspectos generales y específicos de la lombriz *Eisenia fetida*

Las lombrices de tierra pertenecen al filo Annelida y familia Lumbricidae (Edwards y Lofty, 1977). Tienen un papel clave en la estructura del suelo, la descomposición, la mezcla e incorporación de la materia orgánica al suelo mineral. Las lombrices han sido clasificadas por Bruckman et al. (2016) como:

1. **Epígeas:** Viven en la superficie del suelo (en los primeros 30 cm) y bajo depósitos de materia orgánica acumulada, consumiéndola y produciendo humus que es depositado en la superficie formando macroporos. Estas lombrices se utilizan a menudo para la descomposición de desechos orgánicos en vermicompostaje. Por ejemplo y en nuestro caso, *Eisenia fetida*.
2. **Endógeas:** Viven en horizontes orgánicos e ingieren materia organomineral a través de galerías horizontales, por ejemplo, *Aporrectodea caliginosa*.
3. **Anécicas:** Se alimentan de los desechos superficiales, pero habita en los horizontes del suelo mineral, lo que representa una profunda aireación del suelo, infiltración de agua e incorporación profunda de la materia orgánica superficial a través de la actividad vertical de las galerías, por ejemplo, *Lumbricus terrestris*.

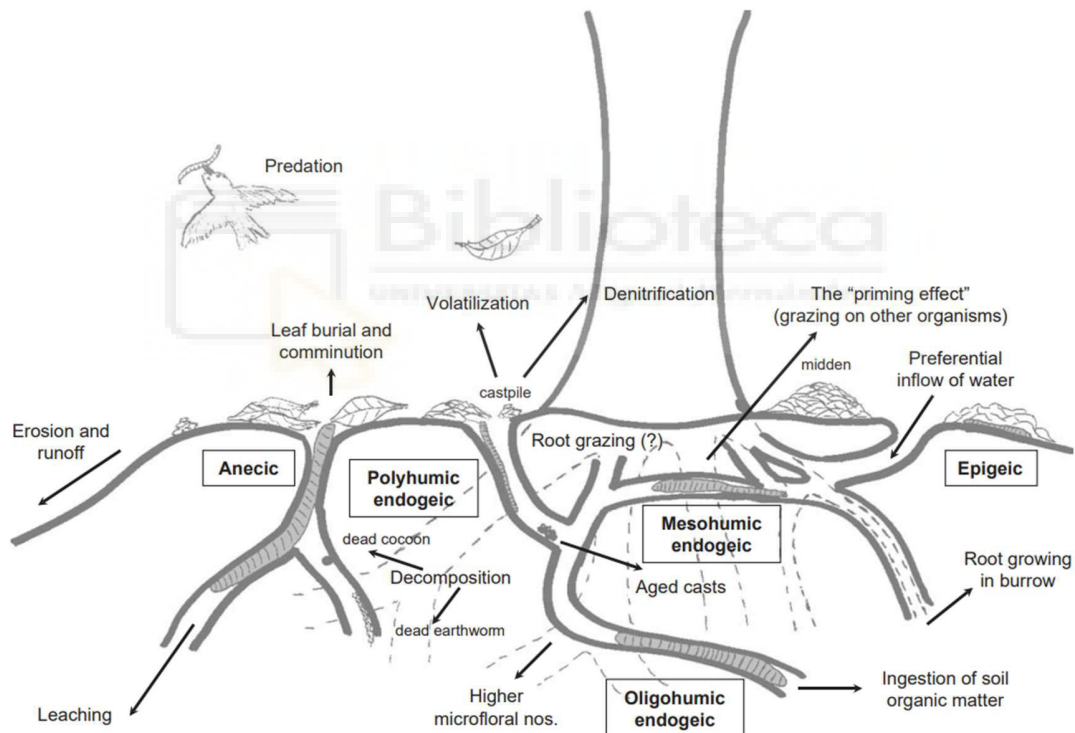


Figura 9. Relaciones funcionales entre las lombrices y el ambiente. Fuente: G.C. Brown et al. 2004.

Las estrategias según Ladygina et al., (2013) para aumentar la palatabilidad e ingestión del residuo:

- Mezclar con desechos de origen animal y vegetal: carne, pescado, fruta o podas.
- Mezclar con efluentes de ganado: estiércol, orina y purines.
- Mezclar con efluentes urbanos: aguas residuales y fango deshidratado.
- Producir pellets de polímeros recubiertos con materia orgánica.
- Inocular cepas microbianas o fúngicas sobre el polímero.

### 1.5 La lombriz como bioindicador ambiental

Las lombrices de tierra transforman las propiedades físico, químico y biológicas del suelo (Jones et al., 1994). La continua excavación y alimentación estimula la actividad y proliferación microbiana (Lipiec et al., 2016) lo que desencadena en cambios de las comunidades de microorganismos del suelo que actúan en la descomposición de la materia orgánica y los ciclos de los nutrientes, tales como el nitrógeno y el carbono (Hoang et al., 2016; Brown et al., 2004). En consecuencia, se produce un aumento de la actividad enzimática del suelo bajo la influencia de las lombrices de tierra (Razavi et al., 2016). Sin embargo, la producción y persistencia de las enzimas extracelulares podrían estar cambiando bajo un escenario de calentamiento global, donde los cambios de temperatura y la textura del suelo podrían afectar a los procesos microbianos y también incluso a los productores de enzimas extracelulares como las lombrices (Steinweg et al., 2013). Las lombrices dan información sobre la calidad del suelo y son utilizadas como bioindicadores del suelo en ecotoxicología. Las lombrices juegan un papel importante en la estructura y fertilidad de los suelos aumentando la disponibilidad, liberando carbono, nitrógeno y estimulando la mineralización microbiana de la materia orgánica. La lombriz terrestre emite NO<sub>2</sub> durante su ciclo biológico, como consecuencia de la desnitrificación del nitrato y nitrito que ocurre en su intestino, siendo responsable de más de la mitad de las emisiones de NO<sub>2</sub> procedentes del suelo (Augustenborg, et al., 2012).

Tabla 4. Clasificación y características de las lombrices. Fuente: Bhat et al., 2017.

Características	Clasificación		
	Epigeas	Endógeas	Anécicas
<b>Hábitat</b>	3 - 10 cm superficiales	10 - 30 cm superficiales	30 - 90 cm en profundas galerías
<b>Tamaño</b>	Pequeño	Mediano	Largo
<b>Color</b>	Pigmentación notoria y uniforme	Ligera pigmentación	Pigmentación anterior y posterior
<b>Ciclo vital</b>	Corto	Medio	Largo
<b>Temperatura</b>	Amplio rango de tolerancia	Poca tolerancia	Poca tolerancia
<b>Actividad</b>	En depósitos de M.O. superficial	Bajo la superficie	Capas profundas del suelo
<b>Reproducción</b>	Alta tasa de reproducción	Baja tasa de reproducción	Baja tasa de reproducción
<b>Alimentación</b>	M.O. en descomposición	Materia organomineral	M.O. en descomposición
<b>Rol ecológico</b>	Eficiente descomponedor de la M.O.	Aireación y mezcla del suelo	Descomposición y distribución de la M.O.
<b>Vermicompostaje</b>	Alto rendimiento	Bajo rendimiento	Bajo rendimiento
<b>Especies comunes</b>	<i>Eisenia fetida</i> , <i>E. andrei</i> , <i>Eudrilus eugenie</i> , <i>Lumbricus rubellus</i> , <i>L. festivus</i> , <i>L. castaneus</i> , <i>Bimastus eiseni</i> , <i>B. minusculus</i> , <i>Drawida modesta</i> , <i>Dendrodrilus rubidus</i> , <i>Dendrobaena veneta</i> y <i>Perionyx excavatu</i>	<i>Octochaetona thurstoni</i> , <i>Aporrectodea caliginosa</i> , <i>Allolobophora rosea</i> , <i>A. caliginosa</i> , <i>Metaphire posthuma</i> , <i>Pontoscolex corethrurus</i> , <i>Drawida barwelli</i> y <i>Amyntas sp.</i>	<i>Lumbricus terrestris</i> , <i>L. polyphemus</i> , <i>Lampito mauritii</i> , <i>Aporrectodea trapezoides</i> y <i>A. longac</i>



Las lombrices representan la biomasa animal más abundante en los suelos. Se les llama ingenieros de los ecosistemas terrestres porque son grandes transformadores de la estructura del suelo. También muestran un excelente potencial en la gestión de los servicios ecosistémicos (*Blouin et al., 2013*) (*Lee, 1985*) (*Bouche, 1977*). Son invertebrados clave en la descomposición de la materia orgánica en materia inorgánica disponible para las plantas.

La drilosfera es la zona del suelo influenciada por la acción de las lombrices y comprende los túneles realizados por las lombrices en el suelo y la porción de suelo en los dos milímetros circundantes a los mismos. Las lombrices acumulan macro agregados, construyen galerías y constituyen el hábitat de comunidades específicas de microorganismos e invertebrados en la drilosfera. Para visualizar la importancia de la influencia de las lombrices en el suelo y, por tanto, la importancia de la drilosfera puede ponerse en evidencia algunos datos (*Lavelle, P., Rouland et al., 2005*), partiendo como referencia 1000 kg de lombrices:

- Mueven aproximadamente 250 toneladas de suelo al año.
- Generan 100 kg de mucus (rico en enzimas y aminoácidos) por Ha y año;
- Generan 18 y 50 kg por Ha y año de excreciones (rica en urea y amoniaco).
- Los cadáveres de las lombrices en el suelo aportan 100 - 225 kg de N por Ha y año.

La mayor riqueza de la drilosfera es que se localizan un gran porcentaje de los microorganismos del suelo: 40% de los microorganismos nitrificantes, 13% de los fijadores de nitrógeno, 16% de los desnitrificantes. Es tal la importancia de la drilosfera que incluso los edafólogos consideran la existencia de horizontes del suelo formados casi exclusivamente por el suelo movido por las lombrices y sus excrementos a los denominan horizontes vérmicos (*Lavelle, P., Rouland et al., 2005*).

Las lombrices generan interacciones con muchos microorganismos del suelo, que aceleran las tasas de descomposición de la materia orgánica y la eliminación de ciertos contaminantes. Las lombrices de tierra se consideran biorreactores naturales porque algunos microorganismos proliferan en su intestino y porque brindan las condiciones adecuadas para la biodegradación de los desechos (*Munnoli et al., 2010*). Producen nutrientes a los microorganismos creando una interacción simbiótica y sinérgica (*Aira et al., 2007*) (*Hong et al., 2011*). A partir de su jugo intestinal, el mucus producido durante su desplazamiento o por la actividad microbiana se generan enzimas. Estas enzimas intestinales son capaces de descomponer y biodegradar residuos de diferente naturaleza orgánica (*Sánchez-Hernández et al., 2009*) (*Blouin et al., 2013*).

### 1.6 Las lombrices como servicio ecosistémico de apoyo y regulación

Las lombrices brindan múltiples servicios ambientales en los agroecosistemas (*Blouin et al., 2013*). Estos invertebrados ejercen un fuerte efecto estimulante sobre los microorganismos del suelo a través de su ingestión continua de tierra (lombrices endógeas) y hojarasca mezclada con tierra (lombrices anécicas). Además, la intensa actividad de excavación de estos organismos del suelo

contribuye a dispersar los microorganismos en el suelo, aumentando así el proceso de descomposición de la materia orgánica en la matriz del suelo (Yang & van Elsas 2018).

Algunos estudios sugieren que estos anélidos pueden contribuir a la degradación de contaminantes orgánicos, resultando así una estrategia complementaria de biorremediación in situ (Rodríguez-Campos et al., 2014). La evidencia acumulada sugiere que las lombrices de tierra interactúan con los microplásticos en el suelo (Lwanga et al., 2016). Se demostró la degradación de los microplásticos en el tracto gastrointestinal de *Lumbricus terrestris* incubados en suelos contaminados con microplásticos. La lombriz *L. terrestris* expuesta a un 7 % de LDPE microplástico podría absorber LDPE y disminuir el tamaño de sus partículas, lo que facilitaría la descomposición del LDPE a medida que pasa por el intestino. Los consorcios de bacterias del intestino de la lombriz de tierra pudieron disminuir el tamaño de las partículas y metabolizarlas liberando alcanos de cadena larga como subproductos de la descomposición bacteriana (Lwanga et al., 2018).

Sin embargo, estos estudios se han realizado utilizando lombrices de tierra que habitan en el suelo, y se debe investigar una interacción comparable en el compostaje, especies de lombrices epigeas como *Eisenia fetida*. Varios estudios realizados con este género han revelado que construyen su microbioma moldeado seleccionando del grupo de bacterias ingeridas. Un análisis metagenómico para caracterizar las comunidades bacterianas de heces de *Eisenia andrei* alimentadas con diferentes fuentes de alimento encontró que las comunidades bacterianas de heces dependían en gran medida de la fuente de alimento ingerida por las lombrices (Aira et al., 2016). Estos resultados prometedores fomentan el uso de lombrices de tierra en la biodegradación de los residuos plásticos agrícolas (AWP). Este enfoque novedoso aumentaría el uso potencial de estos organismos para gestionar los desechos plásticos por parte de los agricultores.

### 1.7 Microorganismos descomponedores de polímeros plásticos

El proceso de biodegradación se refiere a la conversión de compuestos orgánicos en biogás y biomasa residual, como resultado de la actividad microbiana (Ali and Sun, 2019; Ali et al., 2019a, 2019b), que pueden utilizar plástico como fuente de carbono (Shah et al., 2008; Magnin et al., 2020). Incluyendo plásticos sintéticos, PES, polivinilo, poliamida (PA) y PU, representan los materiales más ampliamente utilizados en todo el mundo. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de sus residuos pueden ser biodegradados debido a la naturaleza del plástico y sus propiedades fisicoquímicas, ya que el plástico es un sustrato de crecimiento débil para los microorganismos (Biffinger et al., 2014). La degradación enzimática del plástico a través de la hidrólisis se puede realizar mediante la unión de la enzima al polímero para catalizar la ruptura hidrolítica de los polímeros en oligómeros, dímeros y monómeros, para finalmente ser mineralizado a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capacidad de los hongos, las bacterias y las algas como descomponedores de polímeros se ha destacado previamente y se ha informado que las especies crecen en polímeros naturales fácilmente degradables, como la celulosa y la lignina (Ali y Sun, 2015) o resistentes a la degradación polímeros como PE y PU (Shah et al., 2008; Raghavendra et al., 2016; Zhang et al., 2020).

En ambientes naturales, los plásticos están rodeados por una gran variedad de microorganismos, que en combinación promueven la degradación del plástico (Luo et al., 2022). Varios estudios han examinado e identificado cepas microbianas capaces de degradar los polímeros plásticos, como se muestra en la tabla 4 la eficiencia de la tasa de degradación.

Tabla 5. Microorganismos descomponedores de polímeros plásticos. Fuente: Zhenyan Lin et al., 2022.

Microorganismo	Plástico	Ambiente	Eficiencia de degradación	Tiempo
<i>Aspergillus niger</i>	PET/PS	Suelo	-	4 meses
<i>Bacillus subtilis</i>	PET/PS	Suelo	20 % - 74 %	4 meses
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	PET/PS	Suelo	0 % - 5%	4 meses
<i>Staphylococcus aureus</i>	PET/PS	Suelo	8,75 % - 4,7%	4 meses
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PET/PS	Suelo	-	-
<i>Thermobifda fusca</i>	PET	Suelo	-	-
<i>Pseudomona citronellolis</i>	LDPE	Vertedero municipal	-	-
<i>Citrobacter sp.</i>	PE/PS	Intestino del gusano de harina	-	-
<i>Kosakonia sp.</i>	PE/PS	Intestino del gusano de harina	-	-
<i>Brevibacillus borstelensis strain</i>	LDPE	Suelo	11%	30 días a 50°C
<i>Chryseobacterium gleum EY1</i>	LDPE	Fango activo de aguas residuales	-	-
<i>Rhodococcus sp.</i>	LDPE	Suelo de bosque	-	-
<i>Stentrophomonas pavanii</i>	LDPE	Vertedero de RSU	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	LDPE	Residuos de RSU	-	-
<i>Aspergillus awamori</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Gliocladium viride</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Mortierella subtilissima</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Comamonas sp.</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Deftia sp.</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Stentrophomonas sp.</i>	LDPE	Suelo	-	-
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	LDPE	Banco de genes	61%	2 meses
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	PET/PS	Banco de genes	50%	2 meses
<i>Rhodococcus ruber</i>	LDPE	Residuos agrícolas con PE en el suelo	0,86%	por semana
<i>Ideonella sakaiensis</i>	PET	PET expuesto al ambiente	-	-

La degradación microbiana de los residuos plásticos se lleva a cabo principalmente por cinco etapas diferenciadas: 1) Colonización, 2) Biodeterioro 3) Biofragmentación 4) Asimilación 5) Mineralización

La colonización es la primera etapa del mecanismo, donde las especies microbianas se adhieren a la superficie plástica, formando consorcios que conducen a la creación de la biopelícula, la cual provoca severos daños en la superficie del polímero. El biodeterioro ocurre con la degradación del polímero, debido a la secreción de diversas proteínas y polisacáridos por parte de la biopelícula. La biofragmentación produce grietas que son colonizadas por la biopelícula, donde se infiltran enzimas y altera las propiedades fisicoquímicas del polímero (tamaño de poro). En cuanto a la actividad de los microorganismos, los hongos filamentosos usan el micelio para penetrar en el material polimérico e inducir la formación de grietas, lo que lleva disminución de la resistencia y durabilidad del polímero (Bonhomme et al., 2003).

