

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIAZINON SOBRE LA DIVERSIDAD
METABÓLICA Y COMUNIDADES MICROBIANAS EN LA BIOMEZCLA DE
LECHOS BIOLÓGICOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnología

GEOVANNA CRISTINA COFRÉ CERDA
TEMUCO-CHILE
2011

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIAZINON SOBRE LA DIVERSIDAD
METABÓLICA Y COMUNIDADES MICROBIANAS EN LA BIOMEZCLA DE
LECHOS BIOLÓGICOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Forestales de la Universidad
de La Frontera. Como parte de los requisitos
para optar al título de Biotecnología

GEOVANNA CRISTINA COFRÉ CERDA
PROFESOR GUÍA: GONZALO TORTELLA FUENTES

TEMUCO-CHILE

2011

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIAZINON SOBRE LA DIVERSIDAD
METABÓLICA Y COMUNIDADES MICROBIANAS EN LA BIOMEZCLA DE
LECHOS BIOLÓGICOS”**

PROFESOR GUIA

: GONZALO RODRIGO TORTELLA FUENTES
INGENIERO FORESTAL
DOCTOR EN CS. DE RECURSOS NATURALES
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESORES CONSEJEROS

: RODRIGO MELLA HERRERA
BIOQUÍMICO
DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

*A mi madre,
Marta Cerda Caamaño*

Agradecimientos

Al llegar a esta etapa de mi vida, debo primeramente agradecer a Dios y a mi familia, por ser mi aliento y fortaleza en cada momento. A mi madre Marta, por sus cuidados y apoyo incondicional; a mi hermano David por sus duros pero sabios consejos, a mis abuelos por la constante preocupación y cariño; y a mis primitas Sarita y María José, por esperarme los fines de semana.

Por la realización de mi tesis, debo agradecer a mi profesor guía, el Dr. Gonzalo Tortella, por lo aprendido durante el transcurso de esta actividad y por su paciencia. Al Dr. Rodrigo Mella por su ayuda y conocimientos entregados. Agradezco también al proyecto FONDECYT 11100236 por el financiamiento y recursos aportados para esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Carolina y Jorge por el apoyo, paciencia y buenos momentos, especialmente a Carolina, por su ayuda en los ensayos, por su amistad y sus sabios consejos.

Finalmente, agradezco a mis amigos Karina y Luis por el cariño, paciencia y apoyo en todo momento.

INDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Plaguicidas como fuente de contaminación en la agricultura	11
3.2 Lechos biológicos	12
3.1 Degradación de plaguicidas en lechos biológicos	14
3.2 Diazinón	16
3.3 Efecto de la aplicación de plaguicidas sobre actividades biológicas	18
3.3.1 Hidrólisis de la fluoresceína diacetato	18
3.3.2 Actividad ligninolítica	20
3.3.3 Evolución del Dióxido de Carbono	22
3.3.4 Actividad Fosfatasa	23
3.4 Efecto de la aplicación de plaguicidas sobre la diversidad metabólica y microbiana	25
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVO GENERAL	31
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Compuestos químicos	33
7.2 Suelo	33

7.3	Preparación del lecho biológico	33
7.4	Ensayo de degradación de diazinón	34
7.5	Actividades biológicas	34
7.6	Diazinón residual	36
7.7	Recuento de microorganismos cultivables y diversidad metabólica microbiana	37
7.8	Análisis de la comunidad microbiana de la biomezcla	38
7.9	Análisis estadístico	40
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
8.1	Actividades biológicas	41
8.1.1	Hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA)	41
8.1.2	Actividad ligninolítica	44
8.1.3	Actividad fosfatasa	46
8.1.4	Respiración microbiana.	48
8.2	Recuento de microorganismos cultivables	50
8.3	Degradación de Diazinón	52
8.4	Diversidad funcional microbiana	53
8.5	Perfiles del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPPs)	55
8.6	Análisis de la comunidad fúngica	62
9.	CONCLUSIONES	64
10.	LITERATURA CITADA	66
11.	ANEXOS	76

1. RESUMEN

Una de las principales fuentes de contaminación puntual es el uso de plaguicidas en la agricultura, especialmente en el llenado de equipos pulverizadores. En este contexto, en Europa se ha desarrollado un sistema para la retención y degradación de estos compuestos conocido como lechos biológicos. Estos lechos están constituidos por una mezcla compuesta por un soporte lignocelulósico, suelo y turba, creando un microcosmo que favorece la actividad microbiana y la degradación de los plaguicidas, constituyendo una buena alternativa para el tratamiento de estos compuestos.

En Chile, la utilización de este sistema es reciente por lo que pocos estudios a nivel microbiológico se han desarrollado en la biomezcla de estos lechos biológicos. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación sucesiva del plaguicida diazinón, sobre las actividades biológicas, la diversidad funcional microbiana y en la comunidad microbiana en la biomezcla de lechos biológicos. Para esto se utilizó un lecho compuesto por una mezcla de suelo, turba y paja en una relación de 25:25:50% vol, contaminada a una dosis de 40mg ia kg⁻¹ de diazinón y se evaluaron diferentes actividades biológicas (hidrólisis de la fluoresceína diacetato, actividad peroxidasa, fosfatasa y actividad respiratoria), durante 90 días. La degradación de diazinón fue monitoreada por cromatografía líquida (HPLC). La diversidad metabólica fue monitoreada a través de la utilización de sustratos mediante Biolog EcoPlate™. La diversidad microbiana fue evaluada mediante PCR-DGGE. Dada a la robustez del sistema de lechos biológicos, la aplicación de diazinón no afectó de manera significativa la actividad biológica. Se observaron cambios en la utilización de sustratos por parte de la comunidad microbiana y cambios en las estructuras de las comunidades fúngicas a través del tiempo tras la aplicación de diazinón.

1. SUMMARY

One of the main sources of pollution is the use of plaguicides in agriculture, especially in filling spray equipment. In this context, Europe has developed a system for retention and degradation of these compounds known as biobed. These beds are made of a mixture of a lignocellulosic medium, soil and peat, creating a microcosm that favors microbial activity and degradation of plaguicides, making it a good alternative for the treatment of these compounds.

In Chile, the use of this system is new, so few studies have been developed at microbiological level in the biomix on this biobed. Therefore, the overall of this work was to study the effect of successive applying of plaguicide diazinón, on biological activities and microbial functional diversity in the microbial community in biomix on biobed system. For this, a bed composed of a mixture of soil, peat and straw in a ratio of 25:25:50% vol, contaminated at a dose of 40 mg ia kg⁻¹ of diazinon was used. Different biological activities (hydrolysis of fluorescein diacetate, peroxidase activity, phosphatase and respiratory activity) were evaluated for 90 days. The degradation of diazinon was monitored by liquid chromatography (HPLC). The metabolic diversity was monitored through the use of substrates by Biolog EcoPlateTM. Microbial diversity was assessed by PCR-DGGE. Due to the robustness of biobed system, the application of diazinon did not affect significantly the biological activity. There were changes in substrate utilization by the microbial community and changes in the structure of fungal communities over time following application of diazinon.

2. INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos tales como los plaguicidas han resultado ser indispensables para la producción a gran escala en la agricultura moderna. Estos compuestos permiten el control de fitopatógenos y garantiza altos niveles de producción. Sin embargo, la mala manipulación de estos compuestos puede dar origen a la contaminación de suelos y aguas superficiales y subterráneas.

Los plaguicidas pueden contaminar los ecosistemas naturales (agua y suelo) por dos rutas principales, la primera, de tipo no puntual o contaminación difusa producida por la pulverización del plaguicida y la subsecuente escorrentía superficial o el arrastre del viento y la segunda, de tipo puntual, producida por derrames accidentales de producto concentrado, derrames durante el llenado y lavado de equipos pulverizadores y eliminación de residuos de plaguicidas. Esta última, ha sido identificada por algunos autores como una fuente importante de contaminación (Fischer *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 1999). En este contexto, se ha desarrollado el uso de sistemas de bioprofilaxis, conocidos como lechos biológicos; una biotecnología ampliamente utilizada para la prevención y control de contaminación de tipo puntual. Los lechos biológicos están compuestos por una biomezcla que se prepara mezclando suelo, turba y paja (25:25:50% vol. respectivamente), lo cual crea un microcosmos que favorece la actividad biológica, especialmente de hongos ligninolíticos y por lo tanto permite la degradación de plaguicidas (Castillo *et al.*, 2008). Esta composición de materiales orgánicos es importante para la retención y degradación de estos compuestos. El suelo provee de sitios de adsorción y aporta una riqueza de microorganismos degradadores. La turba, contribuye a controlar la humedad y también permite la adsorción de los plaguicidas, la paja, que estimula el crecimiento de hongos ligninolíticos y por lo tanto la excreción de enzimas extracelulares como la lignina y manganeso peroxidasa y lacasa, las cuales por su baja especificidad permiten la degradación de plaguicidas (Castillo *et al.*, 1997). Este sistema biológico ha sido ampliamente utilizado en Europa y se ha demostrado en diversas publicaciones su capacidad para retener y degradar efectivamente plaguicidas y también mezclas de estos (Henriksen *et al.*, 2003, Fogg *et al.*, 2003a, 2003b, 2004, Vischetti *et al.*, 2004, Coppola *et al.*, 2007, Tortella *et al.*, 2010).

Los plaguicidas han sido formulados para inhibir el crecimiento de determinados organismos, sin embargo, su efecto puede ser extendido a microorganismos del suelo no objetivo, causando cambios en la tasa de rotación de nutrientes en el suelo y cambios sobre la estructura de la comunidad microbiana (Wainwright, 1978; Subhani *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2001 y Chowdhury *et al.*, 2008). En este sentido, Digrak y Kazanici (2001) reportaron cambios en las poblaciones microbianas del suelo frente a la aplicación de los insecticidas isofenfos, forato y fenofos, mostrando un aumento en el total de bacterias cultivables. De la misma manera, Ratcliff *et al.*, 2006, reportaron que la aplicación del herbicida glifosato alteró la comunidad y la diversidad funcional del suelo, mostrando un aumento en el número de bacterias cultivables y la biomasa fúngica. En otro estudio Baxter y Cummings (2008) reportaron cambios en las poblaciones bacterianas, al igual que la estructura y diversidad microbiana en suelo frente a la aplicación del herbicida bromoxinil. Es posible que, estos efectos reportados para suelo tras la aplicación de plaguicidas, puedan extrapolarse sobre los microorganismos y la actividad enzimática de la biomezcla de un lecho biológico. Por lo tanto, es crucial el entendimiento del efecto de los plaguicidas sobre la variación de comunidades y actividades biológicas en el sistema de lechos biológicos. En este contexto, Cea *et al.*, (2010) estudiaron el efecto de la aplicación de pentaclorofenol sobre la actividad y comunidades biológicas en una biomezcla compuesta de suelo y paja; reportando una estimulación de la actividad biológica y cambios en la estructura de la comunidad microbiana frente a la aplicación del plaguicida. Recientemente Coppola *et al.*, (2011) estudiaron el efecto de la aplicación de una mezcla de fungicidas (penconazol, dimetomorfo, metalaxil, azoxistrobin, ciprodinil y fludioxonil) sobre la comunidad microbiana en la biomezcla de un lecho biológico, reportando una reducción de las poblaciones fúngicas y un aumento en las comunidades bacterianas en la biomezcla tras la aplicación de los plaguicidas.

Por lo expuesto anteriormente la importancia de este estudio radica en evaluar el efecto de la aplicación del insecticida diazinón sobre las actividades biológicas y comunidades microbianas en la biomezcla del lecho biológico a escala de laboratorio.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plaguicidas como fuente de contaminación en la agricultura

El uso de plaguicidas se ha hecho indispensable en la agricultura moderna para la protección de los cultivos frente a agentes patógenos. Los plaguicidas son compuestos tóxicos por naturaleza, los cuales pueden causar daños tanto a ecosistemas acuáticos como al suelo. Por lo tanto, la principal preocupación sugerida por algunos autores es evaluar los posibles efectos de estos compuestos en los ecosistemas (Tarazona *et al.*, 2000; Karpouzaz y Capri, 2006).

La liberación de plaguicidas en la agricultura ocurre generalmente por fuentes puntuales y no puntuales de contaminación. La contaminación de tipo no puntual es producida por la pulverización del plaguicida y la subsecuente esorrentía superficial. La contaminación de tipo puntual es producida por derrames accidentales, llenado de tanques o limpieza del equipo de aspersión y, ha sido identificada como la mayor fuente de riesgo de contaminación (Fischer *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 1999). Müller *et al.*, (2002), reportaron que el 77% del total de la contaminación de agua por plaguicidas fue debido a contaminación de tipo puntual. Jaeken y Debaer, (2005), reportaron que de la carga total de plaguicidas en aguas superficiales entre un 40 y 90% fue debido a fuentes de tipo puntuales. Newmann *et al.*, (2002) evaluaron muestras de aguas de cinco rutas de entrada para dos insecticidas, cinco fungicidas y trece herbicidas, reportando que la contaminación de fuente puntual fue la más relevante en todas las muestras de agua evaluadas, siendo insignificante los niveles por contaminación de tipo no puntual. Helweg *et al.*, (2002) evaluaron aguas subterráneas en dos condados daneses después de la carga y mezcla de plaguicidas, encontrando concentraciones relativamente altas de veinticuatro plaguicidas y sus metabolitos, y cerca de un 10% de las muestras contenían más de 50 $\mu\text{g l}^{-1}$. Estudios realizados por Hildebrandt *et al.*, (2007) reportaron niveles entre 0,57 y 5,37 $\mu\text{g l}^{-1}$ de varios plaguicidas en muestras de aguas de áreas agrícolas del río Ebro en España. Estudios realizados en Tanzania mostraron que las plantas también han sido afectadas por la contaminación puntual de plaguicidas, encontrando altas concentraciones de compuestos y sus

metabolitos en pastos, juncos y hojas tiernas de árboles de mango, cerca de la fuente de contaminación (Mahugija y Kishimba, 2005; Mahugija y Kishimba 2007).