La extensa superficie del micelio fúngico permite penetrar la superficie del polímero para acceder a su interior y degradar efectivamente los polímeros plásticos convencionales (Sánchez, 2020). Además, las enzimas extracelulares (por ejemplo, despolimerasa) pueden ser secretadas por el micelio y descomponer los polímeros en oligómeros, dímeros y monómeros (Ameen et al., 2015; Ali et al., 2021), mientras que, en comparación con las bacterias, la concentración de enzimas secretadas por un hongo es significativamente mayor (Gangola et al., 2019).

Posteriormente, los monómeros producidos pueden ser asimilados y mineralizados por hongos intracelulares y enzimas. Los hongos de la podredumbre blanca y la podredumbre parda contribuyen significativamente a la biodegradación del plástico y otras sustancias poliméricas, debido a su capacidad para producir varias enzimas, descomponer los polímeros y convertirlo en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

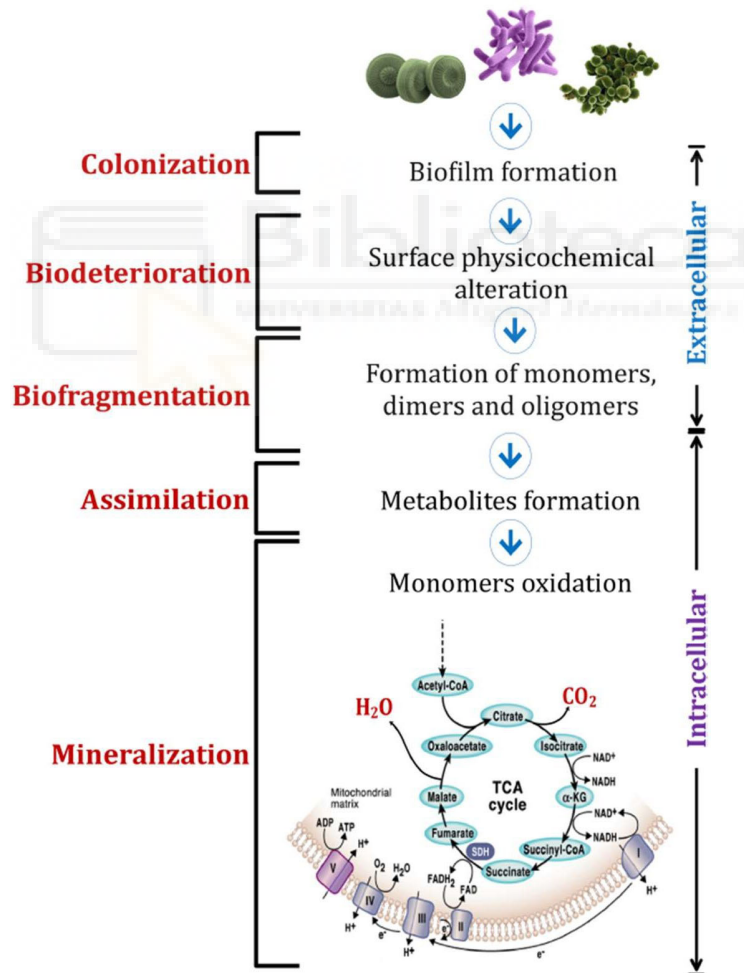


Figura 10. Etapas de la degradación microbiana de los polímeros plásticos.  
Fuente: Sameh Samir et al., 2021

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es determinar la viabilidad del proceso de vermicompostaje como alternativa de biotratamiento de los residuos biodegradables contaminados con polímeros plásticos de diferente composición, comúnmente usados en agricultura y comparar este mismo tratamiento al inocular el medio con diversas y conocidas poblaciones de microorganismos con capacidad de descomponer polímeros plásticos, distinguiendo entre consorcios endógenos, extraídos y aislados del tracto digestivo de *Eisenia fetida* (ENDO-*Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, *Pseudomonas putida*), consorcios exógenos, extraídos de ambientes contaminados con plásticos (EXO-*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Alternaria alternata*) y la aplicación mixta de ambos (MIXc).

El presente estudio que defiende este trabajo fin de máster, posee una serie de objetivos específicos:

- Determinar la evolución del proceso de vermicompostaje en un medio contaminado con residuos de polímeros plásticos (LDPE, y mezcla de LDPE, LLDPE, PET, PS), e inoculados (ENDO, EXO Y MIXc), mediante el seguimiento de los principales parámetros fisicoquímicos.
- Evaluar la supervivencia, evolución de peso de los individuos de lombriz y determinar el estrés oxidativo que sufren las poblaciones de lombrices *Eisenia fetida* en dicho medio a través de la medida de los principales biomarcadores.
- Determinar la influencia de la presencia de plástico y la Inoculación con PMC (ENDO, EXO y MIXc) en la actividad enzimática del vermicompost obtenido.

Mediante el experimento de vermicompostaje con *Eisenia fetida* (360 horas) en un medio contaminado con polímeros plásticos (1,25 % sobre peso fresco), se planea obtener información acerca de la supervivencia de esta especie de lombriz epigea en presencia y ausencia de microorganismos descomponedores de dichos polímeros, para determinar la viabilidad y eficacia del empleo de cepas y consorcios de microorganismos en la fortificación de dichas poblaciones de *Eisenia fetida*

En la Figura 11 se representa un diagrama conceptual de los objetivos de este estudio. El análisis de las muestras del vermicompost obtenido en ambos casos (con microorganismos inoculados y sin ellos) determinará la eficacia para degradar los polímeros plásticos y proponer la alternativa de vermicompostaje de residuos biodegradables contaminados con residuos plásticos.

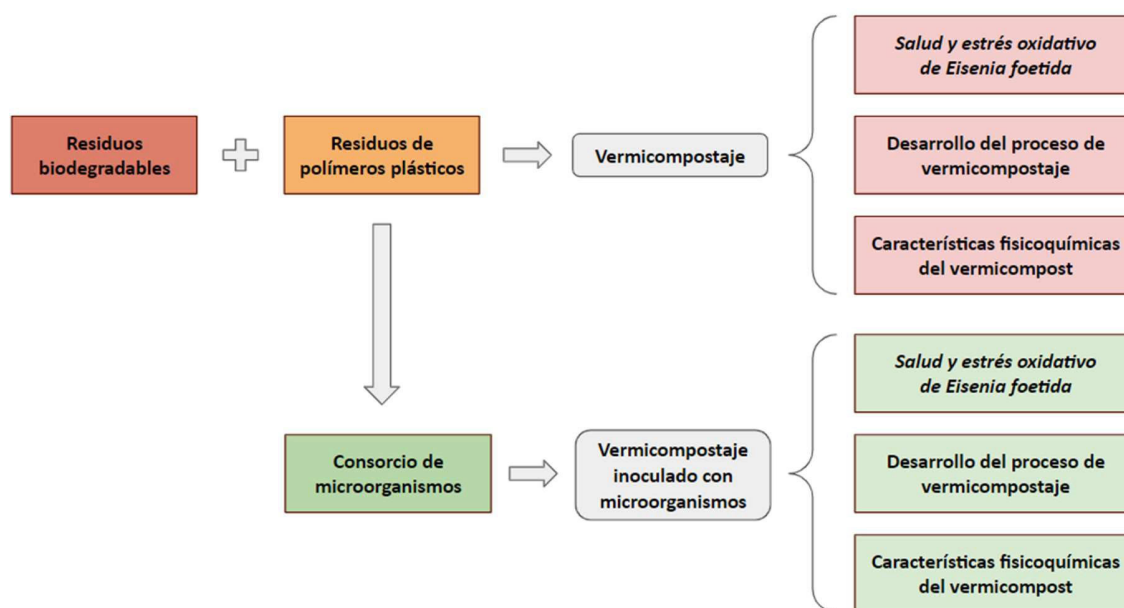


Figura 11. Diagrama conceptual de los objetivos del trabajo de fin máster. Elaboración propia.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Diseño experimental

A fin de estudiar la compatibilidad de *Eisenia foetida* con los consorcios Microbianos PMC (ENDO-EXO-MIXc) en el biotratamiento de residuos biodegradables contaminados con residuos plásticos, el diseño experimental fue realizado y estandarizado para obtener los potenciales efectos sinérgicos-antagónicos de los microorganismos seleccionados sobre la supervivencia y las respuestas morfológicas de las lombrices de tierra. El experimento consistía en una incubación (360h), bajo condiciones controladas ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2$  en oscuridad) tratando de simular un proceso de vermicompostaje. El ensayo se llevó a cabo en container de 4 litros con 640 g de compost (humedad ajustada al 70%) al que se añadían 100 individuos citelados de EF y que se mantuvieron bajo estas condiciones durante 360 horas.

Los tratamientos consistieron en:

- **2 tipos de plásticos:** (LDPE y AWP MIX mezcla de plásticos en proporción 32,5 % LDPE + 32.5% LLDPE + 20% PS+ 15%PET) ambos añadidos al 1,25 % sobre peso fresco
- **3 consorcios microbianos:** ENDO (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, *Pseudomonas putida*), EXO (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Alternaria alternata*), Y aplicación de ambos MIXc (EXO + ENDO).

Los diferentes tratamientos se realizaron siempre por triplicado (n=3), manteniendo como **tratamiento control 3 réplicas sin aplicación de inóculo ni adición de plástico** al medio a fin de discernir el comportamiento normal de EF bajo las condiciones de ensayo. Por tanto, las **principales variables** del ensayo son:

- V01: Presencia/ausencia de consorcios Microbianos PMC
- V02: Presencia ausencia de plástico AWP

**Resumen diseño experimental:**

**Especies:** *Eisenia fetida* (EF)

**Medio:** Compost maduro (estandarizado para todos los tratamientos) contaminado con AWP

**Contenedor:** Recipientes de plástico de 4L

- Incubación controlada: 20°C ± 2 en oscuridad
- Duración: 360 h
- Replicas por tratamiento: n=3
- 100 individuos adultos de EF / 640 g de peso fresco de compost por replica/ 8g de AWP
- Inoculación con ENDO, EXO, MIXc (EXO+ENDO) consorcios, No Inoculación
- Plástico (LDPE) y (Mixb 32,5 % LLDPE + 32,5% LDPE + 15,0 % PS + 20,0% PET) al 1,25 % sobre peso fresco. No adición de plástico
- Medidas de supervivencia: 0, 72, 144, 216, 288 y 360 horas
- Muestreo general: 0 y 360 horas



Figura 12. Detalle del montaje y dispositivos utilizados en el diseño experimental del TFM.

### 3.2 Preparación de los materiales utilizados en el ensayo

#### Compost

Para la realización del experimento fue utilizado un único compost como sustrato para las lombrices. Este compost se desarrolló en la instalación COMPOLAB-UMH a escala de pila comercial (10 m<sup>3</sup>) utilizando cuatro ingredientes (lodos agroalimentarios + estiércol de vaca + poda de viñedo, 45+15+40 % en vol., respectivamente). El proceso de compostaje duró 96 días, incluyendo cuatro volteos. Se alcanzaron altos niveles de calidad en términos de estabilización, higienización y ausencia de efectos fitotóxicos. Los metales pesados también cumplieron la normativa sobre fertilizantes de clase A.

Tabla 6. Características del sustrato utilizado (CE: Conductividad eléctrica DA: Densidad aparente; MO: Materia Orgánica, COT: Carbono Orgánico Total; NT: Nitrógeno Total; IG: Índice de Germinación).

Parámetros F&Q		Macronutrientes		Metales pesados		Parámetros de madurez	
pH	7,8	TN (g/Kg)	21,3	Ni (mg/Kg)	7,6	GI (%)	108
CE (dS m <sup>-1</sup> )	4,5	P (g/Kg)	0,41	Pb (mg/Kg)	7,3	C <sub>HA</sub> (%)	1,93
DA (g/l)	486	K (g/Kg)	1,01	Hg (mg/Kg)	< 0,1	C <sub>FA</sub> (%)	2,30
MO (%)	60,3	Na (mg/Kg)	225	Zn (mg/Kg)	84,6	CIC (meq/100 g MO)	128
COT (g/Kg <sup>-1</sup> )	225	Mg (mg/kg)	650	Cr (mg/Kg)	36,9	Fenoles (mg/Kg)	454

#### Lombrices (*Eisenia fetida*)

Para el desarrollo del bioensayo de incubación, se seleccionaron lombrices cliteladas adultas con una masa corporal entre 250 mg - 600 mg, tal como recomiendan las directrices internacionales (OCDE 2016) sobre ensayos de biotoxicidad. Durante el tiempo de exposición, cuando se observó mortalidad, las lombrices se retiraron inmediatamente del recipiente. Las lombrices eran seleccionadas desde los pallots de cría (0,5 m<sup>3</sup>) y alimentadas con el mismo sustrato utilizado en el ensayo al menos durante 15 días antes del comienzo del mismo, a fin de mejorar su adaptabilidad al medio.





Figura 13: Detalle de los Pallots utilizados en COMPO-LAB para la cría de *Eisenia fetida*.

### Materiales Plásticos

Se escogieron los tipos de materiales plásticos que aparecen en la Tabla 7, debido a que son ampliamente usados para múltiples propósitos dentro del sector agroalimentario moderno (protección de los cultivos, prevención del crecimiento de las malas hierbas, protección contra los rayos UV, control del riego, transporte y envasado). Para producir materiales flexibles, semirrígidos y/o rígidos, los principales polímeros utilizados en la agricultura son el PE y el PP debido a su bajo coste, su fácil manejo, su alta resistencia al impacto y sus excelentes propiedades de resistencia química. El polietileno de baja densidad (LDPE) y el polietileno de baja densidad lineal (LLDPE) se utilizan principalmente para producir películas (para invernaderos, túneles bajos, acolchado y ensilaje), debido a su elasticidad y a su alta resistencia al desgarro y al impacto (Dorigato et al., 2011).

Tabla 7. Tipos de polímeros plásticos utilizados y sus principales características.

Tipo de plástico	Características
Tratamiento LDPE	LDPE en polvo, virgen, proporcionado por LDPE REPSOL Alcludia 2308FGA
Tratamiento LLDPE+LDPE+PET+PS	Mezcla de 32.5% LLDPE; 32.5% LDPE; 15.0% PS -; 20.0 % PET
LLDPE	LLDPE en polvo, obtenido de LLDPE SASOL HF1810X
LDPE	LDPE en polvo, virgen proporcionado por LDPE REPSOL Alcludia 2308FGA
PET	Polyethylene terephthalate (PET) en polvo, virgen, proporcionado por UNIFI
PS	Polystyrene (PS) en polvo, virgen, proporcionado por UNIFI.

### 3.3 Parámetros analizados y métodos analíticos

#### 3.3.1 Parámetros fisicoquímicos

La determinación de las principales características físico-químicas es importante para evaluar la correcta evolución del proceso de vermicompostaje. Las características iniciales del sustrato evolucionan con el tiempo debido a las capacidades de degradación de las lombrices epigeas y así como la de la microbiota asociada al intestino. En la Tabla x se muestran algunos de los parámetros determinados y los métodos analíticos utilizados en este trabajo.

Tabla 8: Determinaciones analíticas del vermicompost.

Parámetros	Método analítico
Humedad	Métodos gravimétricos
Densidad Aparente (DA)	UNE-EN 13401:1999
pH	Método potenciométrico /Suspensión hidrosoluble 1:10 (sólido:líquido)
Conductividad Eléctrica (CE)	Conductimetría / Suspensión hidrosoluble 1:10 (sólido: líquido)
Materia Orgánica	Gravimetría por Calcinación a 430°C durante 24 horas
Carbono Orgánico Total (COT)	Analizador elemental C/N
Nitrógeno Total (NT)	Analizador elemental C/N
Fósforo Total	ICP-MS/Digestión ácida en microondas
Potasio Total	ICP-MS/Digestión ácida en microondas
Sodio Total	ICP-MS/Digestión ácida en microondas
Metales Pesados: Fe, Cu, Mn, Zn, Cd, Ni, Cr, Co, Pb, Mo, Li, Ba	ICP-MS/Acid digestion in microwave

#### Humedad

Para determinar la humedad se utilizan métodos gravimétricos. Se pesa una cantidad de la muestra húmeda en un vaso de precipitados. Después la introducimos en la estufa a 105°C durante el tiempo necesario hasta que su peso se mantenga constante. Por último, volvemos a pesar los vasos con la materia ya seca y determinamos el porcentaje de la humedad inicial de la muestra mediante la diferencia de pesada entre la inicial y la final:

$$\%H_2O = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

Donde:

- P1: peso del vaso sin muestra.
- P2: peso del vaso con la muestra fresca.
- P3: peso del vaso con la muestra seca

#### **Densidad Aparente**

Se utiliza una jarra de medición tarada, se miden 250 mL de la muestra húmeda sin lombrices en el T0 y T30 de los lechos con lombrices y pesamos el contenido. Se realizan dos mediciones a cada lecho tarando la jarra de medición en cada una y calculamos la densidad aparente mediante la media de ambas mediciones dividida entre el volumen utilizado. Norma UNE-EN 13401:1999

#### **Materia Orgánica Total**

Se determina la materia orgánica como el peso eliminado por calcinación en mufla a 430°C durante 24 horas. El valor se expresa en porcentaje respecto al peso de muestra seca.