En Chile, existe escasa información en relación a la contaminación de agua y suelo. Sin embargo, Báez *et al.*, (1996) reportaron que metabenzotiazuron (MTB) y otros plaguicidas fueron detectados en aguas superficiales en el Valle de Aconcagua. En otro estudio Barra *et al.*, (2001) reportaron la presencia de plaguicidas organoclorados en cuatro lagos en la Región del Bio-Bio. Además, otros plaguicidas como dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y lindano fueron encontrados en la desembocadura del río Bio-Bio (Focardi *et al.*, 1996). Por lo tanto, el estudio de tecnologías o métodos para reducir la contaminación de fuentes puntuales es decisivo para evitar los dificultosos procesos de descontaminación de aguas y suelos.

3.2 Lechos biológicos

Los lechos biológicos son sistemas simples y de bajo costo, diseñados en Suecia, cuyo objetivo es evitar la contaminación de tipo puntual por plaguicidas producto de derrames accidentales, derrames durante llenado y lavado de equipos pulverizadores, además de permitir la degradación y la retención de los plaguicidas evitando su lixiviación (Figura 1.) (Torstensson *et al.*, 1997; Torstensson, 2000). El lecho está compuesto principalmente por una biomezcla compuesta por suelo, turba y paja (25:25:50% vol. respectivamente), donde cada componente de la mezcla tiene un rol importante en la eficiencia de la retención y degradación plaguicidas (Castillo *et al.*, 2008).

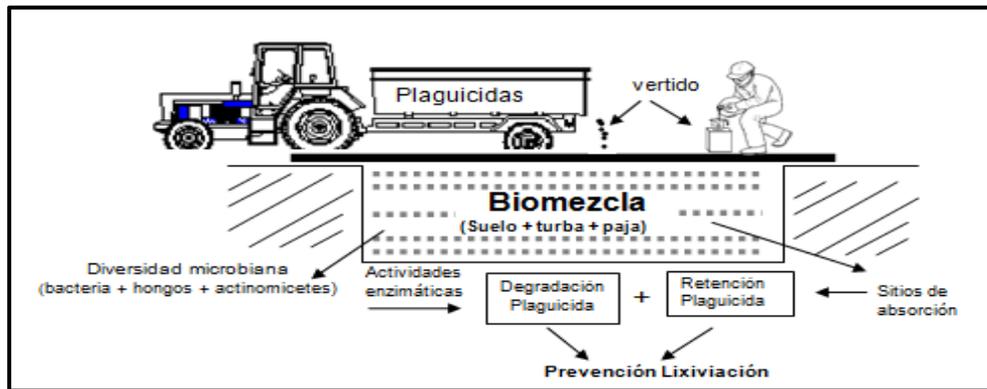


Figura 1. Lecho biológico tradicional y su aplicación en la agricultura.

La paja es el principal sustrato para la degradación y la actividad biológica de la biomezcla, favoreciendo el desarrollo hongos degradadores de lignina, como los hongos de pudrición blanca, las cuales pueden producir enzimas extracelulares como lignina peroxidasa, manganoso peroxidasa y lacasa, las cuales por su baja especificidad permiten la degradación de los plaguicidas (Castillo *et al.*, 2008). Se ha encontrado que una gran variedad plaguicidas han sido degradados en la biomezcla, lo cual ha sido correlacionada positivamente con la actividad fenoloxidasa (Castillo *et al.*, 2007).

El suelo, es otro componente importante de la biomezcla, ya que proporciona sitios de adsorción y constituye una importante fuente de microorganismos que en interacción con los hongos ligninolíticos colaboran con la degradación de los plaguicidas (Castillo *et al.*, 2008).

La turba, contribuye con sitios de adsorción, permite controlar de la humedad de la biomezcla y también a la degradación abiótica de plaguicidas (Castillo *et al.*, 2007). Castillo *et al.*, (2007), reportaron que un alto contenido de turba, permitía mantener un pH bajo, lo cual favorecía el desarrollo de hongos ligninolíticos. Sin embargo, niveles de turba mayores al 50% del volumen total de la biomezcla, disminuía la actividad microbiana, por lo que los autores recomiendan niveles de un 25% de volumen de turba.

3.1 Degradación de plaguicidas en lechos biológicos

Varios estudios realizados en Europa han demostrado que los lechos biológicos pueden efectivamente retener y degradar un amplio rango de plaguicidas (Torstensson, 2000; Coppola *et al.*, 2007; Vischetti *et al.*, 2008). Este sistema ha sido estudiado en varios países, por lo cual ha sido adaptado a las condiciones locales de cada región (Henriksen *et al.*, 2003, Fogg *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, Vischetti *et al.*, 2004, Coppola *et al.*, 2007). Coppola *et al.*, (2007) evaluaron una biomezcla compuesta por un compost de jardín y residuos domésticos sobre la degradación de clorpirifos. Los autores reportaron una eficiente mineralización del plaguicida en la biomezcla con una tasa de degradación de 8,4% por día. Castillo y Torstensson (2007) estudiaron los efectos de la composición, la humedad y la temperatura de la biomezcla en la degradación de isoproturón, linurón, metamitrona, metabenzthizuron, metribuzin cloridazón y terbutilazina, reportando que la mayoría de los plaguicidas fueron degradados sobre un 90%. Vischetti *et al.*, (2004) evaluaron el uso distintos residuos lignocelulósicos tales como cáscaras de cítricos, residuos urbanos, y abono verde en un sistema modificado de lechos biológicos en la degradación de clorpirifos, metalaxil y imazamox. Los autores reportaron que hubo una mayor retención de clorpirifos en comparación a los otros dos plaguicidas debido a las características físico-químicas de este. Por otra parte, se observó una rápida degradación de todos los plaguicidas en los lechos modificados, reportando además que la vida media de los plaguicidas fue menor a 14 días, comparado con los valores publicados para el suelo (60-70).

Henriksen *et al.*, (2003) evaluaron la degradación de mecropop e isoproturon a concentraciones de 0,0005 a 25.000 mg kg⁻¹, reportando que mecropop fue degradado rápidamente en concentraciones entre 0,0005 y 500 mg kg⁻¹; y en concentraciones mayores a 5.000 mg kg⁻¹ la degradación fue menos eficiente. Los mismos autores reportaron que la degradación de isoproturon fue rápida en concentraciones bajas y menos eficiente en altas concentraciones. Fogg *et al.*, (2003) evaluaron la aplicación sucesiva de una mezcla de plaguicidas (isoproturon, pendimetalina, clorpirifos, clorotalonil, epoxiconazol y dimetoato) a concentraciones entre 13 y 94 mg kg⁻¹. Los autores reportaron que cuando los plaguicidas fueron aplicados en tres ocasiones en intervalos de 30 días, la degradación fue significativamente más rápida en la biomezcla que en suelo solo, sin embargo la degradación fue afectada por las

aplicaciones sucesivas. Los autores reportaron que el efecto negativo en la degradación puede atribuirse a la toxicidad de los plaguicidas en las comunidades microbianas. Fogg *et al.*, (2004a) evaluaron la degradación de varios plaguicidas en sistema de lechos biológicos, reportando que en todas las aplicaciones fueron eficientemente degradados y retenidos dentro de 0-5 cm de profundidad en el lecho. Los autores reportaron que la mayoría de los plaguicidas móviles lixiviaron en el lecho biológico, pero el 99% de estos fueron removidos. En otro trabajo, Fogg *et al.*, (2004b) evaluaron la degradación de isoproturon, dimetoato y mecorpop en sistemas de lechos biológicos con distintas texturas de suelo. Los autores reportaron que más de un 98% de los plaguicidas fueron retenidos y degradados en todos los tipos de suelo evaluados. Vischetti *et al.*, (2008) estudiaron la degradación de clorpirifos (10 y 50 mg kg^{-1}) y metalaxil (100 mg kg^{-1}). Estos autores evaluaron el efecto de las concentraciones iniciales, la co aplicación y repetidas aplicaciones, reportando que la degradación de clorpirifos disminuyó con el aumento de las concentraciones de este en todos los ensayos. Por otro lado la degradación de metalaxil fue aumentada cuando este plaguicida fue aplicado junto con clorpirifos.

Aunque la degradación de plaguicidas en lechos biológicos han sido reportados en literatura, pocos estudios han sido desarrollados en Chile con respecto a la degradación de estos compuestos y el efecto de estos en las actividades y comunidades microbianas. Recientemente Tortella *et al.*, (2010) evaluaron la degradación de clorpirifos y su efecto sobre la actividad biológica en lechos biológicos con biomezcla bioestimulada. Estos autores reportaron una eficiente degradación del plaguicida ($>75\%$) después de 40 días de incubación y una alta actividad biológica en la biomezcla bioestimulada.

3.2 Diazinón

Diazinón (O, O-dietil-O-(2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil) fosforotioato) (Figura 2.) es un insecticida organofosforado ampliamente usado en la agricultura en cultivos de tomates, papas, uvas y arroz principalmente (Ting *et al.*, 1996). Sus propiedades físico-químicas se resumen en el Cuadro 1.

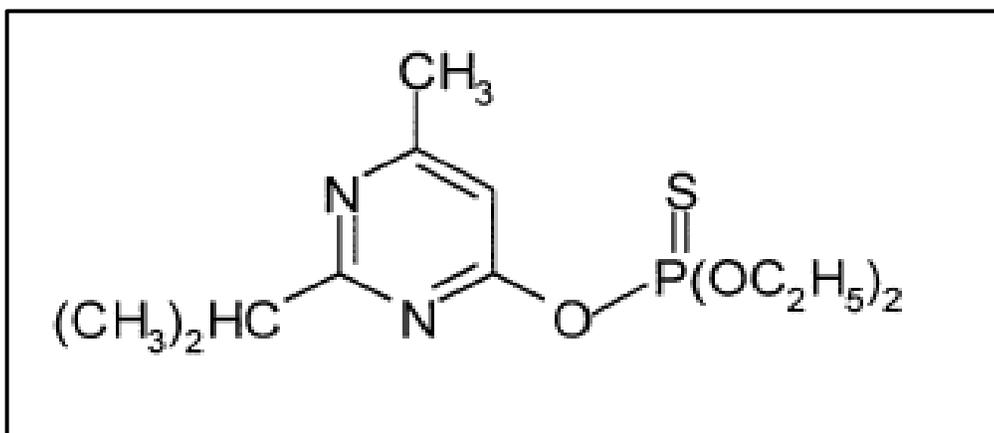


Figura 2. Estructura química de diazinón.

Cuadro 1. Propiedades físico-químicas de diazinón (Hazardous Substances Data Bank, 2011).

Características diazinon	
Estado físico	Líquido
Color	Blanco
Olor	Débil, característico
Peso Molecular (g/mol)	304,35
Punto de ebullición	83-84 °C a 0,0002 mm Hg de presión
Presión de vapor	$6,6 \times 10^{-5}$ mm Hg
Peso específico	1,059-1,063, a 20 °C
Solubilidad en agua	Emulsionable, 0,00 4%
pH	7-10,5
Temperatura de inflamabilidad	No inflamable
Movilidad	Poco móvil
pK _a a 25°C	2,6

Muchos estudios en este insecticida indicaron que la mayoría de las concentraciones de diazinón aplicadas en suelo se pierde a través de degradación química y microbiológica como también por fotooxidación (Kanazawa 2004; Sánchez *et al.*, 2004; Fenlon *et al.*, 2007). Más recientemente, se encontró que algunas bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, y *Agrobacterium*, utilizaban diazinón como fuente única de carbono, fósforo y energía (Yasouri, 2006). Sin embargo algunos estudios han reportado que este insecticida puede ser tóxico para organismos no objetivos, incluyendo algunos grupos funcionales de microorganismos del suelo (Martínez-Toledo *et al.*, 1993; Singh y Singh 2005). Por otro lado, en otros estudios se ha encontrado que diazinón no es perjudicial para *Azospirillum brasilense*, actinomicetes, hongos micorrícicos, y que la introducción de este insecticida puede inclusive aumentar el número de actinomicetes y azotobacter en suelo (Gómez *et al.*, 1999; Singh y Singh 2005).

3.3 Efecto de la aplicación de plaguicidas sobre actividades biológicas

3.3.1 Hidrólisis de la fluoresceína diacetato. Durante los últimos años el interés sobre la actividad microbiana ha aumentado dado a la importancia que esta información representa en el ámbito de ecosistemas biológicos (Green *et al.*, 2006). La actividad de la hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA) ha sido encontrada ampliamente entre descomponedores primarios, bacterias y hongos (Lundgren, 1981). La FDA es hidrolizada por un número de diferentes enzimas, tales como proteasas, lipasas, y esterases. El producto de esta reacción enzimática es la fluoresceína, la cual puede ser medida por espectrofotometría (Swisher y Carroll, 1980; Schnürer y Rosswall, 1982). Algunos estudios sugieren que este parámetro puede ser usado para medir la actividad microbiana en suelo (Brunius, 1980; Lundgren, 1981; Schnürer y Rosswall, 1982). Dumontet *et al.*, (1997) sugirieron que la FDA podría ser considerada como una herramienta adecuada para la medida temprana del efecto de la aplicación de plaguicidas en suelo, ya que es una prueba sensible y no específica capaz de describir la actividad hidrolítica de los microorganismos del suelo.

Perucci *et al.*, (1999) estudiaron el efecto de rimsulfuron sobre la actividad FDA del suelo, encontrando una influencia negativa en la actividad cuando es aplicado a dosis de campo, sin embargo los autores observaron que a altas concentraciones la actividad de la enzima hidrolítica de la FDA fue aumentada, no obstante los efectos fueron leves y transitorios.

Araújo *et al.*, (2003) estudiaron el cambio en la actividad FDA en dos suelos típicos brasileños, con y sin historial de aplicaciones de plaguicidas, encontrando una mayor actividad de la fluoresceína diacetato en los suelos con historial de aplicación en comparación al control.

Karpouzas *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de la aplicación de cadusafos sobre la actividad FDA en 3 tipos de suelo con y sin historial de aplicación de plaguicidas, en el norte de Grecia, observando una cantidad mayor de fluoresceína en el suelo control sin previa aplicación del

plaguicida ($1,65 \mu\text{g FDA g}^{-1}$), en comparación a las muestras tratadas previamente con plaguicidas ($0,5-0,8 \mu\text{g FDA g}^{-1}$).