#### **Cenizas**

Se consideran cenizas o fracción inorgánica al peso sin volatilizar tras la calcinación a 430°C durante 24 horas. Se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Cenizas} = 100 - \% \text{ MOT}$$

#### **pH y Conductividad eléctrica (CE)**

Para analizar los parámetros de pH y conductividad eléctrica (CE), se toman 3 g de cada muestra por duplicado en tubos falcon y se mezclan en relación 1:10 con agua destilada. Los tubos se meten en un agitador durante 2 horas, tras este tiempo, se realiza la medición del pH mediante un pH-metro. Después se introducen los tubos en una centrífuga durante 5 minutos a 1.500 rpm, se filtra el sobrenadante y se miden los valores de CE con un conductímetro.

#### **Polifenoles hidrosolubles**

Se toman 2 gramos de cada muestra en tubos Falcon. Se les añaden 40 ml de agua destilada y se agita durante 2 horas. Tras la agitación, se centrifugan los tubos a 3000 revoluciones durante 2 minutos y se filtran con filtros de malla. Del extracto obtenido se introduce 1 ml en un matraz aforado de 50 ml, al que posteriormente se le agrega 2,5 ml de Reactivo Folin Ciocalteu, se agita y se espera 3 minutos, tras lo cual se detiene la reacción con 5 ml de carbonato sódico al 20%. Por último, se enrasa con H<sub>2</sub>O destilada, se deja reposar durante 1 hora y se utiliza un espectrofotómetro para determinar la absorbancia a 725nm de longitud de onda. La recta de calibrado se realiza siguiendo el mismo procedimiento, sustituyendo la muestra por diferentes concentraciones de ácido gálico.

### Índice de germinación (IG)

Se toman 5 g de cada muestra, integrando ambas réplicas en el caso de las muestras finales en una relación 50% y homogeneizándola. Se humecta cada muestra al 60% con agua destilada. Posteriormente se agregan 7,5 ml de agua destilada, se agita para homogeneizar y se extrae el extracto filtrando a presión negativa a través de un filtro de fibra de vidrio. Para cada muestra se preparan 10 placas de Petri con un filtro de papel, con 8 semillas de *Lepidium sativum*. A cada placa se le agrega 1 ml del extracto, se envuelven los lotes de 10 placas en papel de aluminio y se introducen durante 48 horas en una incubadora a 27°C. Por último, se comprueba el número de semillas germinadas y la longitud de la raíz de cada planta (Figura 9).

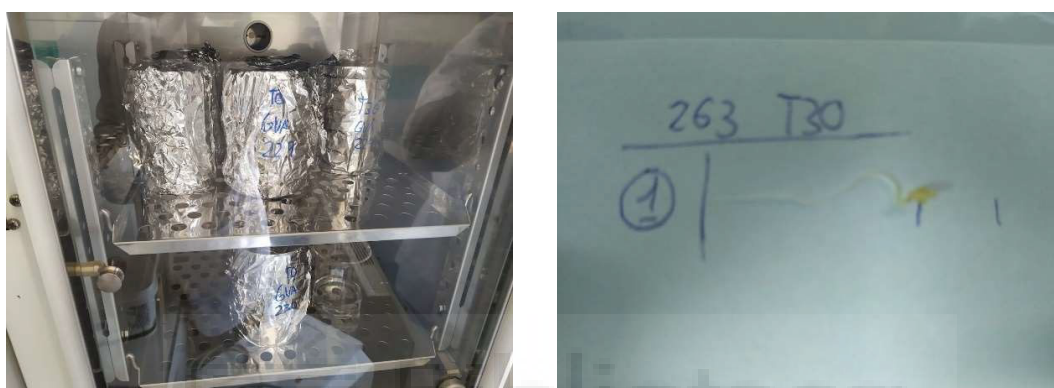


Figura 14. Incubadora con placas para medir el IG y medición de la elongación de la raíz tras 48 horas.

### Capacidad de intercambio catiónico (CCC)

El método de determinación de la CCC se basa en la saturación del complejo de cambio con bario y determinación del catión retenido por diferencia con un blanco (Lax y col., 1986)

### Carbono orgánico total (COT) y Nitrógeno total (NT).

Medida del CO<sub>2</sub> producido por la quema a 1020°C de la muestra en un analizador elemental (Navarro et al. 1991).

Se toman 1-2 mg de muestra molida en molino de bolas en una cápsula de estaño con precisión de 0,001 mg. El analizador se calibra con un patrón de atropina (*EuroVector Elemental Analyzer, Milano, Italy*)

### Mineralización de la muestra

Digestión con HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) en microondas (*CEM, mod. MARS ONE*). La digestión se asiste con vasos de teflón y sondas de temperatura especialmente diseñadas para ello.

### Determinación de macronutrientes (K y P) y metales pesados

La muestra se introduce en un ICP- MS para la determinación de los metales pesados Cd, Cu, Ni, Pb, Zn y Cr, además de los macronutrientes K y P.

### 3.3.2 Determinación de la actividad enzimática del vermicompost.

Tabla 9. Actividades enzimáticas del vermicompost.

Actividad Enzimática	Acrónimo	¿Qué se mide?
Carboxilesterasa (EC 3.1.1.1.) *	(CbE)	<b>Enzima</b> , implicada en el metabolismo de detoxificación de sustancias endógenas. Es un biomarcador sensible a la exposición a compuestos xenobióticos. (Ej: plásticos).
Deshidrogenasa	DHE	<b>Enzima</b> , relacionada con los procesos microbianos en el suelo. Indica la tasa de oxidación de la materia orgánica en el sustrato. Es indicativo de la actividad microbiana.
Catalasa (EC 1.11.1.6.)	CAT	<b>Enzima</b> , perteneciente a las enzimas oxidoreductoras del peróxido de hidrogeno, está relacionada con la detoxificación. Participa como barrera fisiológica de radicales libres.

El sustrato (vermicompost o compost) se homogeneiza a través de la ruptura de los agregados con un mortero cerámico. Relación 1:50 (W/V) 1g a 50 ml H<sub>2</sub>O. Moler 1 g de vermicompost de cada muestra en 5 ml de H<sub>2</sub>O utilizando un mortero cerámico (Relación 1:50 (w/v)); luego se ajustó el volumen del extracto a 50 ml con H<sub>2</sub>O. Se sometieron las muestras a un posterior agitado con vortex durante 1 minuto. Se conservó en frigorífico a 4°C hasta la medida de las diferentes actividades enzimáticas:

- **Determinar actividad carboxilesterasa (CbE) (EC 3.1.1.1.):** Se mide mediante la adición de una alícuota de 100 µl de la muestra homogeneizada, posteriormente se añaden 380 µl de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH-7,0). La reacción enzimática se inicia añadiendo 20 µl de sustrato 1-naftilbutilato (1-NB) (2 mM, concentración final) y esperando 5 minutos antes de detener la reacción. El producto formado (1-naftol) se revela añadiendo 50 µl de sal Fast Red ITR al 0,1% (p/v) disuelta en al 2,5% (p/v) y Triton X-100 al 2,5% (v/v). Finalmente, se mide la absorbancia del complejo naftol-Fast ITR a 450 nm utilizando un lector de microplacas Asys HiTech UVM340 (Asys HiTech GmbH, Eugendorf, Austria). La actividad de la carboxilesterasa se expresa como nmol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de sustrato seco, determinado por una curva de calibración construida para el 1-naftol. Se utilizan muestras de control (sin sustrato) y en blanco (sin vermicompost) para corregir la absorbancia de fondo y la hidrólisis no enzimática de los sustratos, respectivamente.

- **Determinar actividad deshidrogenasa (DHE):** Se mide pesando 0,1 g de la muestra y añadiendo 750 µl de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH-7,0) + 1 ml de INT. Todo ello se homogeneiza en vortex y se mantiene a 40°C en baño de agua durante 1 hora en oscuridad (las muestras se agitaron cada 20 minutos). La reacción del producto resultante se detiene añadiendo 2,5 ml de solución Stop. Se preparan dos controles aleatorios con 750 µl de TRIS sin INT. La medición se realiza en espectrómetro de placas a 450 nm.
- **Determinar actividad catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6.):** Se determina extrayendo 1 ml de la suspensión acuosa (1:50 p/v) y se dispensa con 125 µl de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0,3%. Posteriormente, se agita durante 10 minutos para permitir que se produzca la reacción y luego se detiene con 125 µl de ácido sulfúrico 3M (reacción de bloqueo) (Trasar-Cepeda.,1999).

### 3.3.3 Biomarcadores del tejido de la lombriz

Tabla 10. Biomarcadores medidos en el tejido de la lombriz *Eisenia fetida*.

Actividad Enzimática	Acrónimo	¿Que se mide?
Acetilcolinesterasa	<b>AChe</b>	<b>Enzima</b> , clave en la regulación del impulso nervioso en las sinapsis colinérgicas. La inhibición de la actividad de la AChE es un biomarcador sensible a la exposición a compuestos xenobióticos.
Carboxilesterasa	<b>CBe</b>	<b>Enzima</b> , capaz de hidrolizar pesticidas sintéticos e inactivar pesticidas organofosforados con una unión irreversible entre el pesticida y el sitio activo de la enzima. Tiene un papel importante en la detoxificación de pesticidas.
Peroxidación lipídica	<b>PerLip</b>	<b>Enzima</b> , puede reducir los peróxidos lipídicos a alcoholes lipídicos. Estos ocurren en la membrana celular y son indicativos de daños y estrés oxidativo, pérdida de la función celular y muerte celular por apoptosis o necrosis.
Glutation oxidado	<b>GSSG</b>	<b>Enzima</b> , el GSSG es potencialmente tóxico para las células, pero las células normalmente contienen una alta actividad de glutatión reductasa, que mantiene la mayor parte del GSH en forma reducida. Durante el estrés oxidativo, el GSSG podría reaccionar por intercambio de disulfuro con una proteína tiol para producir un disulfuro mixto de proteínas (PSSG), que puede intercambiarse con otra proteína tiol a una proteína.
Glutation reductasa	<b>GSH</b>	<b>Enzima</b> , es el antioxidante más abundante en las células aeróbicas, presente en concentraciones micromolares (µM) en los fluidos corporales y en concentraciones milimolares (mM) en los tejidos. El GSH es fundamental para proteger el cerebro del estrés oxidativo, actuando como un eliminador de radicales libres e inhibidor de la peroxidación de lípidos.

Para la homogenización de la muestra se utilizan seis lombrices de tierra seleccionadas al azar y previamente depuradas (24 h.) de cada réplica del ensayo. Los cuerpos de las lombrices se homogeneizan en un tampón (pH = 7,4) compuesto por 25 mM de sacarosa, 20 mM de tampón Tris-HCl y 1 mM de EDTA molido con potter (Heidolph Company) sobre hielo para mantener la muestra fría. Los homogeneizados se centrifugaron a 9.000 g durante 20 minutos a 4°C para obtener la fracción postmitocondrial, cuya alícuota se almacena a 80°C hasta su análisis.

El contenido total de proteínas de *E. fetida* se determina en una dilución acuosa 1:10 (vol: vol) con ácido bicoconínico (BCA). El reactivo se calienta a 60°C durante 15 minutos y luego se lee en el espectrómetro.

- **Determinar actividad carboxilesterasa (CbE):** Se añaden 100 µl de tejido homogeneizado a 380 µl de tampón Tris-HCl 0,1M (pH=8,4) y 40 µl de butirato de 1-naftilo (1-NB) 20 mM. Los tubos se incuban a 20 °C durante 10 minutos y luego se centrifugan durante 5 minutos a 10.000 rpm. Se transfieren 150 µl de sobrenadante a nuevas microplacas, y se revela la formación de 1-naphtol tras añadir 50 µl de una solución que contenía 0,1 % de Fast red ITR. Las microplacas se guardan en la oscuridad durante 20 minutos y a continuación se comprueba la absorbancia del complejo naphtol-Rojo rápido ITR a 450 nm.
- **Determinar actividad acetilcolinesterasa (AChE) (EC 3.1.1.7):** Con espectrofotómetro en presencia de 3 mM de yoduro de acetilticolina como sustrato y 0,1 mM de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico), midiendo el aumento de la absorbancia durante la reacción cinética, leída a 412 nm. La velocidad de reacción enzimática se cuantificó frente a un blanco sin sustrato para cada medición. Para restar la hidrólisis espontánea del sustrato, se realizó un segundo blanco sin la muestra. La acetilcolinesterasa se expresó como nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.
- **Determinar actividad peroxidación lipídica (PerLip):** se miden 50 µl de tejido homogeneizado añadidos a 450 µl de ácido reactivo 2-Thiobarbituric (TBAR) y Butylhydroxytoluene (BHT). La reacción se mantiene durante 30 minutos a 90 °C. Después, se dispensan 250 µl en microplacas de 96 pozos profundos y se leen a 492 nm en el espectrómetro. La actividad enzimática se expresa como µg de MDA mg de proteína. Se realizan tres muestras aleatorias sin TBAR.
- **Determinar actividad glutatión oxidado (GSSG):** Se extraen 100 µl de la muestra del tejido homogeneizado + 2µl vinilpiridina. Posteriormente, se somete a agitación en vortex y se guarda en oscuridad durante 1 hora, después se le añaden 6 µl de Trietanolamina, se homogeneiza en vortex y se guarda en oscuridad 10 minutos. Se dispensa una alícuota de 50µl en los pocillos de una placa de fondo plano y se añaden a cada pocillo 125 µl de DTNB + GR y 50 µl NADPH. Leer rápidamente (reacción cinética) en el espectrofotómetro a una longitud de onda= 405 nm.

- **Determinar actividad glutatión reductasa (GSH):** Se dispensan 5 µl de la muestra del tejido homogenizado en los pocillos de una placa de fondo plano y se añaden en cada pocillo +125 µl DTNB + GR y 50 µl NADPH. Leer rápidamente (reacción cinética) en el espectrofotómetro a una longitud de onda= 405nm.

### 3.4 Aislamiento e identificación de las cepas de PMC

Las estrategias para la selección de los consorcios microbianos se diseñaron principalmente para proporcionar candidatos que tuvieran la capacidad de degradar la más amplia gama de polímeros plásticos. Para el cribado y la selección de los microorganismos, también se tuvieron en cuenta los escenarios a los que estaban destinados:

- Los microorganismos que se utilizan como degradadores de polímeros plásticos son inóculos polivalentes (EXO-AWP), es decir, los destinados a la preparación de consorcios microbianos degradadores de plásticos (PMC) para su aplicación en el compost o para magnificar la actividad degradadora de plásticos de las lombrices de tierra, se seleccionaron entre los aislados obtenidos a partir de muestras ambientales (principalmente suelo y compost).
- Los microorganismos que se utilizan como degradadores de polímeros plásticos proceden de las lombrices de tierra con capacidad “probiótica” (ENDO-AWP). Se obtuvieron del intestino del organismo para asegurar su compatibilidad y colonización intestinal. Se inocula el compost con el fin de aumentar su población microbiana degradadora de residuos plásticos agrícolas (AWP).

La estrategia de selección de los consorcios candidatos tuvo en cuenta, junto con la capacidad de degradación del plástico, otros factores como la seguridad, la facilidad de manipulación para ampliar la producción y las condiciones de crecimiento para adaptarse al entorno en el escenario previsto.

Tabla 11. Cepas microbianas aisladas con capacidad de degradar AWP.

Microorganismo	Tipo	Origen
<i>Bacillus licheniformis</i> SALME2B2	Bacteria	Tracto digestivo de <i>Eisenia fetida</i>
<i>Bacillus sonorensis</i> ALME2B3	Bacteria	Tracto digestivo de <i>Eisenia fetida</i>
<i>Bacillus subtilis</i> RBM2	Bacteria	Compost
<i>Pseudomonas putida</i> ALME2B2	Bacteria	Tracto digestivo de <i>Eisenia fetida</i>
<i>Pseudomonas putida</i> REBP7	Bacteria	Suelo
<i>Alternaria alternata</i> RHM4	Hongo	Compost



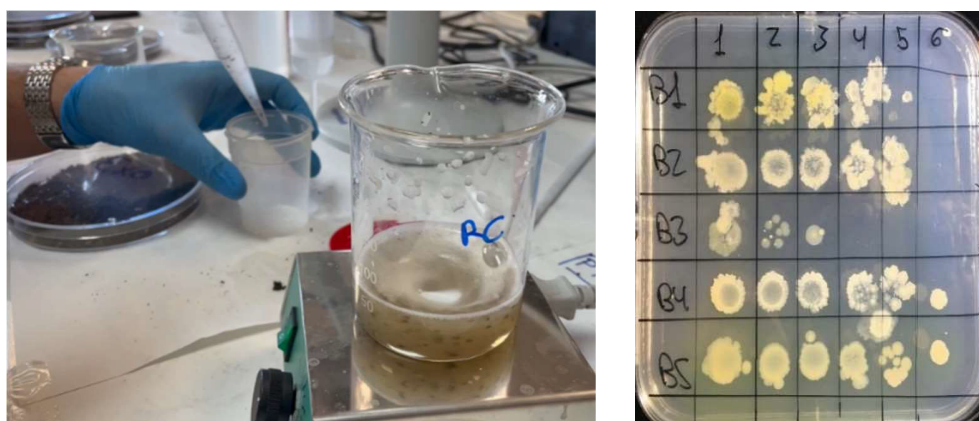


Figura 15. Detalle de la inoculación del Compost con AWP.

El cultivo microbiano es una preparación basada en un medio de cultivo para proporcionar a los microorganismos una mejor supervivencia durante más tiempo. Por lo general, un crecimiento bacteriano contiene el microorganismo, un portador que es un material inerte, nutrientes y compuestos que mejoran la supervivencia de las células o ayudan a protegerlas de los cambios ambientales en condiciones comerciales y aumentando significativamente la vida útil del producto.

Los principales objetivos de un cultivo microbiano son (Ravensberg, 2011; Vassilev et al., 2020)

1. Proporcionar un microambiente adecuado para la cepa o cepas microbianas, combinado con una protección física o química durante un periodo prolongado, con el fin de evitar una rápida disminución de la viabilidad de las células durante el almacenamiento, para que finalmente puedan ser envasadas, almacenadas y enviadas al usuario final.
2. Hacer un producto fácil de usar que pueda ser aplicado económicamente por el usuario final y que pueda ser entregado efectivamente al objetivo.
3. Proteger el microorganismo, una vez aplicado, contra las influencias ambientales perjudiciales, manteniendo e incluso mejorando su persistencia en el lugar de destino.
4. Minimizar los riesgos de exposición del aplicador durante la carga, la mezcla y la aplicación del producto.

Todas estas funciones tienen como objetivo proporcionar una fuente fiable de células vivas disponibles para ejercer sus funciones. De hecho, un número crítico de células es esencial para obtener la respuesta positiva esperada del inóculo formulado.

### 3.5 Métodos Estadísticos

Para realizar el análisis estadístico de las muestras se han realizado Análisis de Modelo Lineal (GLM) multivariante. Además, se ha realizado la prueba ANOVA utilizando el contraste Post-hoc hecho con Tukey-b y DMS. Se han realizado análisis para estudiar los cambios en la supervivencia de *Eisenia fetida* y para los cambios en los parámetros físico-químicos. Para estudiar la supervivencia se han agrupado los datos en función de la variable Presencia/Ausencia de PMC y Presencia/Ausencia de AWP para determinar su efecto sobre en la supervivencia y variación de peso de la especie. Se ha utilizado el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v24 para todos los test estadísticos.

## 4. Resultados

### 4.1 Características de los consorcios microbianos PMC

ENDO-PMC y EXO-PMC se probaron por separado para validar sus efectos sobre la supervivencia de *Eisenia fetida* (EF). Además, también se implementó un consorcio mixto MIXc (ENDO+ EXO PMC). En la Tabla 12, resumimos las principales características del cultivo microbiano utilizado en el ensayo con lombrices de tierra *Eisenia fetida* y AWP, así como la concentración de inóculo aplicado. Los diferentes cultivos fueron inoculados como un combo de microorganismos de la propia *Eisenia fetida* con capacidad “probiótica” (Consortio Endo) o compuestos por microbiota con capacidad metabólica de degradar AWP (Consortio Exo). Para la evaluación de los datos obtenidos durante el ensayo se aplicó un Modelo Lineal General de Medidas Repetidas (GLM-RM).

En el consorcio ENDO se agruparon 3 microorganismos (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis* y *Pseudomonas putida*), el consorcio EXO, con otros 3 microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* y *Alternaria alternata*) procedentes de la colección de microorganismos del proyecto RECOVER. También se implementó un consorcio MIXc (ENDO + EXO), que está conformado por los 6 microorganismos presentes en dicho estudio.

Tabla 12. Microorganismos utilizados y las concentraciones utilizadas de inóculo.

Microorganismo	Código	Origen	Agrupación de PMC	Concentración teórica del inóculo	Concentración del inóculo en el medio
<i>Bacillus licheniformis</i>	SALME2B2 (B1)	EF, aislado del tracto intestinal	Endógeno (ENDO)	10 <sup>8</sup>	APHA 8 x 10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus sonorensis</i>	ALME2B3 (B2)	EF, aislado del tracto intestinal	Endógeno (ENDO)	10 <sup>8</sup>	APHA 8 x 10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas putida</i>	ALME2B3 (B3)	EF, aislado del tracto intestinal	Endógeno (ENDO)	10 <sup>8</sup>	APHA 8 x 10 <sup>7</sup>
<i>Bacilo subtilis</i>	RMB2 (B4)	colección RECOVER	Exógeno (EXO)	10 <sup>8</sup>	APHA 4,5 x 10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas putida</i>	E7 (B5)	colección RECOVER	Exógeno (EXO)	10 <sup>8</sup>	APHA 4,5 x 10 <sup>7</sup>
<i>Alternaria alternata</i>	RHM4 (H1)	colección RECOVER	Exógeno (EXO)	10 <sup>8</sup>	APHA 4,5 x 10 <sup>7</sup>
MEZCLA PMC (ENDO+EXO)	MIX	EF, aislado del tracto intestinal y colección RECOVER	ENDO & EXO	--	APHA 7x10 <sup>7</sup>

Por tanto, para dicho estudio hay 4 tipos de tratamientos diferentes:

- **CONTROL:** Sin inoculación de consorcios microbianos (NPMC).
- **ENDO:** Consorcios microbianos con capacidad “probiótica” del interior del tracto digestivo de la lombriz *Eisenia fetida*.
- **EXO:** Consorcios microbianos extraídos de ambientes contaminados con plásticos.
- **MIXc:** Mezcla de los consorcios microbianos EXO + ENDO.

#### 4.2 Supervivencia de *Eisenia fetida* y efectos morfológicos

En cuanto al % de supervivencia de EF en presencia de consorcios (figura 16), se observaron efectos estadísticos significativos entre el tratamiento MIXc y CONTROL al cabo de 360h, mostrando un efecto sinérgico positivo muy consistente en el tratamiento mixto, con un aumento de la supervivencia de EF de más del 10% respecto al control. No se detectaron diferencias entre los tratamientos CONTROL, ENDO y EXO, por tanto, se puede deducir la ausencia de un efecto negativo sobre la supervivencia de EF en condiciones de Vermicompostaje con presencia de LDPE y LDPE+LLDPE+PET+PS, incluso un efecto positivo cuando ambos tipos de consorcios se inoculan juntos.

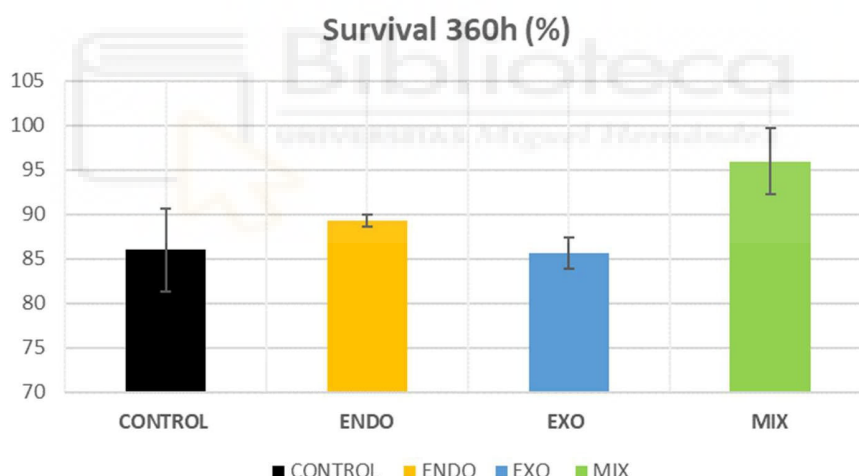


Figura 16. Porcentaje de supervivencia de los especímenes seleccionados de EF al transcurrir 360 horas.

En la figura 17 se observa cómo va descendiendo la supervivencia de EF con los sucesivos conteos realizados, siendo CONTROL y EXO las muestras que menor supervivencia de EF presentaron al final del ensayo. Por el contrario, la supervivencia del MIX se mantiene más estable, entorno al 95% con muy poca variación desde el conteo a 144h, seguido del consorcio ENDO, que se encuentra entorno al 90% de supervivencia. Por tanto, podemos afirmar que el consorcio de microorganismos extraídos del tracto digestivo de la lombriz mejora la supervivencia de EF aumentando incluso cuando se mezcla con EXO, debido a los efectos sinérgicos que ocurren en el MIX.

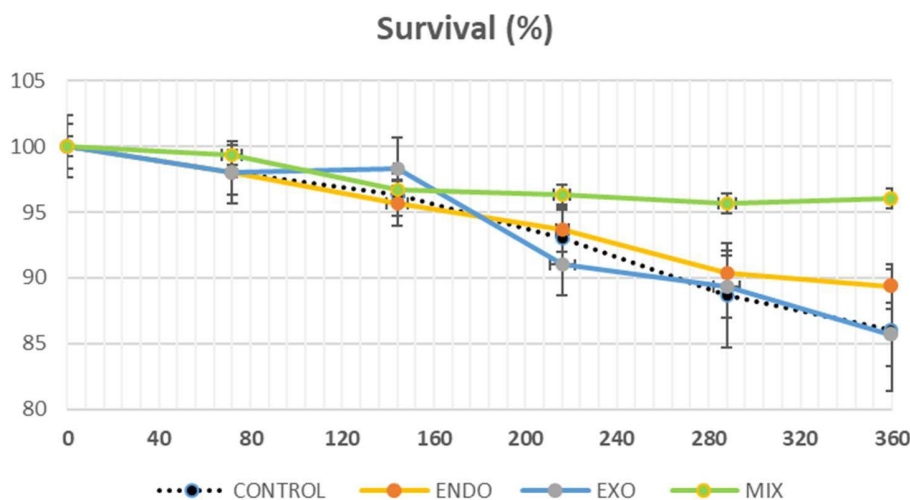


Figura 17. Evolución de la supervivencia durante 360 h en los diferentes tratamientos del experimento

Tabla 13. Efectos en la supervivencia de EF según el tipo de inoculación de PMC. Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM.

Tratamiento de EF	Supervivencia (%)					
	0 h	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
CONTROL	100a	98,0a	96,3a	93,0a	88,7a	86,0a
ENDO	100a	98,0a	95,7a	93,7a	90,3a	89,3a
EXO	100a	98,0a	98,3a	91,0a	89,3a	85,7a
MIX	100a	99,3a	96,7a	96,3a	95,7a	96,0b
<i>F-anova</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	8,7**

La evolución del peso fresco (FW) de EF es un buen parámetro para evaluar la precompatibilidad de consorcios de PMC y lombrices, así como el efecto inducido en la fisiología de EF. Sin embargo, el peso fresco total en sí no es un buen indicador, ya que, en el momento del montaje del ensayo, este peso fresco puede variar según la ponderación de 100 especímenes utilizados en cada uno de los escenarios del mesocosmos. Sin embargo, la variación de FW en comparación con el tiempo cero y el tratamiento control, sí puede informar sobre la evolución en el sistema. En nuestro enfoque de consorcios, utilizando ENDO, EXO y MIXc, no encontramos diferencias significativas estadísticas en comparación con el control en ninguno de los conteos realizados. Este es un hallazgo muy importante, porque podemos suponer que el uso del PMC seleccionados junto con los AWP no afecta negativamente a la lombriz EF.

Por tanto, podemos usarlos en la cascada biotecnológica, propuesta con el fin de establecer un sistema efectivo para la biodegradación de plásticos agrícolas presentes en biorresiduos, la cual se llevará a cabo en sucesivos ensayos dentro del marco del proyecto RECOVER.

Los valores promedio del peso fresco de cada individuo de EF (*figura 18 y tabla 14*), oscilaron entre 0,25 y 0,35g/espécimen, siendo estadísticamente similares el tratamiento CONTROL y MIXc en todos los conteos realizados, y superiores a los consorcios ENDO y EXO. El uso del consorcio EXO y ENDO parece inducir efectos ligeramente negativos sobre EF, ya que en estos se observa un ligero descenso del peso por espécimen durante el ensayo. Además, debemos recordar que en estos tratamientos también hubo una menor densidad de lombrices respecto a la cantidad de sustrato durante el ensayo, al presentar ambos mayor mortalidad. La inoculación del MIXc de consorcios (ENDO +EXO) indujo efectos sinérgicos positivos en comparación con el consorcio ENDO y EXO, obteniendo resultados homólogos con los medios no inoculados de CONTROL (NPMC), lo cual muestra que este tipo de inóculo no induce cambios a nivel fisiológico en EF, permitiendo una correcta alimentación y función metabólica de las lombrices epigeas.

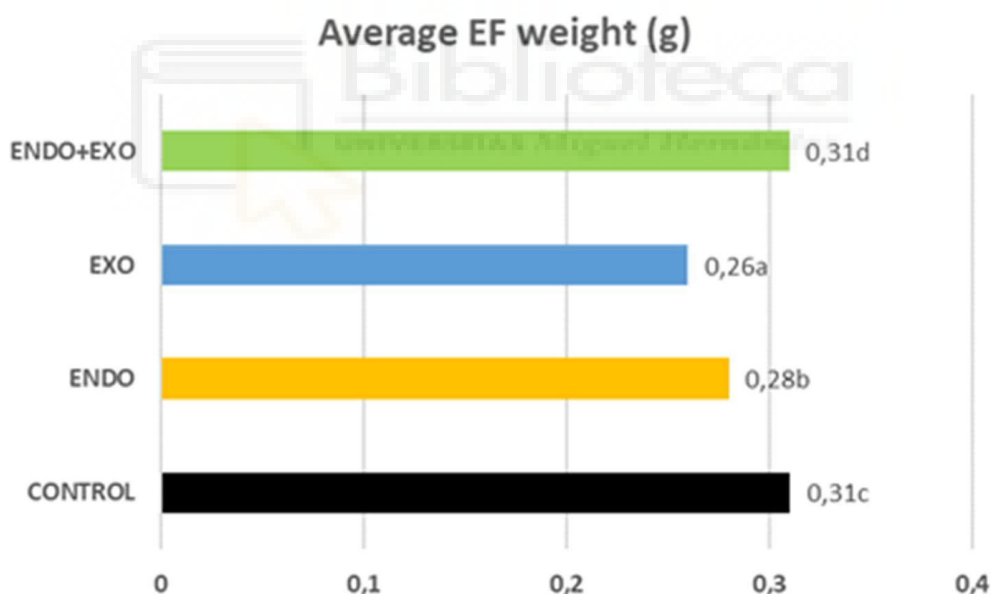


Figura 18. Valores promedio de la biomasa (g) de cada espécimen de *Eisenia fetida*.

Tabla 24. Efectos en el desarrollo morfológico de EF según el tipo de inoculación de PMC.  
Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM.

Variación del peso fresco de <i>Eisenia foetida</i> (EF/FW) (%)						
Tratamiento de EF	0 h	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
CONTROL	0,0a	3,6a	0,3a	-3,6a	-4,6a	-5,2a
ENDO	0,0a	3,7a	1,5a	-1,2a	-1,9a	-2,6a
EXO	0,0a	3,2a	0,7a	-2,3a	-3,0a	-3,2a
MIX	0,0a	2,3a	0,3a	-1,7a	-1,8a	-1,8a
<i>F-anova</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Promedio del peso fresco de <i>Eisenia foetida</i> (FWxEF) (g/lombriz)						
Tratamiento de EF	0 h	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
CONTROL	0,31b	0,35c	0,32c	0,29a	0,30b	0,30b
ENDO	0,27a	0,31 ab	0,29b	0,27a	0,27a	0,27a
EXO	0,25a	0,29a	0,26a	0,25a	0,25a	0,26a
MIXc	0,31b	0,33bc	0,32c	0,30a	0,30b	0,30b
<i>F-anova</i>	25***	12,7**	21***	<i>ns</i>	9,0**	36***

En los resultados obtenidos, también encontramos ligeras diferencias en la supervivencia de EF según el factor tipo de plástico (LDPE o MIXb). Como puede verse en la figura 19, la presencia de LDPE el medio condujo a una ligera afección en la supervivencia de EF, aunque sin diferencia estadística en comparación con el tratamiento control después de 360 horas de exposición. En el tratamiento MIXb se observó una mejora en la tasa de supervivencia al final del bioensayo.

En estudios previos realizados dentro del marco del proyecto RECOVER la respuesta de las lombrices de tierra al material plástico (sin inoculación) en la misma concentración testada en este ensayo (1,25%), produjo una variación de supervivencia media de -12,3 % por exposición a LDPE y -19,2 % por exposición al MIXb AWP, lo cual parece indicar que la inoculación del PMC seleccionado es capaz de paliar los efectos negativos sobre la supervivencia producidos por la presencia de plásticos AWP, fortificando a EF para resistir estos ambientes.