Cea *et al.*, (2010) estudiaron la aplicación de pentaclorofenol (250 mg g^{-1}) en suelo suplementado con paja, donde evaluaron la actividad FDA durante 28 días, encontrando que en presencia de pentaclorofenol, aumentaba la actividad hidrolítica con valores de $\sim 50 \text{ mg g}^{-1}$, y que a diferencia de los controles (con valores de $\sim 45 \text{ mg g}^{-1}$), en los sustratos contaminados permanecía casi constante la liberación de fluoresceína diacetato. Karanasios *et al.*, (2010) estudiaron la utilización de distintos sustratos lignocelulósicos, residuos de cultivos de girasol (SFR), hojas de olivo, tallos de uva (GS), cáscaras de naranja, mazorcas de maíz (CC) y sustratos para hongos comestibles (SMS) con suelo mediterráneo para la actividad FDA frente a la adición de una mezcla de plaguicidas (metribuzina, buprofezina, metalaxil, azoxistrobina, iprodione, clorpirifos y dimetoato). Los autores reportaron que la actividad hidrolítica de la FDA fue más alta en la biomezcla SFR con $\sim 330 \mu\text{g g h}^{-1}$ y OP $\sim 300 \mu\text{g gh}^{-1}$; y la más baja en la biomezcla con paja, con una actividad de $\sim 120 \mu\text{g g h}^{-1}$. Al mismo tiempo los autores reportaron que entre los 7 y 28 días de incubación la actividad aumentaba significativamente en todas las biomezclas y posteriormente se observó una baja gradual.

En otro estudio realizado por Dutta *et al.*, (2010) evaluaron el efecto de la aplicación de Clorpirifos ($0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ suelo y 50 mg Kg^{-1} suelo) durante 90 días, reportando que la aplicación de clorpirifos a dosis de campo ($0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ suelo) no afectó negativamente la actividad FDA; no así para la aplicación de la dosis mayor a la de campo (50 mg Kg^{-1} suelo), observando una baja de la actividad FDA ($37,40 \mu\text{g g}^{-1}$) con respecto al control sin aplicación del plaguicida ($54,82 \mu\text{g g}^{-1}$).

3.3.2 Actividad ligninolítica. Las enzimas ligninolíticas son secretadas durante el metabolismo secundario por parte de los hongos de pudrición blanca, (Gianfreda y Bollag, 2002). Las fenoloxidasas, que incluyen las peroxidasas (manganeso y lignina peroxidasas) y polifenoloxidasa (lacasas) pueden utilizar como sustrato, además de la lignina, un amplio rango de otros compuestos orgánicos, y esta característica ha sido utilizada para propósitos de biorremediación (Barr y Aust, 1994; Kotterman *et al.*, 1998; Paszczyński y Crawford 1995; Wesenberg *et al.*, 2003).

En los lechos biológicos, la paja es el principal sustrato para los hongos degradadores de lignina, produciendo enzimas extracelulares incluyendo las fenoloxidasas, responsables de la degradación de un amplio rango de plaguicidas (Castillo *et al.*, 1997, 2000, 2001; Castillo y Torstensson 2007). Dada la relación directa que existe entre la producción de estas enzimas y la degradación de plaguicidas se hace necesaria la determinación de la actividad ligninolítica como parámetro de actividad biológica frente a la aplicación de estos compuestos.

Castillo *et al.*, (2000) estudiaron la degradación de bentazon ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) y la producción de manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* cultivado en un sistema de fermentación de sustrato sólido (SSF). Los autores reportaron una alta actividad manganeso peroxidasa después de 59 días de incubación tras la aplicación del plaguicida, además, los autores reportaron que en todos los tratamientos donde hubo degradación de bentazon, fue detectada actividad manganeso peroxidasa (MnP). Castillo *et al.*, (2007) estudiaron el efecto de la composición, humedad y temperatura de la biomezcla sobre la degradación de varios plaguicidas (metamitron, cloridazon, metribuzin, metabenstiazuron, isoproturon, terbutilazina y linuron) sobre la actividad fenoloxidasa durante 107 días. Los autores observaron que no hubo un efecto negativo del plaguicida sobre la actividad fenoloxidasa, encontrando una correlación positiva entre el contenido de enzima y la degradación de los plaguicidas. Además, los autores observaron que a medida que aumentaba el contenido de humedad, aumentaba el contenido de fenoloxidasa en biomezcla tradicional (paja: turba:suelo, razón 50:25:25 %Vol.) encontrando un contenido máximo al 60% de WHC con ~ 60 unidades g^{-1} . Al mismo tiempo los autores reportaron que a

20°C fue la temperatura que mostró una mayor producción de enzima (~28 unidades g⁻¹). Por otra parte los autores encontraron una correlación positiva con los niveles de paja en la biomezcla y el contenido de fenoloxidasas con una producción máxima de ~30 unidades g⁻¹ de fenoloxidasas con 60% de paja en la biomezcla.

Coppola *et al.*, (2007) estudiaron la degradación de clorpirifos en lechos biológicos y la aplicación de la enzima manganeso peroxidasa pura (MnP) en la biomezcla. Los autores observaron que tanto en ausencia de la enzima como en presencia de esta clorpirifos fue degradado, sin embargo solo en presencia de la enzima la tasa de degradación fue de 8,4% por día, en comparación a la tasa de degradación en biomezcla sin enzima la cual fue de 0,96%.

Karanasios *et al.*, (2010) estudiaron la utilización de distintos sustratos lignocelulíticos como, residuos de cultivos de girasol (SFR), paja (STR), hojas de olivo, tallos de uva (GS), cáscaras de naranja (OP), mazorcas de maíz (CC) y sustratos para hongos comestibles (SMS) con suelo mediterráneo para la actividad ligninolítica y la degradación de una mezcla de plaguicidas. Los autores reportaron que la actividad lacasa en todas las biomezclas mostró un aumento significativo después de 30 días de incubación, encontrando los valores más altos para los sustratos STR y CC. Contrariamente, la actividad manganeso peroxidasa solo fue significativa en el sustrato OP a los 7 y 14 días de tratamiento con los plaguicidas, para los demás sustratos la actividad manganeso peroxidasa fue nula.

Recientemente Cea *et al.*, (2010) evaluaron la degradación de pentaclorofenol (250mg PCF kg⁻¹ de suelo) y la actividad ligninolítica en una mezcla de suelo suplementado con paja. Los autores reportaron que la mezcla sin aplicación de PCF mostró una alta actividad ligninolítica durante los primeros 14 días de incubación y posteriormente se observaba un decrecimiento en la actividad. La adición de PCF a la mezcla de suelo y paja mostró un efecto negativo inicial con respecto al control después de 7 días de incubación y luego mostró un aumento a través del tiempo con respecto al control, atribuyendo esto a la posible adaptación a PCP de los microorganismos nativos.

3.3.3 Evolución del Dióxido de Carbono. Las células vivas necesitan un suministro constante de energía, que la microflora heterótrofa deriva a través de la transformación de la materia orgánica. Bajo condiciones aeróbicas, el producto final de esta transformación es la evolución de CO₂ y H₂O (respiración). La actividad metabólica de los microorganismos del suelo puede, por lo tanto, ser cuantificada por la medida de la evolución del CO₂ (Nannipieri *et al.*, 1990). Esta medida es una efectiva herramienta para caracterizar el estado del suelo y por lo tanto un buen bioindicador de sanidad y calidad de éste (Pankhurst *et al.*, 1990). La respiración del suelo ha sido la herramienta más utilizada para la evaluación de los efectos tóxicos de compuestos químicos, tales como metales pesados y plaguicidas sobre los microorganismos del suelo (Alef *et al.*, 1995).

Estudios realizados por Araújo *et al.*, (2003) reportaron cambios en la actividad microbiana de dos suelos de Brasil contaminados con glifosato a una dosis de 2,16 µg g⁻¹, donde la actividad microbiana fue medida a través de la respiración de los microorganismos del suelo durante un periodo de 32 días. Los autores reportaron un aumento de entre un 10-15% en la formación de CO₂ en presencia de glifosato, en comparación con el mismo suelo, sin aplicación histórica de glifosato. Kara *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de topogad (3 kg ha⁻¹) sobre la respiración microbiana del suelo en cuatro diferentes suelos de monocultivo de papa. Los autores reportaron que la evolución del CO₂ aumentaba significativamente tras la aplicación del herbicida las primeras 3 semanas de incubación, alcanzando valores de 5 mg CO₂ 100g⁻¹, y que luego la respiración decrecía con respecto al control.

Coppola *et al.*, (2007) estudiaron la degradación de clorpirifos con distintas proporciones de paja en la composición de la biomezcla de lechos biológicos y la actividad respiratoria, encontrando que la tasa de respiración (1,899 mg CO₂ g d⁻¹) fue significativamente más alta en la mezcla con mayor contenido de paja en comparación a los otros tratamientos. Los autores observaron que la tasa de respiración más baja fue en suelo (0,028 mg CO₂ g d⁻¹).

Castillo *et al.*, (2007) investigaron el efecto de la composición de la biomezcla, humedad y temperatura en lechos biológicos para la degradación de distintos plaguicidas (metamitron, cloridazon, metribuzin, metabenstiazuron, isoproturon, terbutilazina y linuron) durante 107 días, encontrando una correlación positiva entre la respiración basal de los microorganismos presentes en la biomezcla y el contenido de paja y agua, de la misma manera para la disipación de los plaguicidas, donde 6 de 7 plaguicidas degradados, fueron correlacionados con los niveles de respiración basal.

Karanasios *et al.*, (2010) estudiaron la utilización de distintos sustratos lignocelulíticos, como residuos de cultivos de girasol (SFR), hojas de olivo, tallos de uva (GS), cáscaras de naranja (OP), mazorcas de maíz (CC) y sustratos para hongos comestibles (SMS) con suelo mediterráneo, frente a la actividad microbiana y la degradación de plaguicidas. Los autores reportaron que la respiración en las diferentes biomezclas tuvo un aumento significativo al día 7 y luego mostraron una disminución gradual. Los autores observaron que el valor más alto para la respiración fue para la biomezcla OP en el día 7 después de la aplicación de los plaguicidas, con $\sim 300 \mu\text{g g h}^{-1}$; y el valor más bajo presentado por la biomezcla con paja (STR) con $\sim 100 \mu\text{g g h}^{-1}$.

3.3.4 Actividad Fosfatasa. Los hongos y bacterias son los encargados de las transformaciones del fósforo en el suelo. Una de las transformaciones que producen es la mineralización de fósforo orgánico a fósforo inorgánico soluble (Richardson, 2001). La mineralización del fósforo orgánico es llevada a cabo por un grupo de enzimas conocidas como fosfatasa o fosfohidrolasa, que catalizan la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico (Nahas, 2002). Las fosfomonoesterasas o fosfatasa ácidas y alcalinas han sido extensamente estudiadas debido a que una importante cantidad de los compuestos de fósforo orgánico presentes en el suelo se encuentran en forma de monoésteres (Oberson *et al.*, 1996). Las fosfatasa ácidas se encuentran principalmente en suelos ácidos, mientras que las alcalinas predominan en suelos con pH básico (Tabatabai, 1994). La respuesta de los microorganismos frente a la aplicación de plaguicidas puede ser examinada por la estimación de la actividad fosfatasa (Cycón *et al.*, 2010a).

Trabajos realizados por Omar *et al.*, (2000) muestran el efecto de la aplicación de los plaguicidas brominal y selecron a una dosis de campo y 5 veces la dosis de campo sobre la actividad fosfatasa del suelo durante 10 semanas. Los autores reportaron que para ambos plaguicidas la dosis alta de aplicación redujo la actividad para la fosfatasa ácida, mientras que para la fosfatasa alcalina la actividad se vio incrementada con ambas dosis para los dos plaguicidas con respecto al control.

Monkiedje *et al.*, (2002) estudiaron el efecto de la aplicación de fungicidas metalaxil y mefenoxam a dosis de 2, 10, 20, 200 y 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 1, 5, 10, 100, 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, sobre algunos parámetros del suelo durante 90 días. Los autores reportaron que la actividad fosfatasa ácida se vio estimulada por la adición de mefenoxam, con excepción del día 90. En contraste los autores reportaron que la actividad fosfatasa alcalina fue más sensible a la aplicación de mefenoxam en los días 14, 30 y 90 de incubación. Al mismo tiempo los autores encontraron un efecto similar para metalaxil, teniendo un efecto estimulador para la fosfatasa ácida y una respuesta perjudicial para la fosfatasa alcalina en los días 14 y 90.

Pozo *et al.*, (2003) estudiaron la aplicación de 3,3'-diaminobenzidina, un compuesto orgánico altamente tóxico generado como producto de la reducción de decolorantes; a dosis de 5, 10, 25 y 50 mg kg^{-1} y sus efectos sobre las comunidades microbianas del suelo y las actividades enzimáticas durante 14 días, reportando que la actividad fosfatasa alcalina fue significativamente aumentada por todas las dosis aplicadas de 3,3'-diaminobenzidina después de 7 días de incubación y que la fosfatasa ácida tuvo un incremento inicial después del primer día de aplicación la cual se mantuvo constante.

Cycón *et al.*, (2010a) estudiaron el efecto de la aplicación de diazinón a tres dosis, 7,35 y 700 mg kg^{-1} sobre la actividad fosfatasa de suelo franco arenoso y suelo arcilloso. Los autores reportaron que todas las dosis aplicadas para ambos suelos aumentaron la actividad fosfatasa ácida. En contraste, los autores reportaron que con las dosis más altas disminuyó la actividad fosfatasa alcalina en el suelo arcilloso. Los autores reportaron que la actividad fosfatasa alcalina fue más sensible a diazinón. En otro trabajo Cycón *et al.*, (2010b) estudiaron el efecto de

tres dosis de una mezcla de fungicidas (15, 75 y 1500 mg kg⁻¹), mancozed y dimetomorfo durante 28 días, frente a la actividad fosfatasa. Los autores reportaron un efecto negativo sobre la fosfatasa ácida, decreciendo la actividad con respecto al control, a medida que se aumentó la dosis de la mezcla de fungicidas. La actividad fosfatasa alcalina se vio afectada pero en menor medida con respecto al control.