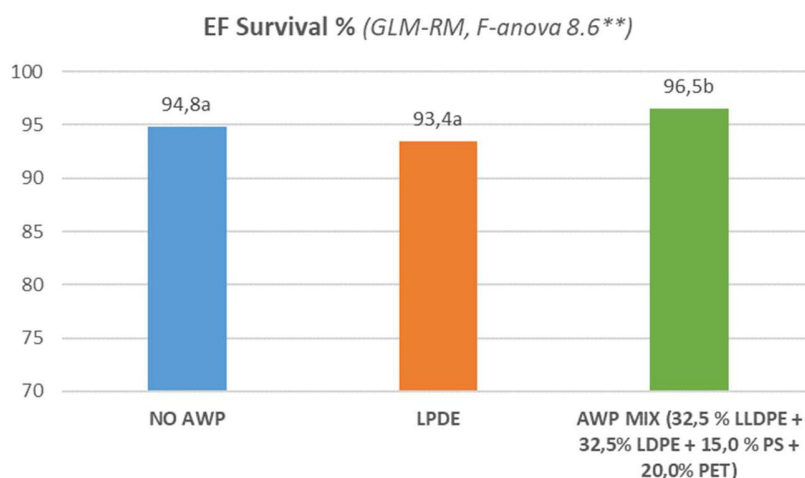


Figura 19. Supervivencia de EF (%) dependiendo de la presencia y tipo de AWP.

Con respecto al peso corporal promedio medido (figura 20) en todas las réplicas de cada tratamiento, el tratamiento con LDPE pudo mantener una mejora similar en el peso corporal de *E. fetida* que el tratamiento CONTROL. En el tratamiento MIXb, el valor medio obtenido en la variación del peso corporal (29,3 %) fue estadísticamente superior al tratamiento CONTROL. Este comportamiento observado contrasta con la evaluación de respuesta de las lombrices al material AWP realizada en ensayos previos (Sin inoculación), donde se observó una reducción de peso por exposición a la mezcla de LDPE y AWP (-3.8 y -6.6 %, respectivamente), debido a la afección provocada por estos materiales plásticos en la capacidad degradativa de las lombrices de tierra y el consiguiente empeoramiento en su capacidad de alimentarse.

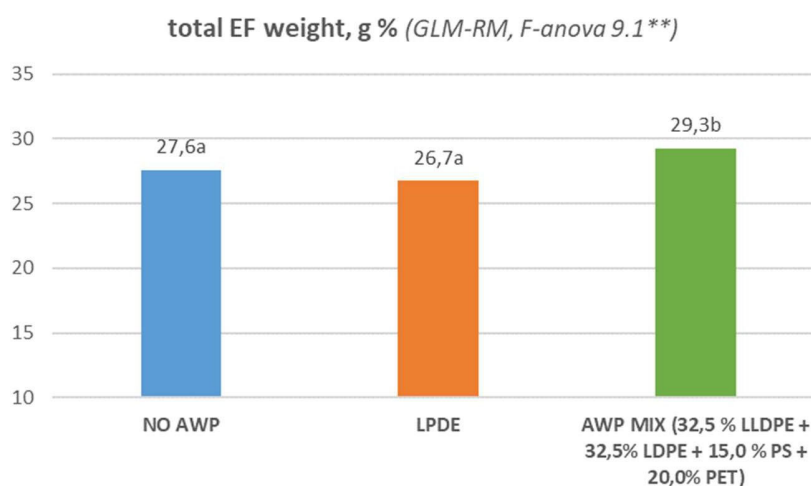


Figura 20. Peso total de EF (%) dependiendo de la presencia y tipo de AWP.

Tabla 15: Efectos en la supervivencia (%) y el peso (g) de EF dependiendo de la presencia y tipo de AWP. Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM.

Presencia de plástico/tipo	Supervivencia %		Peso total EF (g)		g/espécimen EF	
NO AWP	94,8	a	27,6	a	0,29	ab
LPDE	93,4	a	26,7	a	0,29	a
MIXb *	96,5	b	29,3	b	0,30	b
<b>F-anova</b>	<b>8,63</b>	<b>**</b>	<b>9,2</b>	<b>**</b>	<b>4,4</b>	<b>*</b>

\*(32.5 % LLDPE + 32.5% LDPE + 15.0 % PS + 20.0% PET)

#### 4.3 Daños en los tejidos de *Eisenia fetida*

Tabla 16. Biomarcadores medidos en el tejido de la lombriz y en el vermicompost.

Actividad Enzimática	Acrónimo	Unidades
Deshidrogenasa	DHE	$\mu\text{mol INTF h}^{-1} \text{g sustrato}^{-1}$
Carboxilesterasa	CbE	$\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$
Catalasa	CAT	$\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos h}^{-1} \text{g sustrato}^{-1}$
Glutation reductasa	GSH	$\text{nmol mg proteina}^{-1}$
Glutación oxidado	GSGG	$\text{nmol mg proteina}^{-1}$
Peroxidación lipídica	PerLip	$\mu\text{g MDA mg proteina}^{-1}$
Acetilcolinesterasa	AChe	$\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$

Para identificar y evaluar el estrés oxidativo inducido por los consorcios microbianos sobre EF se utilizan una serie de biomarcadores (tabla 16) relacionados con daños en el tejido de las mismas. Entre estos biomarcadores destaca la actividad de la peroxidación lipídica (PerLip) del tejido de la lombriz en presencia de consorcios (figura 21). Se observaron efectos estadísticos significativos entre el tratamiento MIXc, EXO y CONTROL, mostrando un efecto sinérgico negativo muy consistente en el tratamiento mixto, con un aumento de la actividad de PerLip de más del 20% respecto al control. El tratamiento EXO también muestra un aumento significativo respecto a CONTROL de la actividad PerLip. No se detectaron diferencias entre los tratamientos CONTROL y ENDO. Por tanto, se puede deducir la existencia de un efecto negativo sobre los tejidos de EF en condiciones de vermicompostaje con presencia de consorcios microbianos mixtos (MIXc) y exógeno (EXO).



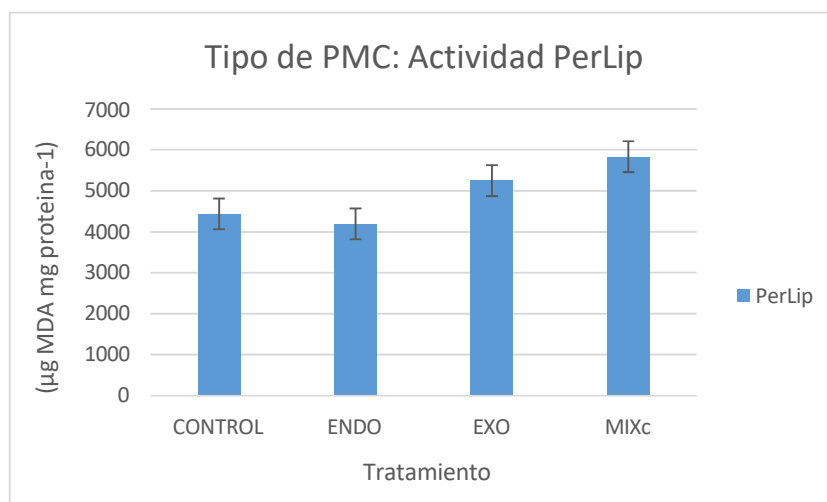


Figura 21. Actividad de la peroxidación lipídica según el tipo de consorcio inoculado (PMC).

Respecto a la actividad PerLip (figura 22) en condiciones de vermicompostaje con presencia de residuos plásticos agrícolas (AWP), el tratamiento con LDPE pudo reducir dicha actividad significativamente en los tejidos de EF con respecto al CONTROL. El tratamiento MIXb, fue estadísticamente superior al tratamiento CONTROL. Por tanto, se puede deducir la existencia de un efecto negativo sobre los tejidos de EF en condiciones de vermicompostaje con mix de AWP (MIXc) y un efecto amortiguador del daño sobre los tejidos ante la presencia de LDPE. Algunos estudios han demostrado que la exposición de *E. fetida* a MP (HDPE, PP y LDPE) de tamaño inferior a 300 µm (Chen et al.,2020; Jiang et al.,2020) provoca procesos inflamatorios entre el epitelio intestinal y el tejido clorogénico, a veces con el desarrollo de fibrosis y congestión (Rodríguez-Seijo., 2017).

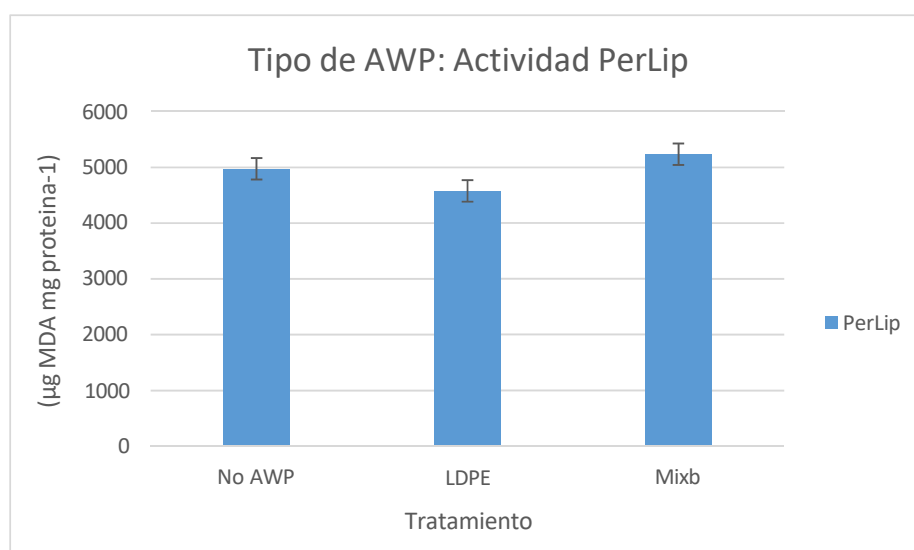


Figura 22. Actividad de la peroxidación lipídica según el tipo de AWP.

La carboxilesterasa es una enzima esterasa que desempeña un papel clave en el proceso metabólico de desintoxicación. Se considera un mecanismo de protección eficaz para la resistencia a los xenobióticos en *Eisenia fetida*. Como se muestra en la Tabla 17, se observó un ligero descenso (significante) de la actividad de la CbE tras exposición al MIXb, mientras LDPE se mantenía en valores similares al tratamiento Control. Estudios anteriores sugieren que el contenido luminal de las lombrices es la principal fuente de CbE, que se libera desde el epitelio del intestino (Sánchez-Hernández y col., 2009). Debido al tamaño y forma de los plásticos testados en este estudio, y en vista de los resultados obtenidos, no es posible que las lombrices ingirieran alguna partícula del material plástico. Lackman y col., 2022 en el estudio de CbE, reportaba que los valores en tejido de EF no se vio afectado significativamente por la exposición a microplásticos (poliestireno-HBCD) en el suelo durante 28 días. En el estudio de Chen y col., 2020 investigaron diferentes tipos de microplásticos y reportaron que el modo de acción y la respuesta en tejido de CbE variaba en función del tipo de plástico, pero también de la forma, el tamaño y la posible influencia de los aditivos. Para la variable tipo de consorcio, el contenido en CbE muestra ligeras diferencias estadísticas, aunque el mecanismo de acción entre Lombriz y consorcio no parece muy claro. Siendo necesarios más estudios para profundizar en la relación CbE-AWP-Inóculo.

En los resultados obtenidos, también encontramos diferencias significativas en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en los tejidos de *Eisenia fetida* según el factor tipo de consorcio microbiano utilizado. Como puede verse en la figura 23, la presencia de los inóculos EXO, ENDO y MIXc condujo a una ligera disminución en la actividad de AChE en EF respecto a CONTROL, siendo quien presenta diferencias más significativas el tratamiento EXO.

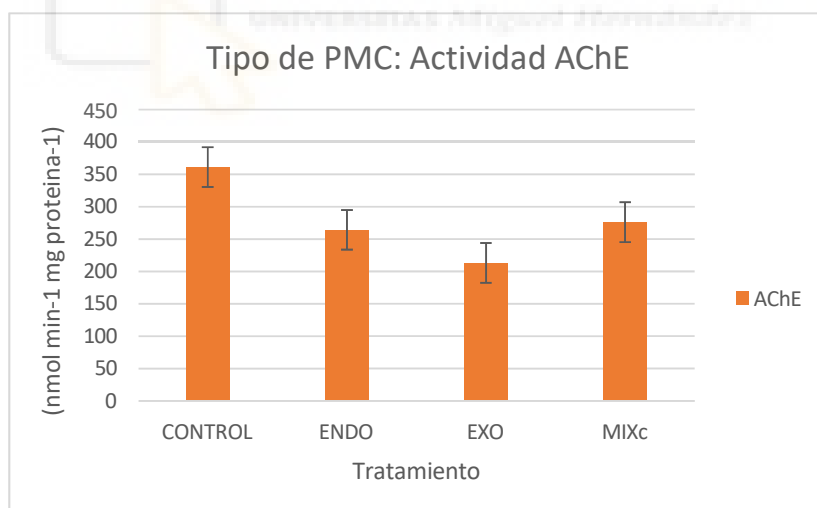


Figura 23. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa según el tipo de consorcio inoculado (PMC).

Respecto a la actividad AChE (figura 24) en condiciones de vermicompostaje con presencia de residuos plásticos agrícolas (AWP), el tratamiento con LDPE y MIXb pudo aumentar dicha actividad significativamente en los tejidos de EF con respecto al CONTROL. El tratamiento MIXb, fue estadísticamente superior al tratamiento CONTROL. Por tanto, se puede deducir la existencia de un incremento significativo en la actividad de AChE en EF ante la presencia de AWP, siendo más notorio

el efecto de MIX respecto al tratamiento LDPE sobre el CONTROL. De acuerdo con nuestros resultados, *Chen y col., 2020* informaron de un aumento de la AChE en *Eisenia fetida* expuesta 21 y 28 días a 1,0-1,5 g/kg de LDPE en el suelo, mientras que *Yu y col., 2018* mostraron que la actividad de la AChE fue inhibida en el tejido intestinal de *Eriocheir sinensis* y *Pomatochistas microps* expuestos a microplásticos de PS y PE, respectivamente.

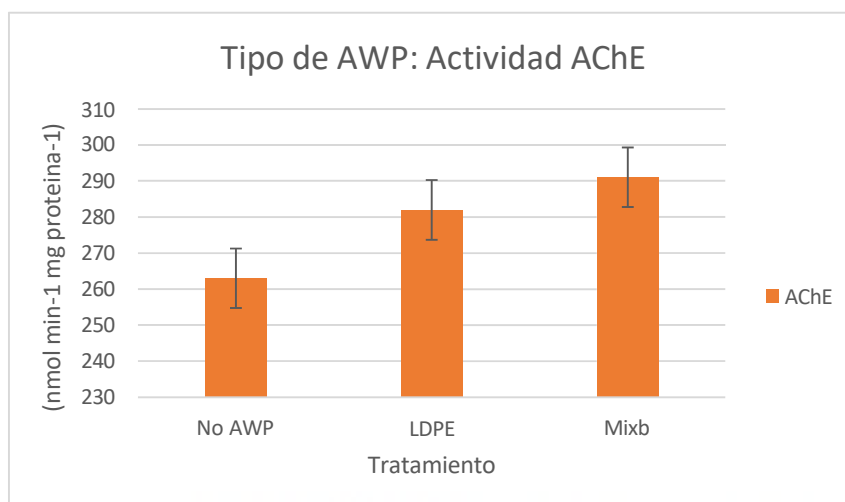


Figura 24. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa según el tipo de AWP.

#### 4.4 Estrés oxidativo en *Eisenia fetida*

Para identificar el estrés oxidativo que puede sufrir la lombriz *Eisenia fetida*, se utilizan una serie de biomarcadores (*tabla 16*). En los resultados obtenidos, también encontramos diferencias significativas en la actividad GSH y GSGG en el tejido de EF según el factor tipo de consorcio inoculado. Como puede verse en la figura 25, se observaron efectos estadísticos significativos entre el tratamiento MIXc, EXO y CONTROL, mostrando un efecto sinérgico muy consistente en el tratamiento mixto, con un aumento de la actividad de GSH y GSGG de más del 30% respecto al control. El tratamiento EXO también muestra un aumento significativo respecto a CONTROL de la actividad PerLip. Por tanto, se puede deducir la existencia de un efecto negativo en el estrés oxidativo de EF en condiciones de vermicompostaje con mix de PMC (MIXc) al aumentar la actividad GSGG. Sin embargo, este efecto negativo es mitigado por el aumento de la actividad GSH.

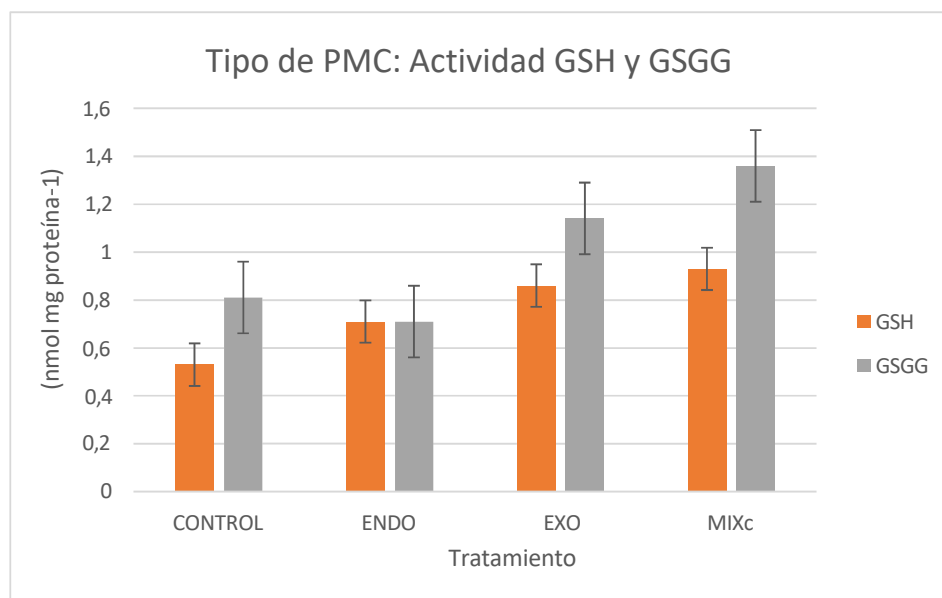


Figura 25. Actividad de GSH y GSGG según el tipo de consorcio inoculado.

Respecto a la actividad GSH y GSGG (*figura 26*) en condiciones de vermicompostaje con presencia de residuos plásticos agrícolas (AWP), el tratamiento con MIXb pudo aumentar dicha actividad significativamente en los tejidos de EF con respecto al CONTROL. El tratamiento MIXb, fue estadísticamente superior al tratamiento CONTROL. Por tanto, se puede deducir la existencia de algún efecto de los AWP ante el incremento significativo en la actividad de GSH y GSGG de EF en presencia de AWP de distinta naturaleza.

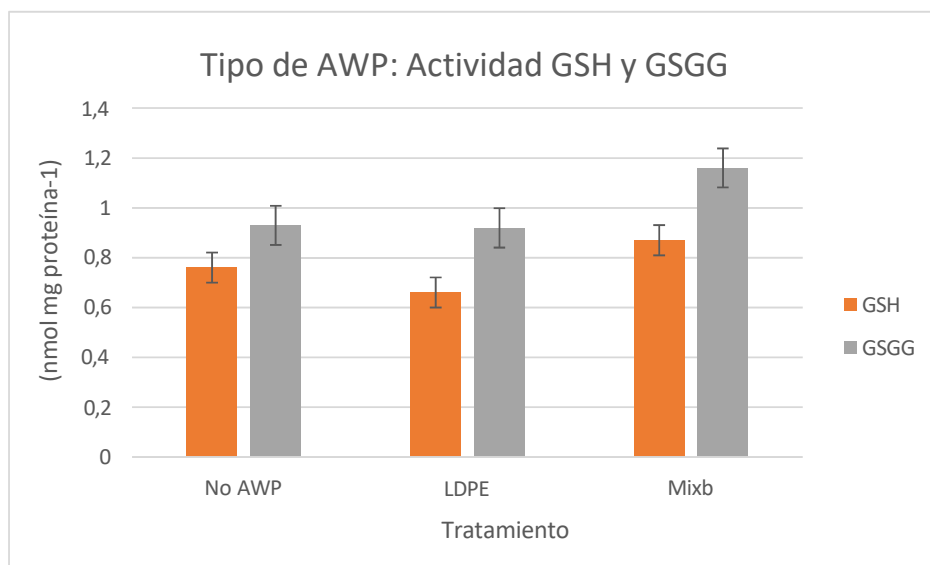


Figura 26. Actividad de la enzima GSH y GSGG según el tipo de AWP

Tabla 17. Efectos en las actividades enzimáticas (biomarcadores) del tejido de EF dependiendo del inóculo de PMC, la presencia y tipo de AWP. Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM.

	CbE	GSH	GSGG	PerLip	AcHe
<b>Tipo de AWP</b>					
No AWP	504 b	0.76 b	0.93 a	4972 ab	263
LDPE	494 b	0.66 a	0.92 a	4574 a	282
MIXb	446 a	0.87 c	1.16 b	5234 b	291
F-anova	4.6*	20.8***	29.1***	5.5*	ns
<b>Tipo de PMC</b>					
No PMC	487 ab	0.53 a	0.81 b	4434 a	361 c
ENDO	516 b	0.71 b	0.71 a	4192 a	264 b
EXO	478 ab	0.86 c	1.14 c	5250 b	213 a
MIXc	444 a	0.93 c	1.36 d	5831 c	276 b
F-anova	3.3*	44.8***	109.0***	21.2***	42.2***
<b>Significancia estadística</b>					
Tipo de AWP	*	***	***	*	ns
Tipo de PMC	*	***	***	***	***
AWP X PMC	6.5***	22.1***	57.4***	16.1***	ns

Para evaluar el vermicompost, se miden los principales parámetros fisicoquímicos, la presencia de compuestos húmicos y la evolución de las actividades enzimáticas.

#### 4.5 Actividades enzimáticas en el vermicompost

En los resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas del vermicompost (*tabla 18*), encontramos diferencias significativas en la actividad de la enzima deshidrogenasa (DHE) según el factor tipo de consorcio microbiano al transcurrir 360 horas. Como puede verse en la figura 27, la presencia del inóculo ENDO condujo a un ligero aumento en la actividad de DHE en el vermicompost respecto a CONTROL, siendo este el único tratamiento que presenta diferencias significativas. Este aumento de la actividad de la enzima DHE con el inóculo ENDO podría deberse a una mayor presencia de sustancias orgánicas disponibles, con el consecuente aumento de la actividad microbiana en el medio.

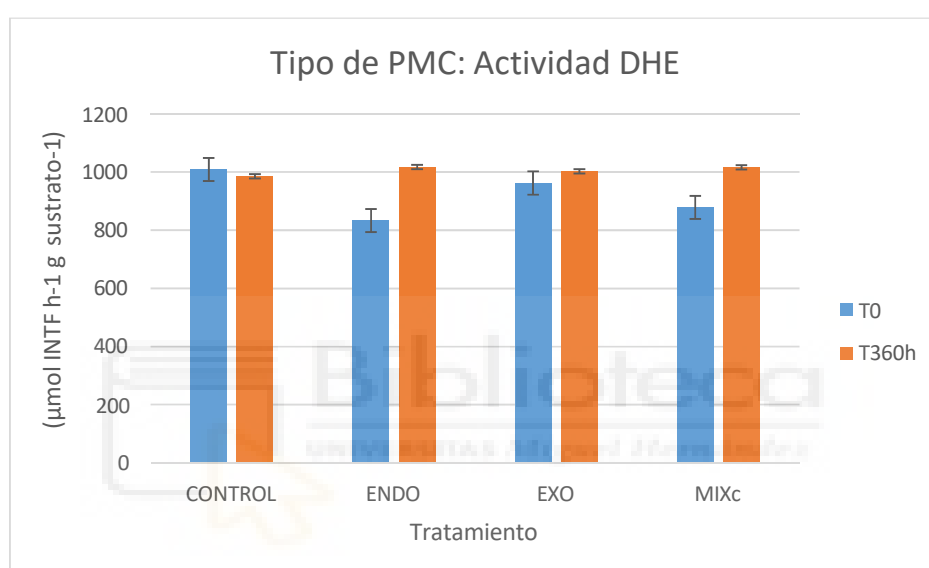


Figura 27. Actividad deshidrogenasa (DHE) según el tipo de consorcio inoculado.

De los resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas del vermicompost (*tabla 18*), también encontramos diferencias significativas en la actividad de la enzima catalasa (CAT) según el factor tipo de consorcio microbiano al transcurrir 360 horas. Como puede verse en la figura 28, la presencia del inóculo EXO condujo a un significativo descenso de la actividad de CAT en el vermicompost respecto a CONTROL, siendo este el único tratamiento que presenta diferencias significativas. Este descenso podría estar asociado con una menor interacción efectiva entre el microorganismo EXO inoculado y la actividad degradativa en el intestino de las lombrices de tierra.

Según el tipo de residuo plástico agrícola inoculado (AWP) podemos observar variaciones en las diferentes actividades enzimáticas en el vermicompost respecto T=360 horas. En el caso de la actividad deshidrogenasa (DHE) se observa un aumento de dicha actividad para el tratamiento MIXb respecto al control (No AWP). Esta enzima es un indicador de la actividad microbiana, ya que está relacionada con los procesos microbianos en el suelo e indica la tasa de oxidación de la materia orgánica en el sustrato (*figura 29*).

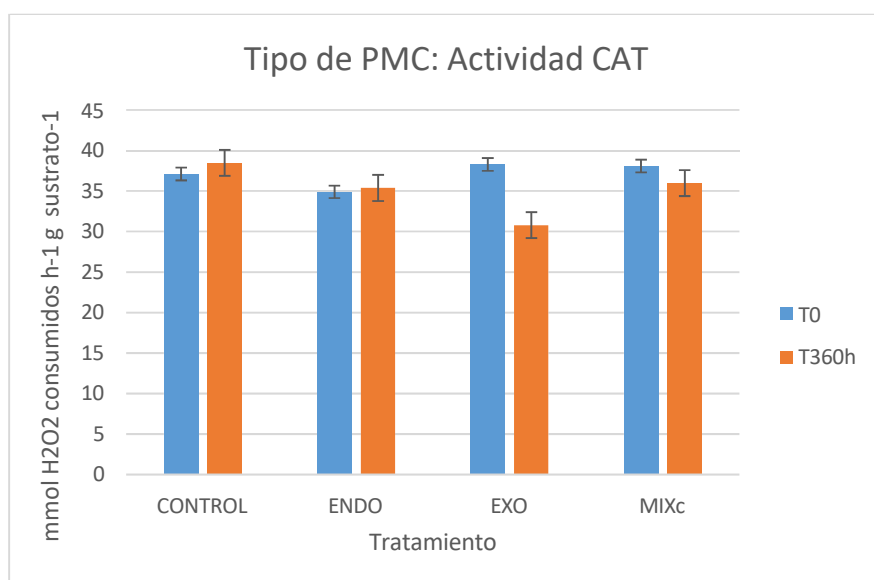


Figura 28. Actividad catalasa (CAT) según el tipo de consorcio inoculado.

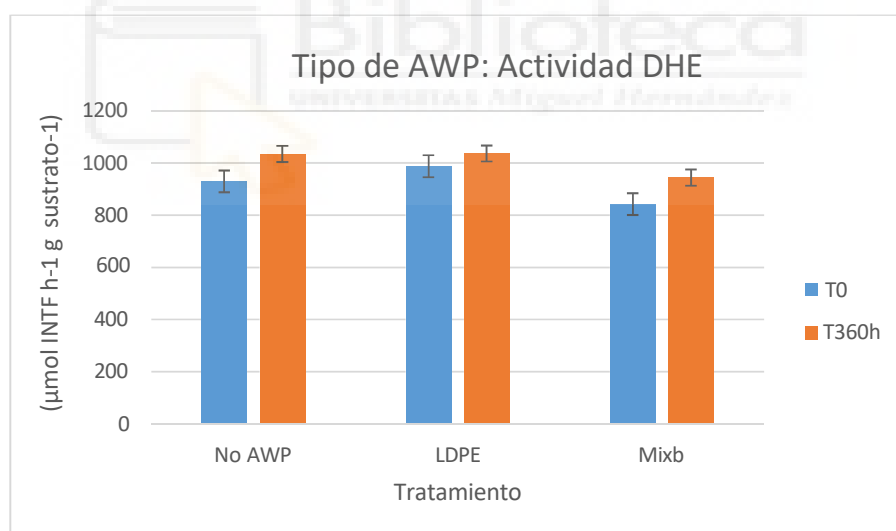


Figura 29. Actividad deshidrogenasa (DHE) según el tipo de AWP.

En el caso de la actividad enzimática catalasa (CAT) se observa un descenso de dicha actividad en los tratamientos, LDPE y MIXb respecto al control (No AWP), siendo el el tratamiento MIXb quien presenta menor variación respecto al T=0 (ENDO+EXO). Esta enzima perteneciente a las enzimas oxidoreductoras del peróxido de hidrogeno, está relacionada con la detoxificación participando como barrera fisiológica de radicales libres (figura 30). Un estudio previo (Serrano-García y col., 2016) sobre vermicompostaje de lodos de depuradora reportaba una inhibición significativa de la

actividad catalasa en tratamientos con alto contenido en metales pesados. En otros estudios sobre contaminantes del suelo; *Sánchez-Hernández et al., 2017* encontraban una clara inhibición de la actividad catalasa en suelos tratados con pesticidas (clorpirifos), sugiriendo que la respuesta estaba asociada a un cambio en la actividad microbiana.

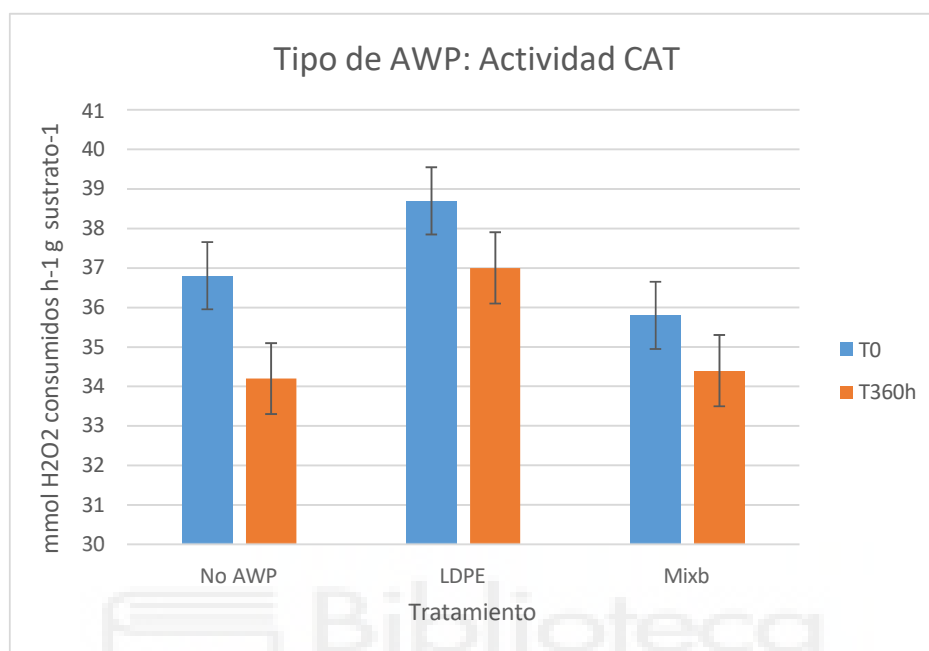


Figura 30. Actividad catalasa (CAT) según el tipo de AWP.

Tabla 18. Efectos en las actividades enzimáticas del vermicompost dependiendo del inóculo de PMC, la presencia y tipo de AWP. Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM

	CbE		CAT		DHE	
	T0	T30d	T0	T30d	T0	T30d
<b>Tipo de AWP</b>						
No AWP	219 a	164	36.8 a	34.2 a	930 b	1035 b
LDPE	247 b	166	38.7 b	37.0 b	988 c	1037 b
MIXb	220 a	163	35.8 a	34.4 a	843 a	944 a
F-anova	4.6*	ns	12.4***	5.9**	18.9***	11.3***
<b>Tipo de PMC</b>						
No PMC	282 b	152 a	37.1 b	38.5 c	1009 b	985
ENDO	199 a	167 b	34.9 a	35.4 b	833 a	1017
EXO	204 a	170 b	38.3 b	30.8 a	962 b	1002
MIXc	229 a	168 b	38.1 b	36.0 bc	878 a	1016
F-anova	20.2***	4.0*	11.2***	18.0***	17.0***	ns
<b>Significancia estadística</b>						
Tipo de AWP	*	ns	***	**	***	***
Tipo de PMC	***	*	***	***	***	ns
AWP X PMC	6.8***	6.4***	11.9***	9.5***	14.0***	6.9***



#### 4.6 Principales parámetros fisicoquímicos en el vermicompost

Los datos obtenidos en la determinación de los principales parámetros fisicoquímicos obtenidos en los vermicompost inoculados con PMC y AWP se muestra en la tabla 19 y tabla 20. Respecto al pH, se observó un pequeño descenso durante las 360 h del ensayo en todos los tratamientos. Los valores de pH al final del bioensayo se mantuvieron en un rango adecuado para la actividad de lombrices y el crecimiento de microorganismos (5,5-8,5) (Yadav et al., 2011) en todos los tratamientos. Con respecto a los parámetros que podrían informar sobre el correcto proceso de degradación de las lombrices, tanto el contenido en MOT, TOC y ratio C/N muestran ligeras diferencias significativas, mostrando el tratamiento con MIXb los valores más altos de TOC y ratio C/N y valores de MOT cercanos al tratamiento LDPE, pero en todos los casos las diferencias respecto al tratamiento CONTROL son bajas.