Recientemente Floch *et al.*, (2011) estudiaron la actividad fosfomonoesterasa, fosfodiesterasa y fosfotriesterasa como indicador de la contaminación por plaguicidas a una concentración de 100 µg g⁻¹ (2,4 diclorofenoxiacético, atrazina, azinfos metil, carbaril, diuron, glifosato, linurón, mancozeb, paratión-metilo y prometrina) en suelo durante 12 meses. Los autores reportaron un efecto inmediato en la actividad fosfomonoesterasa ácida, fosfomonoesterasa alcalina, observando un efecto estimulante tras la aplicación de los plaguicidas.

3.4 Efecto de la aplicación de plaguicidas sobre la diversidad metabólica y microbiana

La diversidad microbiana ha sido sugerida como uno de los parámetros más importantes como indicador de la calidad del suelo, por lo cual se hace necesario el estudio del impacto de la aplicación de plaguicidas sobre la diversidad funcional microbiana del suelo (Fang *et al.*, 2009).

En este contexto se desarrolló el sistema Biolog EcoPlateTM, descrito por Garland y Mills (1991). Los autores encontraron que al inocular microplacas con una mezcla de cultivos de microorganismos, era posible determinar características de esta comunidad microbiana. Este enfoque ha sido llamado perfiles del nivel fisiológico de la comunidad (CLPPs) del suelo y ha sido utilizado para el estudio de la comunidad microbiana frente a la aplicación de plaguicidas (Ratcliff *et al.*, 2006, y Fang *et al.*, 2009). Este sistema consiste en una microplaca la cual contiene 31 fuentes de carbono más usadas para el análisis de comunidad del suelo. Estas fuentes de carbono se encuentran en triplicado dentro de la microplaca y contienen también una sustancia indicadora, tetrazolio, la cual produce un cambio colorimétrico a medida que los microorganismos utilizan el sustrato. Esto permite cuantificar la utilización de estos sustratos a

través de espectrofotometría. Los microorganismos del suelo darán un patrón de reacción característico llamada huella metabólica (BIOLOG, 2011).

Por otro lado, las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas herramientas para el análisis de estructura y composición de las comunidades microbianas. Uno de estos métodos más usados en la última década es la técnica de separación de regiones variables de rADN basado en una PCR-DGGE propuesta por Muyzer *et al.*, (1993), la cual se basa en la amplificación de ADN ribosomal 16S (rADN) para bacteria y 18S (rADN) para hongos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida por una electroforesis de los fragmentos amplificados en gel de poliacrilamida con gradiente denaturante (DGGE), donde los fragmentos del mismo tamaño son separados por diferencias en su contenido de pares de bases, guanina-citosina. Esta técnica ha sido usada para mostrar el efecto de plaguicidas sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo (Luo *et al.*, 2004; Bending *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Coppola *et al.*, 2011).

Digrak y Özcelik (1998) evaluaron el efecto de varios insecticidas y fungicidas en el número total de actinomicetes, bacterias aerobias, bacterias anaerobias y bacterias celulolíticas en suelos agrícolas contaminados con 1 mg kg^{-1} de plaguicida. Los autores reportaron que los plaguicidas no inhibieron muchos grupos bacterianos y fúngicos, siendo los hongos los menos inhibidos. Gigliotti *et al.*, (1998) estudiaron los efectos producidos por la aplicación de dos dosis (16 y $160 \mu\text{g kg}^{-1}$) de metil-bensulfuron (BSM) sobre el número y actividades microbianas. Estos autores reportaron que a una concentración superior a la utilizada en aplicaciones normales en la agricultura se vieron alterados algunos aspectos de la estructura y la actividad de la comunidad microbiana del suelo. Por otra parte, solo los microorganismos celulolíticos en suelos, sin aplicación previa con plaguicidas, se vieron afectados significativamente en número. En otro estudio Saeki y Toyota (2004) evaluaron el efecto de BSM (metil- bensulfuron) en la comunidad microbiana. Los autores observaron que el número total de bacterias no se vio afectado por el plaguicida. De la misma manera, los ensayos con electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) mostraron que la estructura de la comunidad bacteriana no fue afectada por la adición de BSM después de ocho semanas de exposición.

Baxter y Cummings (2008) evaluaron la degradación del herbicida bromoxinil y su impacto en la diversidad bacteriana mediante DGGE y PCR cuantitativo en cinco taxones de bacterias. Los resultados mostraron que tres aplicaciones de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de bromoxinil fueron degradadas de manera rápida (entre 7 y 9 días) y los perfiles de población bacteriana mostraron una similitud significativa a través del tiempo (28 días). Sin embargo, cuando bromoxinil fue agregado a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ la degradación fue precedida por una fase de latencia y el 50% de esta concentración fue degradada en 28 días. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la población bacteriana después de la aplicación final de bromoxinil, que fue correlacionada con una inhibición de la degradación del herbicida durante el mismo periodo. En otro trabajo, Ratcliff *et al.*, (2006) reportaron que glifosato (herbicida) aplicado en dosis de campo recomendadas resulta en pocos cambios en la estructura de la comunidad microbiana. Los mismos resultados fueron encontrados en el total de bacterias cultivables, la longitud de las hifas fúngicas, la biomasa, la utilización de perfiles de carbono (utilizando BIOLOG Ecoplate) y ácidos grasos. Por otra parte, los mismos autores reportaron que con una alta concentración de glifosato (100 veces la dosis de campo) simulando un derrame de este compuesto, se vio afectada la comunidad bacteriana en todos los suelos evaluados, sin embargo se observó un incremento en el total de bacterias cultivables, y la biomasa de hongos y bacterias después de la aplicación, indicando un enriquecimiento de las bacterias generalistas. Contrariamente, Ayansina y Oso (2006) reportaron que el herbicida atrazina y en adición a motolacloz causaban una disminución en la población microbiana del suelo, tanto en altas dosis como en la dosis recomendada. Los autores reportaron que la aplicación del herbicida resultó en la supresión de algunas especies microbianas.

Varios estudios han evaluado también el efecto de insecticidas en las comunidades microbianas del suelo. Digrak y Kazanici (2001) evaluaron algunos insecticidas organofosforados y sus efectos en la microbiota del suelo. Los autores reportaron que el total de bacterias viables, actinomicetes, bacterias anaeróbicas, endosporas aeróbicas, microorganismos celulolíticos y levaduras no se vieron inhibidas por la aplicación de los insecticidas. Además, la aplicación del insecticida causó un efecto estimulador resultando con un total de bacterias viables más alto que el control. En otro estudio Adesodun *et al.*, (2005), la aplicación del

insecticida clorpirifos no mostró un efecto significativo sobre la biomasa y respiración microbiana cuando fue aplicado a dosis recomendadas. Resultados similares fueron encontrados por Eisenhauer *et al.*, (2009) donde la aplicación de clorpirifos aumentó los parámetros de biomasa microbiana del suelo. De la misma manera, Fang *et al.*, (2008) estudiaron el efecto y la persistencia de clorpirifos cuando es aplicado en repetidas aplicaciones. Los autores reportaron que la tasa de degradación del insecticida aumentó mientras su efecto inhibitorio en las comunidades microbianas del suelo disminuía gradualmente con las diferentes aplicaciones de clorpirifos. Fang *et al.*, (2009) investigaron el impacto de diferentes concentraciones de clorpirifos (4, 8, y 12 mg kg⁻¹) en suelo sobre la diversidad microbiana. Los autores reportaron una vida media de 14, 16 y 18 días. Por otra parte la media de desarrollo de color (AWD, indicador general de la actividad microbiana), obtenido mediante el sistema BIOLOG Microplate, fue inhibida por clorpirifos, pero solo dentro de las primeras dos semanas, a partir de entonces hubo una recuperación a niveles similares a los del control. Por otro lado, cuando se utilizaron altas concentraciones de clorpirifos, los efectos inhibitorios fueron incrementados.

Chu *et al.*, (2008) evaluaron el efecto de clorpirifos y su combinación con clorotalonil sobre las poblaciones microbianas del suelo. Los autores reportaron que la degradación de clorpirifos no fue afectada por su combinación con clorotalonil, pero se observaron efectos inhibitorios sobre los microorganismos por la combinación de estos. Las poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetes fueron reducidas significativamente en un 44, 66 y 72% respectivamente cuando clorpirifos fue aplicado solo. En combinación con clorotalonil el efecto inhibitorio fue incrementado en 55, 79 y 85% respectivamente. En otro trabajo, Zhang *et al.*, (2009) evaluaron el efecto de cipermetrina sobre las comunidades microbianas de la filósfera de pepinos. Análisis de DGGE y ácidos grasos revelaron que luego de la aplicación del insecticida hubo un incremento bacterial y un cambio en la composición de la comunidad microbiana. En otro trabajo, Zhang *et al.*, (2008) reportaron que la aplicación de cipermetrina causó un aumento significativo tanto en las bacterias totales y biomasa bacteriana, pero una disminución en la biomasa fúngica. Por otro lado, los autores observaron un cambio significativo en la estructura de la comunidad bacteriana.

En otros estudios han evaluado el efecto de fungicidas sobre la actividad enzimática y diversidad microbiana. Yu *et al.*, (2006) evaluaron el efecto de aplicaciones repetidas de clorotalonil en las poblaciones bacterianas, fúngicas, actinomicetes y actividades enzimáticas. Los autores reportaron que después de la primera aplicación de clorotalonil, los microorganismos del suelo fueron afectados fuertemente, y luego mostraron una adaptación gradual. Por otro lado, los autores reportaron que las enzimas evaluadas (fosfatasa acida y alcalina, ureasa, catalasa e invertasa) siguieron una tendencia similar después de los efectos inhibitorios causados por la aplicación de clorotalonil.

En trabajos recientes Gu *et al.*, (2010) reportaron mediante análisis de DGGE cambios significativos en la comunidad bacteriana después de la aplicación de enostroburin en la filósfera de trigo. En otra investigación, Cycon *et al.*, (2010b) estudiaron la respuesta de microorganismos nativos frente a la aplicación de tres dosis de una mezcla de fungicidas mancozed y dimetomorfo (15, 75 y 1500 mg kg⁻¹), reportando que la combinación de estos fungicidas en todas las concentraciones aumentó el número total de bacterias cultivables.

Como se ha expuesto anteriormente, las comunidades microbianas y la actividad biológica en el suelo pueden verse afectadas por la aplicación de plaguicidas en dosis única o repetidas, sin embargo, las exposiciones sucesivas a estos compuestos puede causar una adaptación de estos microorganismos, tanto en la biomasa o las actividades metabólicas, que a menudo provoca una rápida degradación de los plaguicidas.

4. HIPÓTESIS

Las actividades biológicas y las comunidades microbianas en la biomezcla de lechos biológicos serán afectadas tras la aplicación sucesiva de diazinón, sin embargo el efecto negativo será atenuado a corto plazo debido a los componentes de la biomezcla. Además el efecto de la aplicación de diazinón no afectará la capacidad de este sistema en la degradación del plaguicida.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de aplicaciones sucesivas de diazinón sobre la diversidad metabólica y comunidades microbianas en una biomezcla de un lecho biológico.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de diazinón sobre parámetros biológicos de una biomezcla de un lecho biológico cuando es aplicado en repetidas ocasiones.
- Evaluar el efecto de diazinón sobre la diversidad funcional microbiana de una biomezcla de un lecho biológico cuando es aplicado en repetidas ocasiones.
- Ver el efecto de diazinón sobre la comunidad microbiana de una biomezcla de un lecho biológico cuando es aplicado en repetidas ocasiones.
- Evaluar la degradación de diazinón en la biomezcla del lecho biológico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Compuestos químicos

Diazinón (O, O-dietil-O-(2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil) fosforotioato) 60% de pureza utilizado en este estudio fue obtenido de “Drag Pharma Chile Invetec S.A” a partir del cual se preparó una solución stock de 6.000 mg l^{-1} la cual fue almacenada en un frasco ámbar a 4°C para su posterior utilización.

MBTH (3-methyl-2-benzotiazolinona hidrazona) y DMAB (3-(dimetilamino) ácido benzoico), utilizados para medir la actividad ligninolítica, fueron obtenidos de “Sigma-Aldrich”.

7.2 Suelo

Para el estudio se utilizó un suelo Andisol, tomado del perfil 0-20 cm, el cual fue colectado del predio Maquehue de la Universidad de La Frontera, correspondiente a la serie Freire con una textura franco-limosa.

7.3 Preparación del lecho biológico

Para la preparación de la biomezcla se mezcló suelo, turba y paja en una relación de 25:25:50 v/v, respectivamente. La biomezcla fue picada en un procesador hasta obtener una fracción de 3mm aproximadamente y fue humedecida con agua destilada hasta un 40% de humedad. Posteriormente la biomezcla fue incubada en oscuridad a 20°C durante 30 días previo a su utilización.



Figura 3. Lecho biológico y biomezcla utilizado en el estudio.

7.4 Ensayo de degradación de diazinón

Para el estudio de degradación se colocó 1500 gr de biomezcla pre-incubada en un contenedor de vidrio (40 x 25 x 15 cm). Posteriormente la biomezcla fue contaminada con una suspensión de diazinón para obtener una concentración final de 40 mg i.a kg⁻¹ aproximadamente, la cual corresponde a una dosis 40 veces mayor a la dosis agronómica recomendada. La contaminación de la biomezcla fue repetida cada 30 días durante un periodo de 90 días. Durante el transcurso del ensayo, los contenedores fueron mantenidos en oscuridad a 20 ± 2°C en una cámara de incubación, y la humedad de la biomezcla fue mantenida mediante aplicaciones periódicas de agua destilada.

7.5 Actividades biológicas

Las actividades biológicas, peroxidasa, fosfatasa ácida y alcalina, hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA), y respiración microbiana fueron medidas en triplicado para la biomezcla control (sin aplicación) y para la biomezcla tratada durante 90 días.

La actividad microbiana total fue medida por el monitoreo de la hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA), de acuerdo a la metodología descrita por Schnurer y Rosswall (1982) con algunas modificaciones. Se colocó 1 gr peso seco de biomezcla en tubos de 30 ml, y luego se agregaron 100 μl de FDA ($2,0 \text{ mg ml}^{-1}$) y 9,9 ml de buffer fosfato (60mM). Se preparó un blanco con 10 ml de buffer fosfato. Las muestras fueron incubadas en baño termostático durante 60 minutos a 25°C y la reacción fue detenida mediante la adición de 10 ml de acetona. Luego las muestras fueron filtradas con papel filtro y, leídas en espectrofotómetro a 490 nm. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{g FDA g h}^{-1}$.

La actividad ligninolítica fue monitoreada a través de la actividad fonoloxidasa, utilizando MBTH/DMAB según la metodología descrita por Castillo *et al.* (1994). Se tomaron 10 gr peso seco de biomezcla y fueron puestos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Se adicionó 25 ml de buffer succinato lactato (100mM) a pH 4,5. Posteriormente los matraces fueron agitados en un agitador orbital a 150 r.p.m por 60 minutos. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 5.000 r.p.m por 10 minutos. Se preparó una mezcla de reacción con 300 μl de DMAB (6,6mM), 100 μl de MBTH (1,4mM), 30 μl de MnSO_4 (20mM), 10 μl de H_2O_2 (10mM) y 1560 μl de muestra. La reacción fue medida por espectrofotómetro a 590nm. Los resultados fueron expresados en U de enzima por kg de biomezcla.

La actividad fosfatasa fue realizada según la metodología de Tabatabai y Bremmer (1969) con algunas modificaciones. Se tomó 1g peso seco de biomezcla en tubos de 20 ml y se adicionó 4 ml de buffer MUB universal a pH 11 para fosfatasa alcalina y pH 5,5 para fosfatasa ácida, y 1 ml de *p*-nitrofenil (15mM). Inmediatamente se incubó a 30°C por 30 minutos. Transcurrida la incubación se adicionó 4 ml de NaOH (0,5M) y 1 ml de CaCl (0,5M) para detener la reacción. El mismo procedimiento fue realizado para la preparación de un blanco, sin biomezcla. Las muestras fueron filtradas y medidas en espectrofotómetro a 400 nm. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1}$ de biomezcla.

La respiración microbiana fue monitoreada según la metodología de Alef *et al.*, (1995) mediante absorción de CO₂ en NaOH y titulación. Se tomaron 50 gr peso seco de biomezcla, en frascos con cierre hermético. Se colocó dentro de cada frasco 10ml de NaOH (2N). La titulación periódica fue realizada con reactivo indicador Fenolftaleína y solución HCl (2N). Los resultados fueron expresados en mg de CO₂ por g de biomezcla.

7.6 Diazinón residual

Para la extracción de diazinón se tomaron 10 g peso seco de biomezcla contaminada y se depositó en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Se adicionó 25 ml de acetona y luego las muestras fueron agitadas por 30 minutos a 350 r.p.m. Luego fueron sonicadas por 30 minutos en baño ultrasonido y posteriormente se centrifugaron a 10.000 r.p.m por 10 minutos en tubos de teflón de 50 ml. Esta actividad se realizó tres veces consecutivas a cada muestra. Posteriormente se tomó una muestra de 5 ml del sobrenadante el cual fue filtrado a través de membranas de PTFE de 0,2 µm de poro y pasadas por columnas de fluorisil para eliminar residuos de color de las muestras. Para determinar la concentración de plaguicida residual se procedió según la metodología descrita por Tortella *et al.*, (2010), con algunas modificaciones en las condiciones cromatográficas. Se tomó una muestra de 50 µl la cual fue inyectada en un cromatógrafo líquido “HPLC Hitachi Lachrom Elite” provisto de un organizador, el cual contiene el suministro de energía central del sistema, un detector de arreglo de diodo modelo L-2455, una bomba modelo L-2130, un horno de columnas modelo L-2300 y un automuestrador modelo L-2200. Se utilizó una columna analítica “Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Merck®” a una temperatura 30°C y una “Precolumna Lichrocart ® 4-4 RP-18e, 5 µm Merck®”. Se utilizó una fase móvil de Acetonitrilo:Acetato de Amonio 1 mM, isocrático 70:30(V/V), una longitud de onda de lectura de 246 nm y un tiempo de retención de 3 minutos.

7.7 Recuento de microorganismos cultivables y diversidad metabólica microbiana

Para el recuento de microorganismos se tomaron 10 gr peso seco de biomezcla contaminada y del control y se agitaron a 250 r.p.m por dos horas en 90 ml de solución salina NaCl (0,85% P/V) y se dejó decantar durante 30 minutos. Posteriormente se tomó una muestra del sobrenadante y se realizaron diluciones sucesivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) y se procedió a sembrar 1 ml en Agar de aislamiento para actinomicetes de la dilución 10^{-5} , 1 ml de la dilución 10^{-4} en Agar Rosa Bengala para hongos y 1ml de la dilución 10^{-6} en Agar Plate Count para bacterias. Una vez sembradas, las placas fueron incubadas en oscuridad a 25°C durante 48 horas para el cultivo de hongos y a 28°C durante 48 horas para el cultivo de bacterias y actinomicetes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias.

La diversidad metabólica y los perfiles del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPPs) fueron monitoreados mediante la utilización de Biolog® Ecoplate. Se tomaron 10 gr peso seco de la biomezcla y fueron suspendidos en 90 ml de solución salina NaCl (0,85% P/V). Se pusieron en agitación por 2 horas a 250 r.p.m y posteriormente centrifugadas a 2160 r.p.m por 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 11.000 r.p.m por 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en solución salina NaCl (0,85% P/V). Se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución $10^{-4} \leq$ y de esta se tomaron 150 μ l para la inoculación de los 96 pocillos de la placa Biolog®. Una vez inoculadas, las placas fueron incubadas en oscuridad a 25°C. El desarrollo de color fue medido cada 5 horas a 590 nm durante 4 días usando un lector automatizado de microplacas “BIO-TEK Elx808”. Se utilizaron los valores de absorbancia a las 72 horas para registrar los perfiles del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPPs) y para calcular los índices de diversidad microbiana. El índice de Shannon para la riqueza de microorganismos presentes en la muestra (Shannon y Weaver, 1949) fue calculado por la ecuación (3.1), y el índice de Uniformidad para la calcular la homogeneidad de microorganismos en la muestra (McIntosh, 1967) fue calculado por la ecuación (3.2), donde n_i se refiere al valor de absorbancia y p_i se refiere al valor de la absorbancia proporcional de los pocillos sobre el total de los valores de absorbancia de todos los pocillos.

(3.1) Índice de Shannon para la riqueza de microorganismos $H' = - \sum p_i (\ln p_i)$

(3.2) Índice de McIntosh $U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$

7.8 Análisis de la comunidad microbiana de la biomezcla

Se analizó el efecto de la aplicación de diazinón sobre la comunidad fúngica presente en la biomezcla mediante la evaluación del perfil genético obtenido mediante la extracción de ADN, seguida por la amplificación selectiva de la región variable 18S rADN para hongos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida por una electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE). Para esto se extrajeron muestras de ADN al día 0, 10, 30, 40, 60, 70 y 90 durante el ensayo.

La extracción de ADN total se realizó mediante la utilización de “PowerSoil ®DNA Isolation Kit; MO BIO”, siguiendo el protocolo remendado por el fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado en espectrofotómetro y medido a una absorbancia de 260 nm, luego fue medido a 280 nm y se calculó el cociente obtenido a partir de las dos absorbancias para verificar su pureza.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizó 10µl de buffer “Green GoTaq® Flexi” 5X, 2µl de MgCl₂ (25mM), 1µl de DNTP’S (10mM), 1µl de partidor forward (10mM), 1µl partidor reverse (10mM), 0,25µl de *Taq* polimerasa (5U µl⁻¹), 2µl de ADN (50 ng µl⁻¹) para la amplificación de la región variable del gen ribosomal 18S para hongos; y 35µl de agua destilada desionizada. La enzima polimerasa utilizada fue “Go Taq® Flexi DNA polimerasa, Promega Corp.” Los partidores utilizados se encuentran resumidos en el Cuadro 2. Para la amplificación se utilizaron los partidores EF4 y FUNG5 y luego el producto obtenido fue nuevamente amplificado con un set de partidores EF4 y NS2-GC (Marshall *et al.*, 2003). La reacción se llevó a cabo en termociclador “Multigene, Labnet”. La reacción de PCR para cada amplificación se resume en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Partidores utilizados para la amplificación de las regiones variables de ADN ribosomal de hongos presentes en la biomezcla.

Nombre partidor	Secuencia (5'-3')	Blanco	Referencia
EF4 f	GGAAGGGRTGTATTTATTAG	Hongo, 400-600pb	(Smit et al., 1999)
FUNG 5 r	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	Hongo, 18S rADN	(Marshall et al., 2003)
NS2-GC-clamp	GC-Clamp- GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	Hongo 18S rADN	(Marshall et al., 2003)
GC-Clamp para hongo	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGG GCGGGGGCACGGG*		

*GC-Clamp va unido a la región 5' del partidor

Cuadro 3. Mix de reacción de PCR para cada amplificación.

Volumen	Reactivos	Concentración
10 µl	Buffer	5X
10 µl	MgCl ₂	25mM
1 µl	DNTP'S	10mM
1 µl	Partidor Forward	10µM
1 µl	Partidor Reverse	10µM
0,25 µl	<i>Taq</i> polimerasa	5U µl ⁻¹
2 µl	ADN	50 ng µl ⁻¹
35 µl	Agua destilada desionizada	

La reacción de PCR para la amplificación de 18S rADN de hongos para la primera ronda, con el primer set de partidores EF4f y FUNG-5r fue llevada a cabo con una denaturación inicial de 8 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de denaturación por 25 segundos a 94 °C, hibridación por

25 segundos a 46 °C, una extensión por 1 minuto y 30 segundos a 72 °C, y una extensión final de por 10 minutos a 72 °C. Luego en la segunda ronda, el producto de PCR fue amplificado con el segundo set de partidores, EF4 y NS2-GC-clamp, con la finalidad de amplificar el fragmento de ADN ribosomal anidado en el fragmento amplificado por EF4f y FUNG-5r para mayor especificidad. Los ciclos y las temperaturas de la segunda amplificación fueron las mismas nombradas anteriormente.

Los productos de PCR fueron verificados en gel de agarosa al 1% (P/V) teñido con “CYBR® Safe DNA Gel Stain 1X, Invitrogen”, con un volumen de carga de 7 µl, a 100 volts durante media hora y visualizado en transluminador UV.

Para DGGE se preparó un gel de poliacrilamida (8% P/V) con una gradiente entre un 40 % y 65% de denaturación (donde el 100% de denaturación corresponde a 7 mol l⁻¹ de urea más formamida al 40% P/V). La gradiente de denaturación se preparó mediante la utilización de una bomba peristáltica y un formador de gradiente. Del producto PCR fueron cargados 20µl en el gel de cada muestra tratamiento y sus controles correspondientes más un control positivo proveniente de la especie *Anthracyllum discolor*. La corrida electroforética se realizó a 100 volts, a 60 °C por 16 horas. Luego de la corrida se procedió a teñir el gel incubándolo en una solución de Gel Red 3X por 15 minutos en agitación (50 r.p.m) para la visualización de la bandas en un transluminador UV.

7.9 Análisis estadístico

La evaluación estadística se aplicó a cada parámetro biológico (hidrólisis de la fluoresceína diacetato, fosfatasa ácida y alcalina; y peroxidasas) mediante ANOVA factorial de medidas repetidas para encontrar diferencias significativas entre el control y la muestra con diazinón tras cada aplicación. Las diferencias entre el control y las muestras con diazinón en cada día de medición fueron comprobadas mediante la prueba de comparación de medias T-Student. El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Actividades biológicas

8.1.1 **Hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA).** Los resultados obtenidos de la hidrólisis de la fluoresceína diacetato son mostrados en la figura 4. Como se puede observar no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre el tratamiento y el control (Anexo 1, 3 y 4) lo que indicaría que no existe un efecto negativo sobre la actividad hidrolítica. Se pudo observar además, un aumento de la actividad después de la aplicación del plaguicida a los 30 días después de la primera aplicación, presentando diferencias significativas en este punto (Anexo 2). Si bien la dosis aplicada de diazinón en el presente trabajo corresponde a 40 veces la dosis de campo, el efecto negativo al día inicial de la contaminación es transitorio, lo cual podría deberse a una posible adaptación al contaminante por parte de los microorganismos presentes en la biomezcla. Perucci *et al.*, (1999) estudiaron el efecto del herbicida rimsulfuron en la actividad FDA del suelo. Los autores reportaron una influencia negativa en FDA por la aplicación a dosis de campo, pero el efecto a altas concentraciones, aumentó la actividad de la enzima hidrolítica de la FDA. Sin embargo, los efectos fueron leves y transitorios. Contrariamente Araújo *et al.*, (2003), estudiaron el cambio en la actividad microbiana en dos típicos suelos brasileños con y sin aplicación de glifosato ($2,16 \text{ mg kg}^{-1}$), monitoreando la hidrólisis de la FDA durante 32 días, reportando que las muestras de áreas con previa aplicación de glifosato tuvieron una alta actividad FDA al comienzo y al final de la incubación. En otro trabajo Karpouzias *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de la aplicación de cadusafos sobre la actividad FDA en 3 tipos de suelo con y sin historial de aplicación de plaguicidas, en el norte de Grecia, observando una cantidad mayor de fluoresceína en el suelo control sin previa aplicación del plaguicida ($1,65 \text{ } \mu\text{g FDA g}^{-1}$), en comparación a las muestras tratadas previamente con plaguicidas ($0,5\text{-}0,8 \text{ } \mu\text{g FDA g}^{-1}$). Dutta *et al.*, (2010) estudiaron el efecto de la aplicación de clorpirifos ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ suelo y 50 mg kg^{-1} suelo) durante 90 días, reportando que la aplicación a dosis de campo ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ suelo) no afectó negativamente la hidrólisis de la fluoresceína diacetato con respecto al control; no así para la aplicación de la dosis mayor a la de campo (50 mg Kg^{-1} suelo), donde se observó una baja actividad ($37,40 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) con respecto al control ($54,82 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$). Cea *et al.*, (2010) estudiaron la

aplicación de pentaclorofenol (250 mg g^{-1}) en una mezcla de suelo con paja, evaluando la FDA durante 28 días, reportando que en presencia de pentaclorofenol, aumentaba la actividad FDA, y que a diferencia de los controles, en los sustratos contaminados permanecía casi constante la liberación de la enzima fluoresceína. Karanasios *et al.*, (2010) estudiaron la utilización de distintos sustratos lignocelulósicos: residuos de cultivos de girasol (SFR), hojas de olivo, tallos de uva (GS), cáscaras de naranja, mazorcas de maíz (CC) y sustratos para hongos comestibles (SMS) con suelo mediterráneo para la actividad microbiana frente a la adición de una mezcla de plaguicidas (metribuzina, buprofezina, metalalxil, azoxistrobina, iprodione, clorpirifos y dimetoato) durante 42 días. Los autores reportaron que la actividad hidrolítica de la FDA fue más alta en la biomezcla SFR y OP; y la más baja en la biomezcla tradicional con paja. Al mismo tiempo los autores reportaron que entre los 7 y 28 días la actividad aumentaba significativamente en todas las biomezclas y luego mostraron una baja gradual después de los 28 días de aplicación.