Si observamos los resultados de EC, el valor del mismo, aumenta considerablemente tanto en los tratamientos con presencia de plástico como en el tratamiento CONTROL. El aumento de la CE durante el proceso de vermicompostaje ha sido reportado por otros autores (Khali y Sanaa, 2009; Fernández-Gómez et al., 2010). La razón del aumento de la CE en el tratamiento con lombrices podría deberse a la mayor mineralización de la materia orgánica, que liberó iones nutrientes y sales solubles (Huang et al., 2017). En cuanto al contenido de nutrientes de los vermicompost obtenidos, la variación del contenido NPK es ligeramente significativa, especialmente con la aplicación de ENDO y EXO al medio. No se muestran grandes diferencias por la presencia de plástico, pareciendo no afectar este al contenido nutricional del vermicompost obtenido.

Con respecto al contenido en metales pesados al final del ensayo, como podemos observar en los resultados de la tabla 20, no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos, no viéndose este contenido afectado por la aplicación de los diferentes inóculos testados, ni por exposición a los diferentes tipos de plásticos utilizados, cumpliendo en todos los tratamientos durante la duración del experimento la clasificación como compost clase A (ver tabla 21).

Tabla 21. Límites de concentración de metales pesados para productos fertilizantes elaborados con materia prima de origen animal o vegetal. Fuente: Real Decreto 865/2010 sobre sustratos de cultivo.

Metal pesado	Límites de concentración		
	Sólidos: mg/kg de materia seca		
	Líquidos: mg/kg		
	Clase A	Clase B	Clase C
Cadmio	0,7	2	3
Cobre	70	300	400
Níquel	25	90	100
Plomo	45	150	200
Zinc	200	500	1.000
Mercurio	0,4	1,5	2,5
Cromo (total)	70	250	300
Cromo (VI) *	No detectable según método oficial	No detectable según método oficial	No detectable según método oficial

Clase A: Productos fertilizantes cuyo contenido en metales pesados no superan ninguno de ellos los valores de la columna A.

Clase B: Productos fertilizantes cuyo contenido en metales pesados no superan ninguno de ellos los valores de la columna B.

Clase C: Productos fertilizantes cuyo contenido en metales pesados no superan ninguno de ellos los valores de la columna C.

Tabla 19. Efectos en los principales parámetros fisicoquímicos del vermicompost dependiendo del inóculo de PMC, la presencia y tipo de AWP. Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM.

	pH		EC (dS m <sup>-1</sup> )		C/N		NT (%)		P (%)		K (%)		MOT (%)		COT (%)	
	T0	T360h	T0	T360h	T0	T360h	T0	T360h	T0	T360h	T0	T360h	T0	T360h	T0	T360h
	Tipo de AWP															
No AWP	8.71	8.06	2.26	4.28	12.2	11.6 a	2.02	1.97	0.53	0.53 c	0.95	0.88 b	38.5 a	37.2 a	24.7	22.9 a
LDPE	8.73	8.01	2.30	4.39	12.2	12.4 b	1.99	1.95	0.54	0.47 a	0.97	0.83 a	41.8 b	38.8 c	24.3	24.2 b
MIXb	8.87	8.04	2.23	4.39	12.2	12.6 b	2.01	1.99	0.55	0.50 b	0.99	0.86 ab	42.1 b	38.3 b	24.5	25.0 c
<i>F-anova</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	10.3***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	12.0***	<i>ns</i>	4.41*	30.4***	66.2***	<i>ns</i>	25.7***
Tipo de PMC																
No PMC	8.85 b	8.02	2.28 b	4.25	12.2	11.9	1.99 a	1.95	0.49 a	0.47 a	0.89 a	0.80 a	43.0 b	38.9 c	24.3 a	23.2 a
ENDO	8.93 b	8.02	2.33 b	4.37	12.2	12.5	1.96 a	2.01	0.54 ab	0.53 b	0.98 ab	0.92 b	40.9 a	39.3 d	24.0 a	25.0 c
EXO	8.53 a	8.05	2.14 a	4.39	12.2	12.4	1.99 a	1.95	0.59 b	0.52 b	1.05 b	0.90 b	39.7 a	37.7 b	24.3 a	24.3 bc
MIXc	8.76 ab	8.05	2.29 b	4.41	12.1	12.0	2.09 b	1.97	0.54 ab	0.49 a	0.96 ab	0.82 a	39.6 a	36.4 a	25.3 b	23.6 ab
<i>F-anova</i>	4.3*	<i>ns</i>	6.9**	<i>ns</i>	3.3*	<i>ns</i>	9.9***	<i>ns</i>	3.7*	9.5***	<i>ns</i>	17.0***	14.2***	128.8***	7.7***	11.5***
Significancia estadística																
Tipo de AWP	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>	*	***	***	<i>ns</i>	***
Tipo de PMC	*	<i>ns</i>	**	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>	*	***	<i>ns</i>	***	***	***	***	***
AWP X PMC	<i>ns</i>	*	*	***	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	***	<i>ns</i>	***

Tabla 20. Efectos en el contenido de metales del vermicompost dependiendo del inóculo de PMC, la presencia y tipo de AWP. Análisis estadístico de medidas repetidas de GLM.

	Fe		Cu		Zn		Cd		Cr		Ni		Pb	
	(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )	
	T0	T30d	T0	T30d	T0	T30d	T0	T30d	T0	T30d	T0	T30d	T0	T30d
<b>Tipo de AWP</b>														
No AWP	5250 a	5463 b	40.4	36.1 b	147	158 b	0.31	0.30 c	20.1	17.1	7.15	6.39	10.5	10.6
LDPE	5369 ab	5164 a	41.1	34.4 a	152	148 a	0.32	0.27 a	20.5	17.2	7.24	6.41	10.2	9.94
MIXb	5490 b	5327 ab	41.6	34.6 a	149	151 a	0.32	0.28 b	20.8	16.6	7.42	6.31	11.0	10.8
<i>F-anova</i>	3.5*	3.5*	ns	5.8**	ns	10.0***	ns	13.3***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Tipo de PMC</b>														
No PMC	5436 b	4842 a	37.3 a	32.4 a	139	140 a	0.29 a	0.26 a	18.5 a	16.0 a	7.34	6.27 a	9.08 a	9.03 a
ENDO	5502 b	5486 b	41.2 ab	36.9 c	141 a	160 c	0.32 ab	0.29 b	20.5 ab	16.6 a	7.05	6.29 a	11.2 b	11.1 b
EXO	5435 b	5786 b	44.4 b	36.2 c	154 b	162 c	0.34 b	0.30 b	22.2 b	19.4 b	7.41	7.08 b	10.8 b	10.5 b
MIXc	5105 a	5158 a	41.13 ab	34.5 b	163 b	147 b	0.32ab	0.28 b	20.5 ab	15.9 a	7.27	5.86 a	11.2 b	11.2 b
<i>F-anova</i>	5.8**	19.4***	3.3*	20.2***	11.5***	27.9***	ns	12.5***	3.3*	13.2***	ns	15.3***	8.9***	8.7***
<b>Significancia estadística</b>														
Tipo de AWP	*	*	ns	**	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tipo de PMC	**	***	*	***	***	***	ns	***	*	***	ns	***	***	***
AWP X PMC	ns	***	ns	*	ns	*	ns	***	ns	**	ns	ns	***	***

## 5. Conclusiones

La inoculación con consorcios microbianos del medio en proceso de vermicompostaje con *Eisenia fetida* genera diversos efectos sobre las lombrices y el vermicompost. Estos efectos aumentan o disminuyen según el tipo de consorcio microbiano.

### Respuesta de *Eisenia fetida* a los tratamientos inoculados con consorcios microbianos (PMC):

- Las diferencias significativas en el promedio de la biomasa de cada espécimen y la supervivencia de *Eisenia fetida* entre los bioensayos con consorcios microbianos mixtos, procedente de consorcios microbianos con capacidad “probiótica” (ENDO) del interior del tracto digestivo y consorcios microbianos extraídos de ambientes contaminados con plásticos (EXO), pueden ser una evidencia de que la presencia de una mayor diversidad de microorganismos mejora la capacidad de alimentación de las lombrices.
- El aumento de la actividad GSH y GSGG, así como la inhibición parcial en la actividad AChE en la lombriz tras el tratamiento con el consorcio mixto en comparación con el control, podría ser un indicativo de una mayor producción de toxinas y antioxidantes naturales, resultado de una mayor actividad microbiana, lo que genera un estrés oxidativo en la lombriz.

La exposición indirecta de la lombriz *Eisenia fetida* a los fragmentos de plástico en condiciones de vermicompostaje genera diversos efectos negativos. Estos efectos aumentan o disminuyen según el tipo de plástico y la proporción de fragmentos que se encuentren en el medio. La presencia de este tipo de compuestos xenobióticos activa varios mecanismos en el metabolismo de la lombriz en respuesta al daño sufrido en los tejidos y al estrés oxidativo.

### Respuesta de *Eisenia fetida* a los tratamientos con residuos plásticos agrícolas (AWP):

- Resulta llamativo el aumento significativo en el promedio de la biomasa de cada espécimen y la supervivencia de las lombrices a la exposición del mix de residuos plásticos agrícolas (MIXb) junto al mix de los consorcios microbianos respecto al control. Este podría ser un indicador de que los consorcios microbianos consiguen colonizar nichos microbianos en los residuos plásticos agrícolas y de ese modo aumentar la actividad y densidad microbiana, facilitando de este modo la alimentación de las lombrices. A la vez, la exposición a AWP en las concentraciones testadas (1,25%) parece inducir cierto estrés oxidativo como muestran el aumento de la actividad de peroxidación lipídica, relacionada con daños en los tejidos y el aumento de la AChE comúnmente relacionada con el impulso nervioso.

### Respuesta en el vermicompost a los tratamientos inoculados con consorcios microbianos (PMC):

- El aumento de la actividad de la enzima deshidrogenasa en el vermicompost tras el tratamiento con la microbiota endógena de la lombriz y mix de consorcios (ENDO + EXO) en comparación con el control, podría ser un indicativo de una mayor compatibilidad y actividad del inóculo con el microbioma de la lombriz.

- La disminución de la actividad de la enzima catalasa en el vermicompost tras el tratamiento con la microbiota exógena (EXO) procedente de ambientes contaminados con plástico en comparación con el control, podría ser un indicativo de menor compatibilidad del inóculo con el microbioma de la lombriz y por tanto una menor capacidad de actuar como barrera fisiológica de radicales libres procedentes de los compuestos xenobióticos.

#### **Respuesta en el vermicompost a los tratamientos con residuos plásticos agrícolas (AWP):**

- El aumento de la actividad de la enzima deshidrogenasa en el vermicompost tras la aplicación del mix de residuos plásticos agrícolas en comparación con el control, podría ser un indicativo de una mayor tasa de degradación de compuestos xenobióticos debido al aumento de la actividad microbiana.
- Una menor disminución de la actividad de la enzima catalasa en el vermicompost tras la aplicación del mix de residuos plásticos agrícolas en comparación con el control, podría ser un indicativo de una mayor capacidad para actuar como barrera fisiológica de radicales libres procedentes de los compuestos xenobióticos.
- Respecto a los parámetros fisicoquímicos del vermicompost tras la aplicación del mix de residuos plásticos agrícolas, el sustrato final no mostró variaciones en la clase de compost.
- La exposición de la lombriz al material plástico procedente de los residuos agrícolas (LDPE, LLPE, PET y PS) no parece afectar a la evolución del proceso de vermicompostaje.

A modo de conclusión general, la lombriz *Eisenia fetida* incrementa su actividad de detoxificación cuanto más biodiverso es el microbioma del tracto digestivo y las poblaciones de microorganismos presentes en el vermicompost. La lombriz *Eisenia fetida* sufre estrés oxidativo y daño en los tejidos por la exposición a los compuestos xenobióticos, sin embargo, no afecta a la supervivencia ni a la biomasa de cada individuo. El tamaño y estructura física de los micro y nanoplásticos facilita la colonización de los microorganismos para que ocurran procesos de degradación natural.

## **6. Bibliografía**

Jenkins, M.J., Harrison, K.L., 2008. The effect of crystalline morphology on the degradation of polycaprolactone in a solution of phosphate buffer and lipase. *Polym. Adv. Technol.* 19 (12), 1901–1906.

Al-Salem S.M., Lettieri P., Baeyens J., 2009. Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review. *Waste Manag.* 29, 2625–2643.

Al-Salem, S.M., Bumajdad, A., Khan, A.R., Brajendra, K. Sharma, Chandrasekaran, S.R., Al-Turki, F.A., Jassem, F.H., Al-Dhafeeri, A.T., 2018. Non-isothermal degradation kinetics of virgin linear low density polyethylene (LLDPE) and biodegradable polymer blends. *J. Polym. Res.* 25, 111.

Matjašič, T., Simčič, T., Medvešček, N., Bajt, O., Dreo, T., Mori, N. 2021. Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review. *Science of the Total Environment*, 752: 141959.

Groh, K.J., Backhaus, T., Carney-Almroth, B., Geueke, B., Inostroza, P.A., Lennquist A., Leslie H.A., Maffini M., Slunge D., Trasande L., Warhurst A.M., Munck J., 2019. Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Sci. Total Environ.* 651, 3253–3268.

Velis, C.A., 2014. Global recycling markets - plastic waste: A story for one player – China., I.S.W. Association, Editor. *FUELogy* on behalf of ISWA. 27.

MIT, 2018. Scrap Plastic Trade. *The Observatory of Economic Complexity* 2016 13/11/2017]; Available from: <https://atlas.media.mit.edu/en/profile/hs92/3915/> in Schweitzer et al., 2018: Schweitzer J.-P., Gionfra S., Pantzar M., Mottershead D., Watkins E., Petsinaris F., ten Brink P., Ptak E., Lacey C. and Janssens C. Unwrapped: How throwaway plastic is failing to solve Europe's food waste problem (and what we need to do instead). Institute for European Environmental Policy (IEEP), Brussels. A study by Zero Waste Europe and Friends of the Earth Europe for the Rethink Plastic Alliance.

Schweitzer J.-P., Gionfra S., Pantzar M., Mottershead D., Watkins E., Petsinaris F., ten Brink P., Ptak E., Lacey C. and Janssens C., 2018. Unwrapped: How throwaway plastic is failing to solve Europe's food waste problem (and what we need to do instead). Institute for European Environmental Policy (IEEP), Brussels. A study by Zero Waste Europe and Friends of the Earth Europe for the Rethink Plastic Alliance.

Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J.H., Abu-Omar, M., Scott, S.L., Suh, S., 2020. Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8, 3494–3511.

Webb, H., Arnott, J., Crawford, R., Ivanova, E., 2013. Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly(ethylene terephthalate). *Polymers* 5 (1), 1–18.

Wang, W., Ge, J., Yu, X., Li, H., 2020. Environmental fate and impacts of microplastics in soil ecosystems: Progress and perspective. *Sci. Total Environ.* 708, 134841.

Chen, Y., Liu, X., Leng, Y., Wang, J., 2020. Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 187, 109788, ISSN 0147-6513.

- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605.
- Pham, T. H., Do, H. T., Phan Thi, L. A., Singh, P., Raizada, P., Chi-Sheng Wu, J., Nguyen, V. H., 2021. Global challenges in microplastics: From fundamental understanding to advanced degradations toward sustainable strategies. *Chemosphere*, 267: 129275.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W. -M., Zhao, J., & Jiang, L., 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science & Technology*, 48: 13776-13784.
- Yang, P., van Elsas, J. D., 2018. Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. *Applied Soil Ecology*, 129, 112-120.
- Yang, S. S., Ding, M. Q., He, L., Zhang, C. H., Li, Q. X., Xing, D. F., Cao, G. L., Zhao, L., Ding, J., Ren, N. Q., & Wu, W.M., 2021. Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Science of the Total Environment*, 756, 144087.
- Yang, S. S., Wu, W. M. 2020. Biodegradation of Plastics in *Tenebrio* Genus (Mealworms). *The Handbook of Environmental Chemistry*, 385-422.
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W. -M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., Jiang, L. 2015. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. Role of gut microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 49: 12087-12093.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26: 246–265.
- Singh, B., Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 561–584.
- Markovičová, L., Zatkalíková, V., 2018. The effect of UV aging on structural polymers. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 465, 12004.
- Jiang, X., Chang, Y., Zhang, T., Qiao, Y., Klobucar, G., Li, M., 2020. Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environ. Pollut.* 259, 113896.
- Wu, G., H. Kang, X. Zhang, H. Shao, L. Chu and C. Ruan, 2010. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, 174: 1-8.
- Yang, S. S., Ding, M. Q., He, L., Zhang, C. H., Li, Q. X., Xing, D. F., Cao, G. L., Zhao, L., Ding, J., Ren, N. Q., & Wu, W.M., 2021. Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Science of the Total Environment*, 756, 144087.

Yu, M., van der Ploeg, M., Huerta Lwanga, E., Yang, X., Zhang, S., Ma, X., Ritsema, C. J., Geissen, V., 2019. Leaching of microplastics by preferential flow in earthworm (*Lumbricus terrestris*) burrows. *Environmental Chemistry*, 16, 31-40.

European Commission, 2019. The Environmental Implementation Review 2019. Country Report Spain. Brussels.