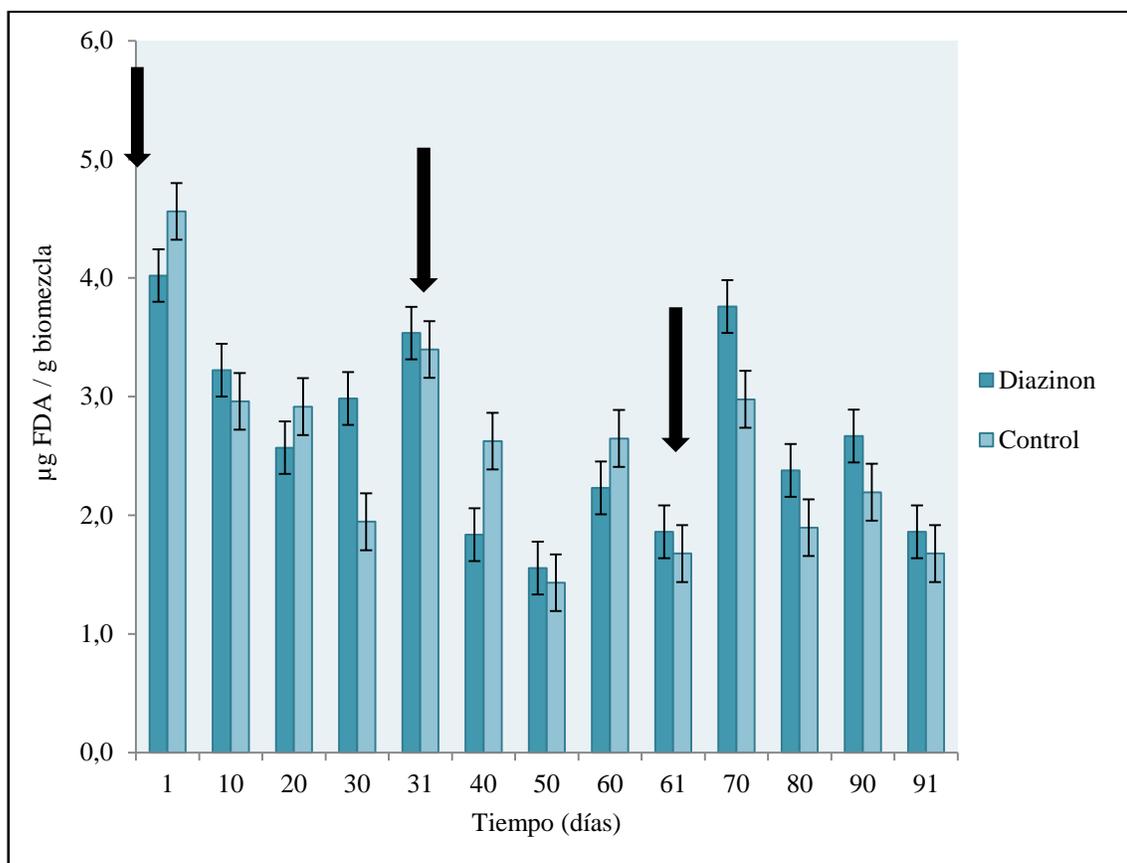


Figura 4. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre la hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA). Flechas indican los días de aplicación.

8.1.2 Actividad ligninolítica La actividad ligninolítica, medida a través de la actividad fenoloxidasa (Figura 5) muestra que la aplicación inicial de diazinón tuvo un efecto negativo sobre la actividad fenoloxidasa al día inicial después de la primera aplicación. En los días posteriores de incubación, la actividad, tanto para el tratamiento como para el control la actividad decrece, no observándose diferencias significativas entre el control y el tratamiento, por lo que, posteriormente de la primera aplicación no se observó un efecto negativo en ninguna de las tres aplicaciones sobre la actividad ligninolítica por parte de los microorganismos de la biomezcla (Anexo 5,7, y 8). Si bien al día 30 se observa un aumento con respecto al control, este no es significativo (Anexo 6.) Similares resultados fueron encontrados por Cea *et al.*, (2010), quienes estudiaron la degradación de pentaclorofenol (250 mg PCP kg de suelo) y la actividad peroxidasa en una mezcla de suelo y paja. Los autores reportaron que en la mezcla sin aplicación de PCP se observaba una alta actividad los primeros 14 días y luego esta decrecía. La adición de PCP a la mezcla de suelo y paja mostró un efecto negativo inicial con respecto al control al día 7 y luego mostró un aumento a través del tiempo con respecto al control, atribuyendo esto a la posible adaptación de los microorganismos nativos. Contrariamente Karanasios *et al.*, (2010), quienes estudiaron distintos sustratos lignocelolósicos en lechos biológicos tras la aplicación de distintos plaguicidas (metribuzina, buprofezina, metalaxil, azoxistrobina, iprodione, clorpirifos y dimetoato) reportaron que la actividad lacasa en todas las biomezclas mostró un aumento significativo en tiempos tardíos de evaluación. Contrariamente, la actividad manganeso peroxidasa se mantuvo con niveles cercanos a 0 para todas las biomezclas contaminadas a través del tiempo.

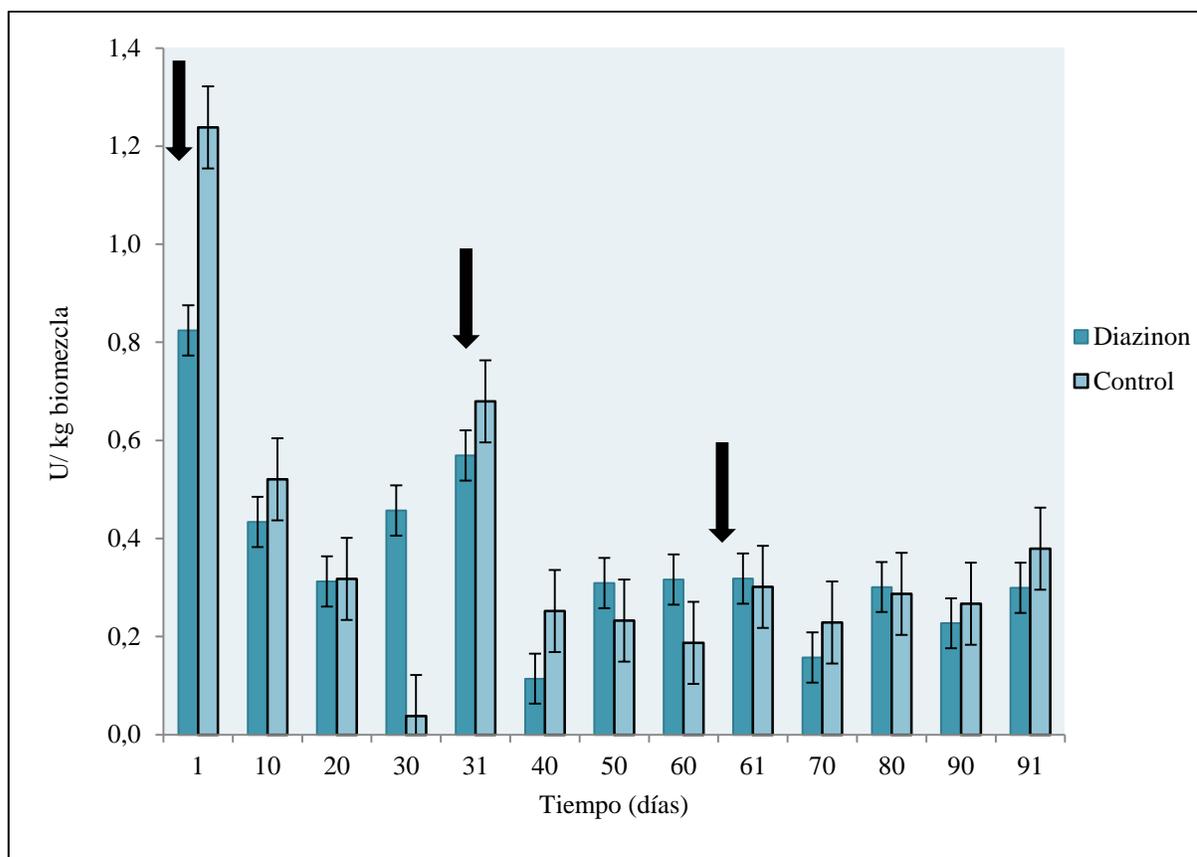


Figura 5. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre la actividad peroxidasa. Flechas indican el tiempo de aplicación.

8.1.3 Actividad fosfatasa La respuesta de los microorganismos a la aplicación de plaguicidas puede ser examinada por la estimación de las actividades fosfatasa, enzimas extracelulares que catalizan la hidrólisis del fósforo orgánico a fósforo inorgánico (Cycón *et al.*, 2010a). La actividad fosfatasa ácida se encuentra graficada en la Figura 6. Los análisis estadísticos muestran que no existen diferencias significativas entre el control y el tratamiento (Anexo 9, 10 11 y 12) con excepción del primer día de la tercera aplicación (Anexo 13) donde la prueba de comparación de medias arrojó diferencias significativas. Por lo que, en general, no se observan diferencias en la actividad fosfatasa ácida con respecto al control, tras cada aplicación de diazinón.

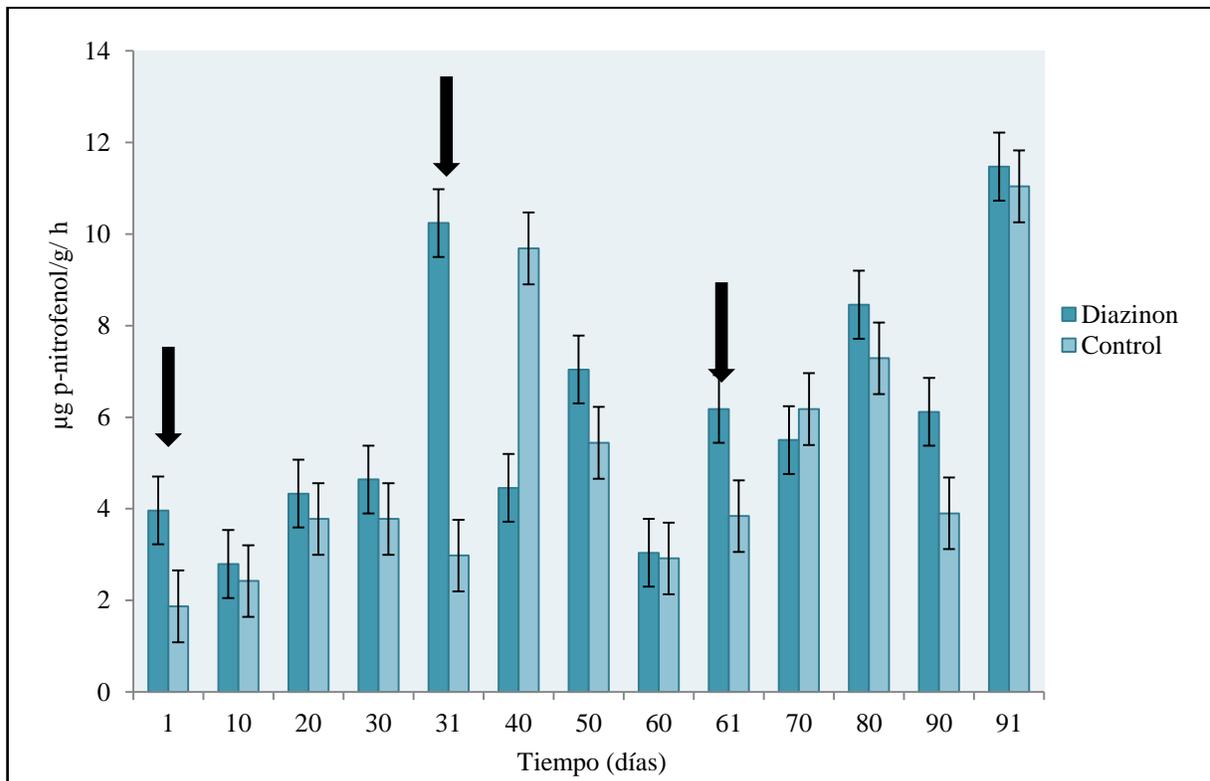


Figura 6. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre la actividad fosfatasa ácida. Las flechas indican el tiempo de aplicación.

En la actividad fosfatasa alcalina (figura 7) no se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con diazinón tras la primera aplicación (Anexo 14). Tras la segunda aplicación se observan aparentes diferencias con respecto al control, sin embargo estas no son significativas (Anexo 15). De la misma manera, tras la tercera aplicación no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento y el control (Anexo 16). La actividad fosfatasa en la biomezcla mostró ser mayor por parte de la fosfatasa alcalina.

Resultados similares fueron encontrados por Cycón *et al.*, (2010a) donde estudiaron el efecto de la aplicación de diazinón a tres dosis 7,35 y 700 mg kg⁻¹ sobre la actividad fosfatasa de suelo franco arenoso y areno arcilloso. Los autores reportaron que las dosis de diazinón aplicadas para ambos suelos aumentaron la actividad fosfatasa ácida, siendo más alta en el suelo franco arenoso. En contraste, los autores reportaron que las dosis 35 y 700 mg kg⁻¹ disminuyó la actividad fosfatasa alcalina en el suelo areno arcilloso, un día después de la aplicación, con valores de 79 y 64 mg kg⁻¹ respectivamente. Contrariamente Cycon *et al.*, (2010b) estudiaron el efecto de tres dosis de una mezcla de fungicidas (15, 75 y 1500 mg kg⁻¹), mancozed y dimetomorfo durante 28 días, frente a la actividad fosfatasa, reportando un efecto negativo sobre la fosfatasa ácida, decreciendo la actividad a medida que se aumentó la dosis de la mezcla de fungicidas, con respecto al control. La actividad fosfatasa alcalina también se vio afectada pero en menor medida con respecto al control.