Selonen, S., Dolar, A., Kokalj, A. J., Skalar, T., Dolcet, L. P., Hurley, R., van Gestel, C. A. M., 2020. Exploring the impacts of plastics in soil – the effects of polyester textile fibers on soil invertebrates. *Science of the Total Environment*, 700, 134451.

Moslem Sharifinia, Zahra Afshari Bahmanbeigloo, Mehrzad Keshavarzifard, Mohammad Hossein Khanjani, Brett P. Lyons, 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*, Volume 204, 2020, 111109, ISSN 0147-6513,

Charlene Trestrail, Dayanthi Nugegoda, Jeff Shimeta, Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system, *Science of The Total Environment*, Volume 734, 2020, 138559, ISSN 0048-9697,

Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C. & Galloway, T. S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23, 1031-1033.

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605.

Edwards, C.A. and J.R. Lofty, 1977. *Biology of Earthworms*. 2nd Ed., Chapman and Hall, Boca Raton, London, pp: 1-261.

Reynolds, W.J., 1998. The Status of Earthworms Biogeography, Diversity and Taxonomy in North America Revisited with Glimpses into the Future. In: *Biology of Earthworms*. Edwards, A. C. (Ed). Chapman and Hall, Boca Raton, London, pp: 15-64.

Ladygina, N. and Rineau, F. (2013). *Biochar and soil biota*. (1<sup>st</sup> edition) CRC Press: USA

J. Lipiec, M. Frąc, M. Brzezińska, M. Turski, K. Oszust, Linking microbial enzymatic activities and functional diversity of soil around earthworm burrows and casts, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 662–669.

D.T.T. Hoang, J. Pausch, B.S. Razavi, I. Kuzyakova, C.C. Banfield, Y. Kuzyakov, Hotspots of microbial activity induced by earthworm burrows, old root channels, and their combination in subsoil, *Biol. Fert. Soils* 52 (2016) 1105–1119.

G.C. Brown, B.M. Doube, Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants, in: C.A. Edwards (Ed.), *Earthworm Ecology*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004, pp. 213–239.



D.T.T. Hoang, B.S. Razavi, Y. Kuzyakov, E. Blagodatskaya, Earthworm burrows: kinetics and spatial distribution of enzymes of C-, N- and P-cycles, *Soil Biol. Biochem.* 99 (2016) 94–103.

J.M. Steinweg, J.S. Dukes, E.A. Paul, M.D. Wallenstein, Microbial responses to multi-factor climate change: effects on soil enzymes, *Front. Microbiol.* 4 (2013) 146.

Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 195, 117–178.

von Mersi, W., Schinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazoliumchloride. *Biol. Fert. Soils* 11, 216–220.

Popova, I.E., Deng, S., 2010. A high-throughput microplate assay for simultaneous colorimetric quantification of multiple enzyme activities in soil. *Appl. Soil Ecology*.

Schinner, F., Kandeler, E., Ohlinger, R., Margesin, R., 1996. *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.

C.G. Jones, J.H. Lawton, M. Shachak, Organisms as ecosystem engineers, *Oikos* 69 (1994).

Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 195, 117–178.

Sanchez-Hernandez, J. C. (2018) Biochar activation with exoenzymes induced by earthworms: A novel functional strategy for soil quality promotion, *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.02.019.

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*. Elsevier Ltd, 157(1), pp. 264–272. doi: 10.1016/j.envpol.2008.06.041.

Augustenborg, C. A. et al. (2012) 'Biochar and Earthworm Effects on Soil Nitrous Oxide and Carbon Dioxide Emissions', pp. 1203–1209. doi: 10.2134/jeq2011.0119.

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016. Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environ. Sci. Technol.* 50, 2685–2691.

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016. Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environ. Sci. Technol.* 50, 2685–2691.

Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., Yu, F., 2020. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of the Total Environment*, 715, 136968.

Ali, S.S, Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E.A., Zhu, D., Sun, J., 2021. Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Science of The Total Environment*. 771, 144719.

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26: 246–265.

Oussama Bouaicha, Tanja Mimmo, Raphael Tiziani, Nadine Praeg, Carlo Polidori, Luigi Lucini, Gianpiero Vigani, Roberto Terzano, Juan C. Sanchez-Hernandez., 2022. Microplastics make their way into the soil and rhizosphere: A review of the ecological consequences, *Rhizosphere*, Volume 22.

Juan C. Sanchez-Hernandez, 2021. A toxicological perspective of plastic biodegradation by insect larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 248.

Zhenyan Lin, Tuo Jin, Tao Zou, Li Xu, Bin Xi, Dandan Xu, Jianwu He, Lizhi Xiong, Chongjian Tang, Jianwei Peng, Yaoyu Zhou, Jiangchi Fei, 2022. Current progress on plastic/microplastic degradation: Fact influences and mechanism, *Environmental Pollution*. Volume 304.

Sameh Samir Ali, Tamer Elsamahy, Eleni Koutra, Michael Kornaros, Mostafa El-Sheekh, Esraa A. Abdelkarim, Daochen Zhu, Jianzhong Sun, 2021. Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal, *Science of The Total Environment*, Volume 771.

Patrick Lavelle, Sebastien Barot, Manuel Blouin, Thibaud Decaëns, Juan José Jimenez, Pascal Jouquet, 2007. *Earthworms as Key Actors in Self-Organized Soil Systems*, Editor(s): Kim Cuddington, James E. Byers, William G. Wilson, Alan Hastings, *Theoretical Ecology Series*, Academic Press.

Wiebke Mareile Heinze, Denise M. Mitrano, Elma Lahive, John Koestel, and Geert Cornelis, 2021. Nanoplastic Transport in Soil via Bioturbation by *Lumbricus terrestris*. *Environmental Science & Technology*.

Zahra Sobhani, Logeshwaran Panneerselvan, Cheng Fang, Ravi Naidu, Mallavarapu Megharaj. 2022. Chronic and transgenerational effects of polyethylene microplastics at environmentally relevant concentrations in earthworms, *Environmental Technology & Innovation*, Volume 25.

Syed Turab Raza, Jianping Wu, Eldon R. Rene, Zulfiqar Ali, Zhe Chen, 202. Reuse of agricultural wastes, manure, and biochar as an organic amendment: A review on its implications for vermicomposting technology, *Journal of Cleaner Production*, Volume 360.

Costanza Scopetani, David Chelazzi, Alessandra Cincinelli, Tania Martellini, Ville Leiniö, Jukka Pellinen, 2022. Hazardous contaminants in plastics contained in compost and agricultural soil, *Chemosphere*, Volume 293.

Juan C. Sanchez-Hernandez, Ximena Andrade Cares, Jorge Domínguez, 2019. Exploring the potential enzymatic bioremediation of vermicompost through pesticide-detoxifying carboxylesterases, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 183.

Isaac Muise, Michelle Adams, Ray Côté, G.W. Price1 2016. Attitudes to the recovery and recycling of agricultural plastics waste: A case study of Nova Scotia, Canada, *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 109.

Sabino De Gisi, Giovanni Gadaleta, Giuliana Gorrasi, Francesco Paolo La Mantia, Michele Notarnicola, Andrea Sorrentino, 2022. The role of (bio)degradability on the management of petrochemical and bio-based plastic waste, *Journal of Environmental Management*, Volume 310.

Naying Li, Zhiyong Han, Nanfei Guo, Zhiqiang Zhou, Ying Liu, Qianggang Tang, 2022. Microplastics spatiotemporal distribution and plastic-degrading bacteria identification in the sanitary and non sanitary municipal solid waste landfills, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 438.

Sara Gallego, David Nos, Nicola Montemurro, Juan C. Sanchez-Hernandez, Sandra Pérez, Montserrat Solé, Fabrice Martin-Laurent, 2021. Ecotoxicological impact of the antihypertensive valsartan on earthworms, extracellular enzymes and soil bacterial communities, *Environmental Pollution*.

Arunachalam Thirunavukkarasu, Rajarathinam Nithya, Subbian Makesh Kumar, Venkatachalam Priyadharshini, Balakrishnan Prem Kumar, Paneerselvam Premnath, Raja Sivashankar, Arunachalam Bose Sathya, 2022. A business canvas model on vermicomposting process: Key insights onto technological and economical aspects, *Bioresource Technology Reports*, Volume 18.

Bläsing, M., & Amelung, W. (2018). Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science Of The Total Environment*, 612, 422-435.

Boots, B., Russell, C., & Green, D. (2019). Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *Environmental Science & Technology*, 53(19), 11496-11506.

de Souza Machado, A., Lau, C., Till, J., Kloas, W., Lehmann, A., Becker, R., & Rillig, M. (2018). Impacts of Microplastics on the Soil Biophysical Environment. *Environmental Science & Technology*, 52(17), 9656-9665.

Domínguez, J., Aira, M., Gómez-Brandón, M. (2010). Vermicomposting: earthworms enhances the work of microbes. In: Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (Eds), *Microbes at Work: From Wastes to Resources*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 93-114.

Dorigato, A., Pegoretti, A., Fambri, L., Lonardi, C., Slouf, M. and Kolarik, J., 2011. Linear low density polyethylene/cycloolefin copolymer blends. *Express Polymer Letters*, [online] 5(1), pp.23-37. Available at: <[http://www.expresspolymlett.com/articles/EPL-0001748\\_article.pdf](http://www.expresspolymlett.com/articles/EPL-0001748_article.pdf)>.

Fernández-Gómez, M., Romero, E., & Nogales, R. (2010). Feasibility of vermicomposting for vegetable greenhouse waste recycling. *Bioresource Technology*, 101(24), 9654-9660.

Gajst, T. (2016). Analysis of plastic residues in commercial compost. *Nov Goric Univ Nov Goric*.

García-Sánchez, M., Taušnerová, H., Hanč, A., & Tlustoš, P. (2017). Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: Changes in chemical and biological parameters. *Waste Management*, 62, 33-42.

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., & van der Ploeg, M. et al. (2016). Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental Science & Technology*, 50(5), 2685-2691.

Iñiguez, M., Conesa, J., & Fullana, A. (2017). Microplastics in Spanish Table Salt. *Scientific Reports*, 7(1).

Jiang, X., Chang, Y., Zhang, T., Qiao, Y., Klobučar, G., & Li, M. (2020). Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 259, 113896.

Ju, H., Zhu, D., & Qiao, M. (2019). Effects of polyethylene microplastics on the gut microbial community, reproduction and avoidance behaviors of the soil springtail, *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 247, 890-897.

Khalil, H., & Sanaa, S. (2022). Application of Sewage Sludge in Composting Technology for Eradication of Pathogenic Bacteria. *Australian Journal Of Basic And Applied Sciences*, 3. Kim, S., Kim, J., Lee, H., & Lee, H. (2021). Abundance and characteristics of microplastics in soils with different agricultural practices: Importance of sources with internal origin and environmental fate. *Journal Of Hazardous Materials*, 403, 123997.

Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., & Kyriacou, A. (2006). Quality assessment of composts in the Greek market: The need for standards and quality assurance. *Journal Of Environmental Management*, 80(1), 58-65.

Li, X., Chen, L., Mei, Q., Dong, B., Dai, X., Ding, G., & Zeng, E. (2018). Microplastics in sewage sludge from the wastewater treatment plants in China. *Water Research*, 142, 75-85.

Liu, M., Lu, S., Song, Y., Lei, L., Hu, J., & Lv, W. et al. (2018). Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. *Environmental Pollution*, 242, 855-862.

Long, Z., Pan, Z., Wang, W., Ren, J., Yu, X., & Lin, L. et al. (2019). Microplastic abundance, characteristics, and removal in wastewater treatment plants in a coastal city of China. *Water Research*, 155, 255-265.

Lou, Y., Ekaterina, P., Yang, S., Lu, B., Liu, B., & Ren, N. et al. (2020). Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome. *Environmental Science & Technology*, 54(5), 2821-2831.

Macci, C., Masciandaro, G. and Ceccanti, B., 2009. Vermicomposting of olive oil mill wastewaters. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*, [online] 28(8), pp.738-747.

Macci, C., Masciandaro, G., & Ceccanti, B. (2009). Vermicomposting of olive oil mill wastewaters. *Waste Management & Research: The Journal For A Sustainable Circular Economy*, 28(8), 738-747.

Malińska, K., Zabochnicka-Świątek, M., Cáceres, R., & Marfà, O. (2016). The effect of precomposted sewage sludge mixture amended with biochar on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* during laboratory vermicomposting. *Ecological Engineering*, 90, 35-41.

Nogales, R., Romero, E., Benítez, E. y Polo, A. (2002). Reciclaje de residuos orgánicos. En: Valladares, F. (ed). *Ciencias y Medio Ambiente*, CCMA-CSIC. Madrid, 115-124.

Nogales, Rogelio & Saavedra Fecci, Myriam & Benitez, E. (2008). Recycling of wet olive cake "alperujo" through treatment with fungi and subsequent vermicomposting. *Fresenius Environmental Bulletin*. 17. 1822-1827.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. *Oecd-ilibrary.org*. (2022). Retrieved 30 June 2022, from [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems\\_20745761](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761).

Ouni, Y., Lakhdar, A., Scelza, R., Scotti, R., Abdelly, C., Barhoumi, Z. and Rao, M., 2013. Effects of two composts and two grasses on microbial biomass and biological activity in a salt-affected soil. *Ecological Engineering*, [online] 60, pp.363-369.

Ouni, Y., Lakhdar, A., Scelza, R., Scotti, R., Abdelly, C., Barhoumi, Z., & Rao, M. (2013). Effects of two composts and two grasses on microbial biomass and biological activity in a salt-affected soil. *Ecological Engineering*, 60, 363-369.

Pathan, S., Arfaioli, P., Bardelli, T., Ceccherini, M., Nannipieri, P., & Pietramellara, G. (2020). Soil Pollution from Micro- and Nanoplastic Debris: A Hidden and Unknown Biohazard. *Sustainability*, 12(18), 7255.

Pérez-Godínez, E., Lagunes-Zarate, J., Corona-Hernández, J., & Barajas-Aceves, M. (2017). Growth and reproductive potential of *Eisenia foetida* (Sav) on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting. *Waste Management*, 64, 67-78.

Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003 (Text with EEA relevance). Document 32019R1009.

Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X. and Trinsoutrot-Gattin, I., 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, [online] 12(2), pp.257-273.

Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., & Trinsoutrot-Gattin, I. (2014). Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 12(2), 257-273.

- Rillig, M., & Lehmann, A. (2020). Microplastic in terrestrial ecosystems. *Science*, 368(6498), 1430-1431.
- Rochman, C., Hoh, E., Hentschel, B., & Kaye, S. (2013). Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology*, 130109073312009.
- Rodríguez-Seijo, A., da Costa, J., Rocha-Santos, T., Duarte, A., & 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., Santos, B., Ferreira da Silva, E., Cachada, A., & Pereira, R. (2019). Low-density polyethylene microplastics as a source and carriers of agrochemicals to soil and earthworms. *Environmental Chemistry*, 16(1), 8.
- Sánchez-Hernández, J., Sandoval, M., & Pierart, A. (2017). Short-term response of soil enzyme activities in a chlorpyrifos-treated mesocosm: Use of enzyme-based indexes. *Ecological Indicators*, 73, 525-535.
- Serrano-García, N., Vaca, R., Lugo, J., & Aguila, P. (2022). Effects of residual sludge and vermicompost organic residues on inorganic indicators and catalase. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 33, 173-179. Retrieved 1 July 2022, from
- Sharifinia, M., Bahmanbeigloo, Z., Keshavarzifard, M., Khanjani, M. and Lyons, B., 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, p.111109. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651320309489>> [Accessed 1 July 2022].
- Trestrail, C., Nugegoda, D. and Shimeta, J., 2020. Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Science of The Total Environment*, 734, p.138559.
- Wang, F., Wang, Q., Adams, C., Sun, Y., & Zhang, S. (2022). Effects of microplastics on soil properties: Current knowledge and future perspectives. *Journal Of Hazardous Materials*, 424, 127531.
- Weithmann, N., Möller, J., Löder, M., Piehl, S., Laforsch, C., & Freitag, R. (2018). Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. *Science Advances*, 4(4).
- Xu, G., & Yu, Y. (2021). Polystyrene microplastics impact the occurrence of antibiotic resistance genes in earthworms by size-dependent toxic effects. *Journal Of Hazardous Materials*, 416, 125847.
- Yadav, A., & Garg, V. (2011). Vermicomposting – An effective tool for the management of invasive weed *Parthenium hysterophorus*. *Bioresource Technology*, 102(10), 5891-5895.
- Yadav, K., Tare, V., & Ahammed, M. (2011). Vermicomposting of source-separated human faeces by *Eisenia fetida*: Effect of stocking density on feed consumption rate, growth characteristics and vermicompost production. *Waste Management*, 31(6), 1162-1168.

Yang, S. and Wu, W., 2020. Biodegradation of Plastics in Tenebrio Genus (Mealworms). The Handbook of Environmental Chemistry, [online] pp.385-422.

Zhou, Y., Liu, X., & Wang, J. (2020). Ecotoxicological effects of microplastics and cadmium on the earthworm *Eisenia foetida*. Journal Of Hazardous Materials, 392, 122273.

Zhu, B., Fang, Y., Zhu, D., Christie, P., Ke, X., & Zhu, Y. (2018). Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. Environmental Pollution, 239, 408.