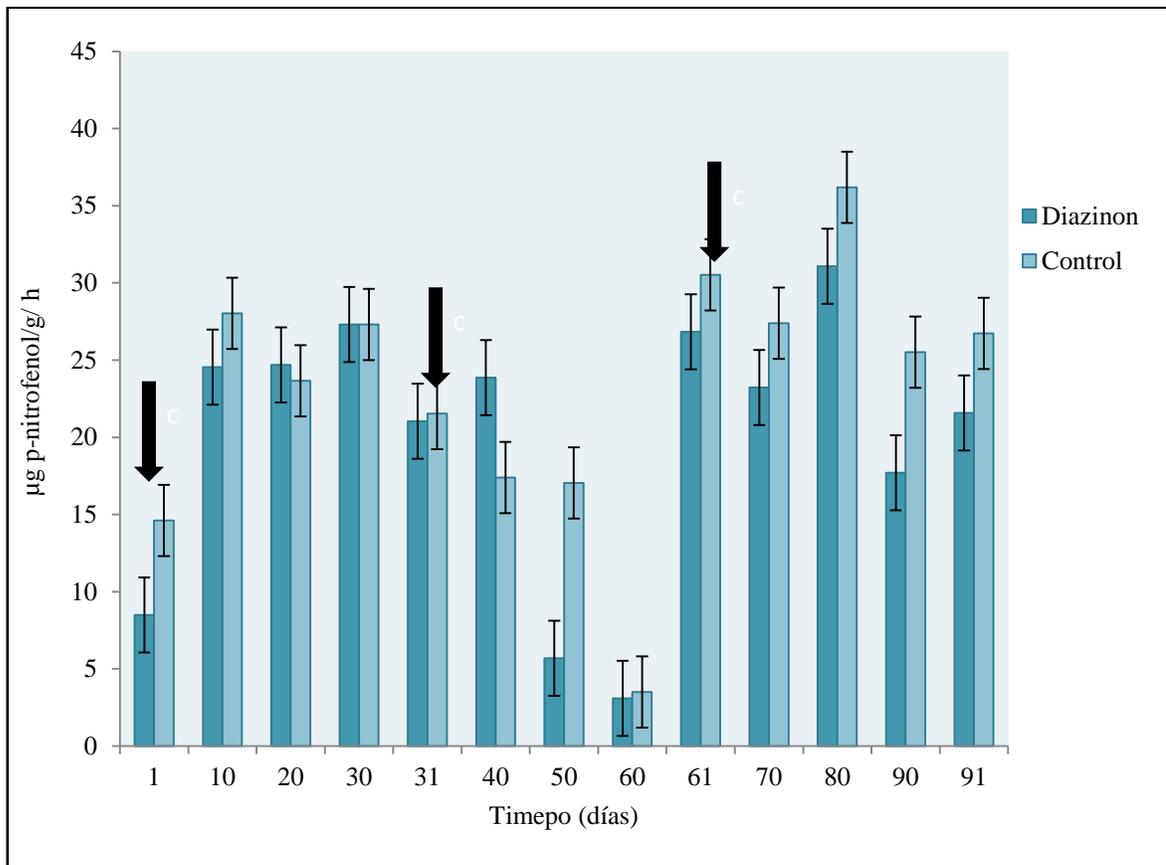


Figura 7. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre la actividad fosfatasa alcalina. Las flechas indican el tiempo de aplicación.

8.1.4 Respiración microbiana. La respiración del suelo proporciona una medida del potencial total de la actividad microbiana y es considerada como un bioindicador del estado del suelo (Gray 1990., Pankhurst et al., 1990).

Los datos registrados de la acumulación del dióxido de carbono en el tiempo se encuentran graficados en la Figura 8. No se observa un efecto perjudicial sobre la respiración microbiana durante 60 días de incubación, mostrando que no existen diferencias entre la biomezcla control y la contaminada con diazinón, en este periodo. Sin embargo a partir de este punto hasta el 90 se observa una disminución de un 17% aproximado en el CO_2 evolucionado, con respecto al control

(25 y 30 mg CO₂ g⁻¹ respectivamente). Contrariamente a los resultados encontrados por Araújo *et al.*, (2003), quienes vieron un aumento de 10-15% en el CO₂ evolucionado en suelos brasileños, tras la aplicación de glifosato a una dosis de 2,16 µg g⁻¹suelo, en comparación con el mismo suelo sin aplicación histórica de glifosato. En otro trabajo Kara *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de topogad (3 kg ha⁻¹) sobre la respiración microbiana del suelo, en cuatro diferentes suelos de monocultivo de papa durante 90 días. Los autores reportaron que la evolución del CO₂ aumentaba significativamente tras la aplicación del herbicida las primeras 3 semanas y luego la respiración decrecía, con respecto al control. Los autores sugirieron que los microorganismos en los primeros días de incubación consumieron en su totalidad el herbicida como fuente de carbón o nitrógeno.

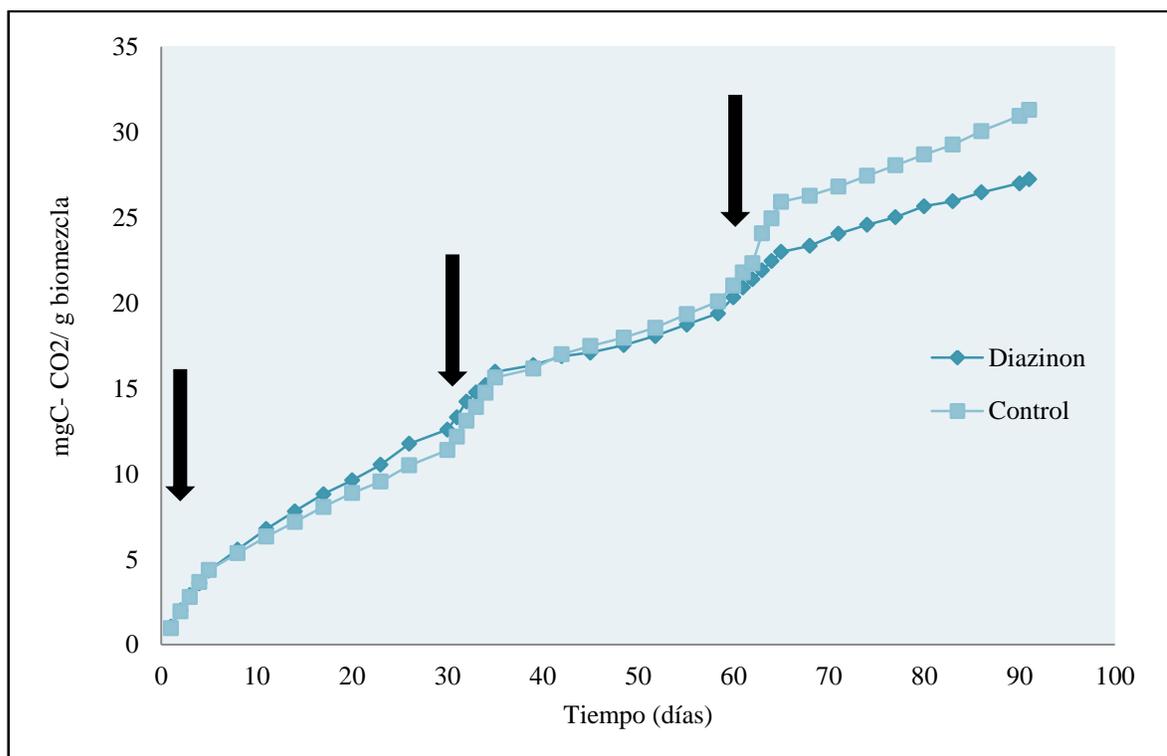


Figura 8. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg⁻¹) sobre la evolución del dióxido de carbono.

8.2 Recuento de microorganismos cultivables

En el recuento de microorganismos cultivables no mostró un gran efecto en los primeros 40 días tras la aplicación de diazinón con respecto al control, con excepción de los actinomicetes (Figura 10) los cuales mostraron ser afectados en un 29% con respecto al control el día 10 de incubación. El número de bacterias cultivables (Figura 11) para el día 60 y 70 mostraron ser afectadas negativamente en un 25% y 33% respectivamente con respecto al control. El número de hongos totales (Figura 12) mostró ser menos sensible a la aplicación de diazinón, no mostrando diferencia los primeros 30 días en relación al control y un aumento en número el día 40 con respecto al control de un 42%. Posteriormente los siguientes días 60 y 70 se observa una disminución en el número de hongos de un 14%. En general, los microorganismos presentes en la biomezcla no fueron afectados de gran manera los 40 días de incubación, sin embargo los resultados muestran una disminución en el número de colonias luego del día 60, coincidiendo con la disminución en la actividad respiratoria los últimos días de incubación con respecto al control. Esto podría deberse a un efecto acumulativo de la segunda y tercera aplicación de diazinón. Si bien los resultados muestran esta baja en el número de colonias, esto no constituye un efecto perjudicial importante. Similares resultados fueron reportados por Digrak y Özcelik (1998) frente a la aplicación de insecticidas organofosforados a una concentración de 1 mg kg^{-1} en suelo, encontrando que los plaguicidas no inhibieron muchos grupos bacterianos y fúngicos, siendo los hongos los menos inhibidos. En otro estudio Digrak y Kazanici (2001) evaluaron el efecto del insecticida isofenfos sobre la microbiota del suelo, reportando que esta no se vio inhibida por la aplicación de los insecticidas y que además, la aplicación de este causo un efecto estimulador resultando con un total de bacterias viables más alto con respecto al control. Contrarios resultados fueron encontrados por Chu *et al.*, (2008) quienes estudiaron el efecto de los insecticidas clorpirifos y clorotalonil combinados sobre los microorganismos del suelo, reportando que la adición de clorpirifos, redujo las poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetes en un 44,1%, 61,1% y 72,8% respectivamente después del primer día de aplicación y en un 86%, 94,1% y 90,8% tras la adición de clorotalonil al doble de la dosis recomendada.

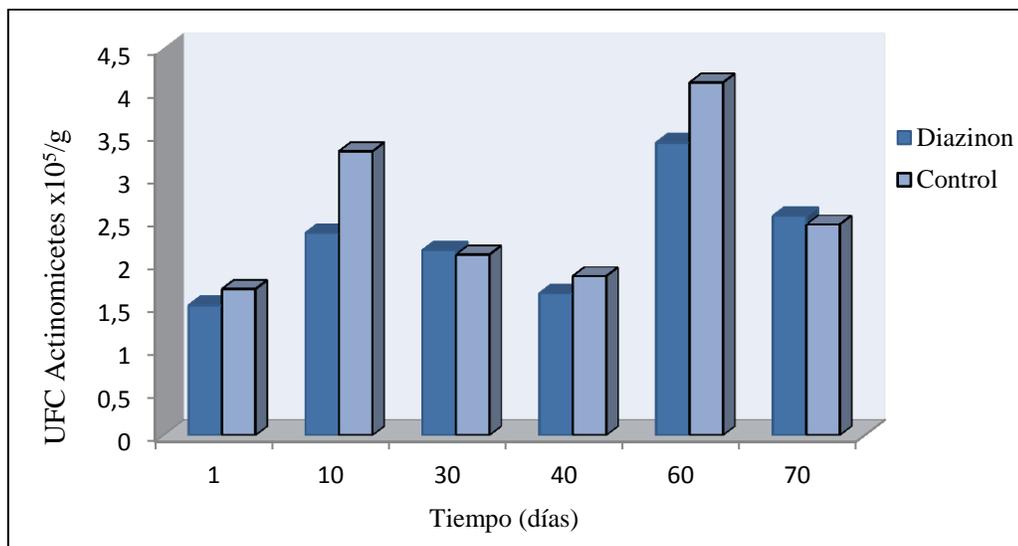


Figura 10. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre el número de actinomicetes cultivables.

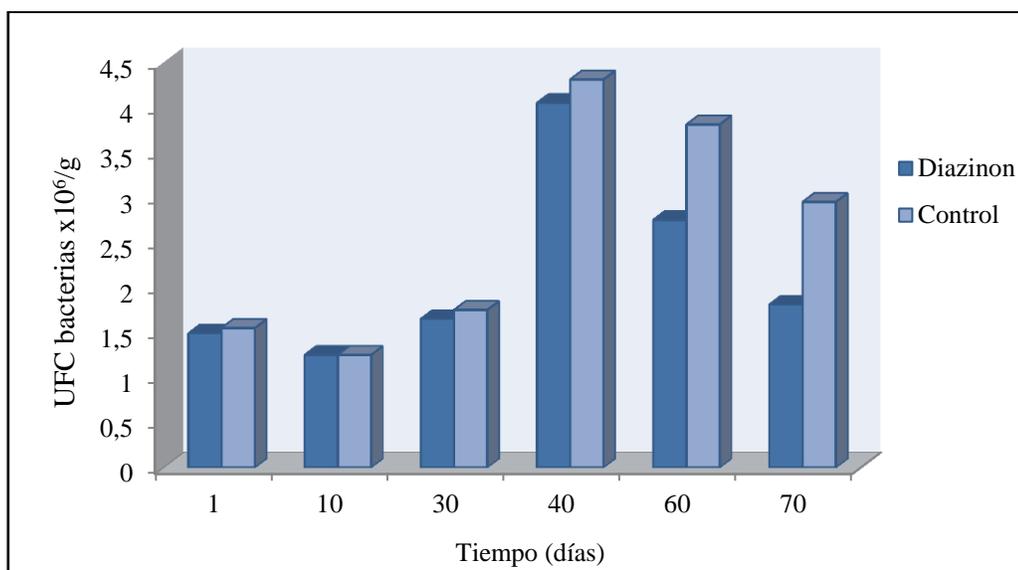


Figura 11. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre el número de bacterias cultivables.

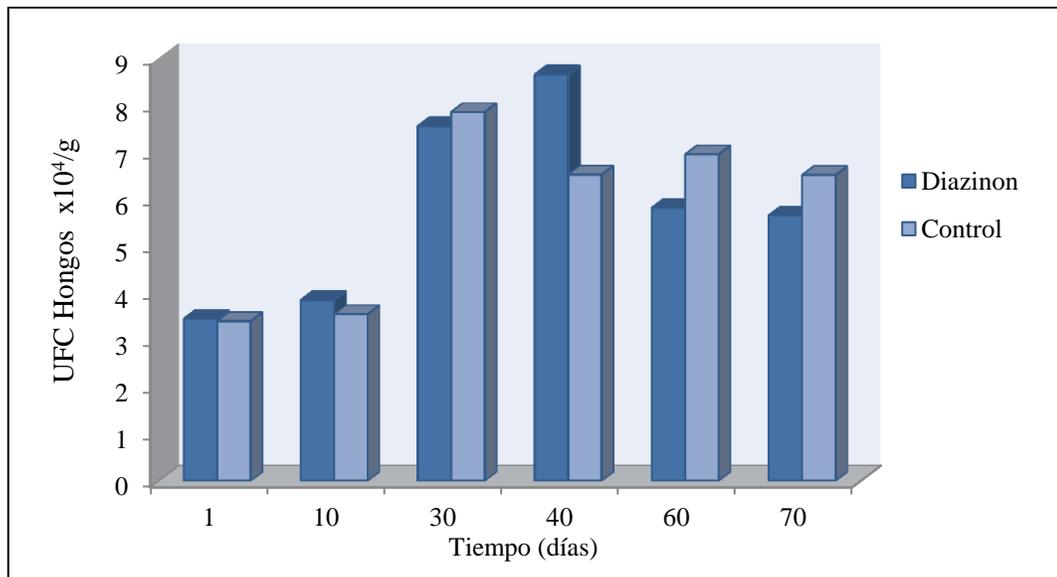


Figura 12. Efecto de 3 aplicaciones sucesivas de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) sobre el número de hongos cultivables.

8.3 Degradación de Diazinón

La degradación de diazinón después de tres aplicaciones sucesivas se muestra en la Figura 9. Los resultados mostraron una rápida degradación inicial tras la primera aplicación, obteniendo una concentración residual de $3,28 \text{ mg kg}^{-1}$ después de 30 días de incubación, posteriormente se observa una degradación más lenta encontrándose una concentración de diazinón residual de $9,7 \text{ mg kg}^{-1}$ a los 60 días y $13,9 \text{ mg kg}^{-1}$ a los 90 días, lo cual coincide con la disminución en la respiración total los últimos días de incubación, junto con la disminución en el número de colonias los días 60 y 70, sin embargo la degradación para las tres aplicaciones fueron sobre un 50% de la concentración aplicada, con porcentajes de 91,3%, 77% y 69%, respectivamente. Similares resultados han sido reportados por Fogg *et al.*, (2003) quienes estudiaron la degradación de clorpirifos, un insecticida organofosforado al igual que diazinón, tras tres aplicaciones sucesivas, reportando una eficiente degradación tras la primera aplicación, sin embargo la tasa de degradación se vio disminuida tras las siguientes aplicaciones, atribuyéndolo a un posible efecto tóxico sobre la comunidad microbiana. Contrariamente Vischetti *et al.*, 2008

reportaron una fuerte degradación del fungicida metalaxil tras repetidas aplicaciones, disminuyendo su vida media de 37 días en la primera aplicación, a 4 días después de la tercera aplicación. Trabajos realizados en suelo por Fang *et al.*, (2008) reportaron que las repetidas aplicaciones de clorpirifos resultó en un aumento significativo de la degradación del insecticida.

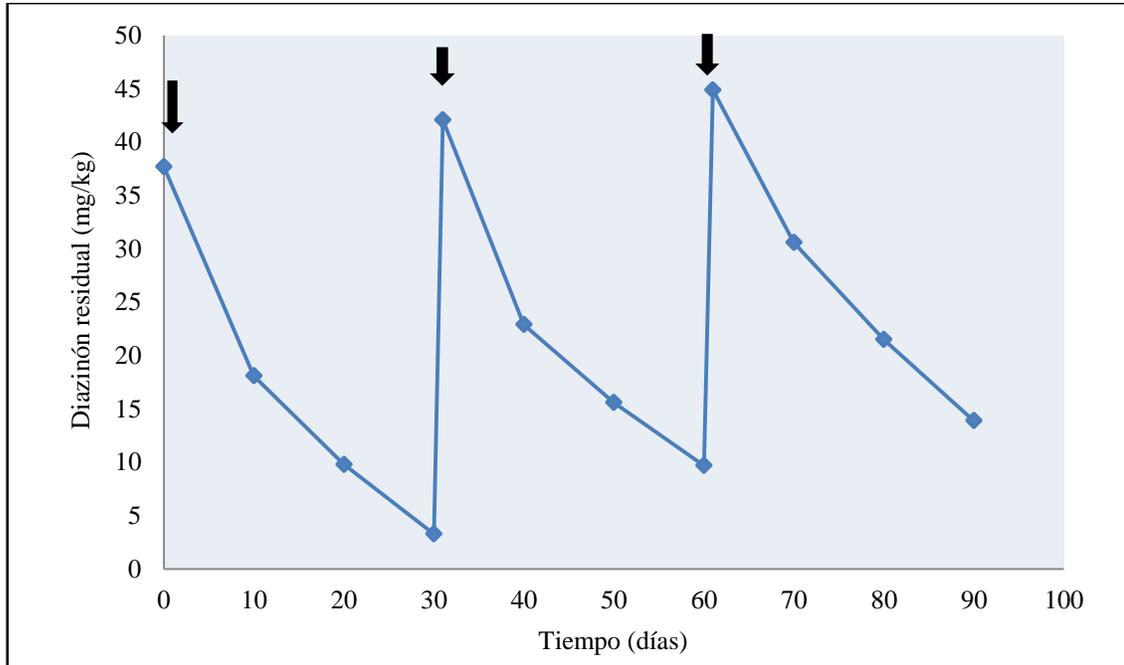


Figura 9. Diazinón residual en la biomezcla después de tres aplicaciones (40 mg ia kg^{-1}) sucesivas.

8.4 Diversidad funcional microbiana

Los índices de diversidad (H' y U) han sido utilizados para evaluar la diversidad funcional microbiana del suelo (Gomez *et al.*, 2006), donde H' indica la riqueza de los microorganismos del suelo (Shannon y Weaver, 1949), mientras que U indica la igualdad u homogeneidad de los microorganismos del suelo (McIntosh, 1967). Los valores de cada índice se encuentran resumidos en el Cuadro 4. Los resultados para el índice de Shannon (H') no muestran diferencias entre el control y el tratamiento con diazinón, indicando que la riqueza de los microorganismos

de la biomezcla no fue aparentemente afectada. Lo mismo se observa para el índice de Uniformidad (U').

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de diazinón (40 mg ia kg^{-1}) en el tiempo sobre el Índice de riqueza de Shannon (H') y de uniformidad (U').

Tratamiento	Tiempo	Shannon (H')	Uniformidad (U')
Diazinón	0	3.01 ± 0.02	0.91 ± 0.01
	10	2.61 ± 0.06	0.89 ± 0.02
	30	3.05 ± 0.06	0.94 ± 0.005
	40	2.99 ± 0.03	0.97 ± 0.003
	60	2.64 ± 0.12	0.84 ± 0.05
Control	0	3.14 ± 0.03	0.94 ± 0.001
	10	2.30 ± 0.05	0.93 ± 0.01
	30	3.09 ± 0.02	0.95 ± 0.01
	40	2.81 ± 0.04	0.91 ± 0.03
	60	2.88 ± 0.02	0.91 ± 0.001

Similares resultados fueron encontrados por Fang *et al.*, (2008) frente a la aplicación repetida de clorpirifos en suelo, donde la riqueza de microorganismos no se vio afectada, pero la Uniformidad (U') se vio disminuida los primeros 3 días después de la primera aplicación, sin embargo, esta fue recuperada gradualmente a lo largo de las tres aplicaciones alcanzando niveles similares al del control. Fang *et al.*, (2009) reportaron que la uniformidad fue afectada inicialmente la primera semana tras la aplicación de clorpirifos y que además esta disminuía a medida que se aumentaba la dosis del insecticida, pero que luego de los 21 días de incubación, esta se recuperaba alcanzando los niveles del control. Los autores reportaron además, que a lo largo del experimento no se observaron fluctuaciones en H' , indicando que la riqueza de los microorganismos no fue afectada. Contrariamente, Singh *et al.*, (2002) reportaron una pequeña

pero significativa reducción en la riqueza de los microorganismos del suelo tras una segunda aplicación de clorpirifos.

8.5 Perfiles del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPPs)

Los perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana, medidos a través de la oxidación de sustratos carbonados, muestran un cambio en la utilización de sustratos en los distintos tiempos evaluados. Al día 1, 29 sustratos de los utilizados por el control, 26 de estos fueron utilizados por el tratamiento (Figura 13). Al día 10 de evaluación, el número de sustratos utilizados por la comunidad bacteriana es menor en comparación al primer día evaluado (24 sustratos), además, se observa que 3 sustratos solo fueron oxidados por el tratamiento (Figura 14). Al día 30 la utilización de los sustratos se recupera en comparación al día 10 con un total de 30 sustratos utilizados, tanto para el control como para el tratamiento con diazinón, no observándose grandes diferencias con respecto al control (Figura 15). Al día 40 se observan diferencias en la utilización de sustratos, donde 30 sustratos carbonados fueron utilizados en el tratamiento con diazinón, mientras que en el control fueron utilizados 25 (Figura 16). Al día 60 (Figura 17), contrariamente al día 40, se observa que un número menor de sustratos fueron utilizados por el tratamiento, con 27 sustratos utilizados, mientras que en el control fueron utilizados 30 sustratos. Al día 90 de evaluación (Figura 18), un total de 29 sustratos fueron utilizados tanto por el control como por el tratamiento, pero en menor magnitud en comparación a los días anteriores evaluados, mostrando bajos valores de absorbancia. En general se observaron cambios en la utilización de sustratos a través de los tiempos evaluados, indicando un cambio a nivel fisiológico de las comunidades bacterianas tras la aplicación de diazinón. Similares resultados fueron encontrados por Ratcliff *et al.*, (2006) quienes estudiaron los CLPPs generados por la utilización de sustratos frente a la aplicación de glifosato, reportando que una aplicación a altas dosis mostraba cambios en la utilización de sustratos a través del tiempo, presentando una mayor utilización de sustratos carbonados por parte de la comunidad bacteriana con respecto al control sin aplicación del herbicida.

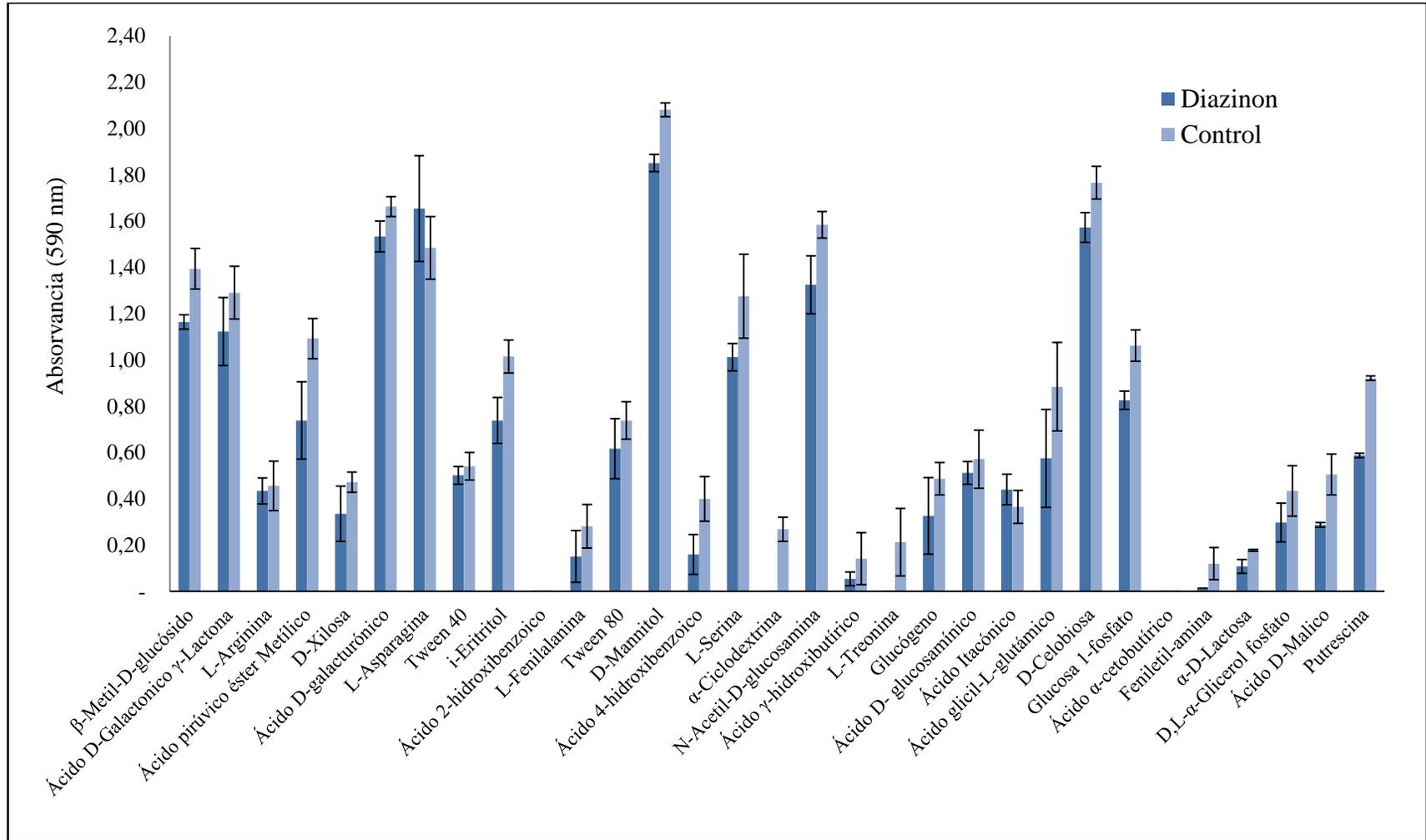


Figura 13. Perfil del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) al día 1 de evaluación.

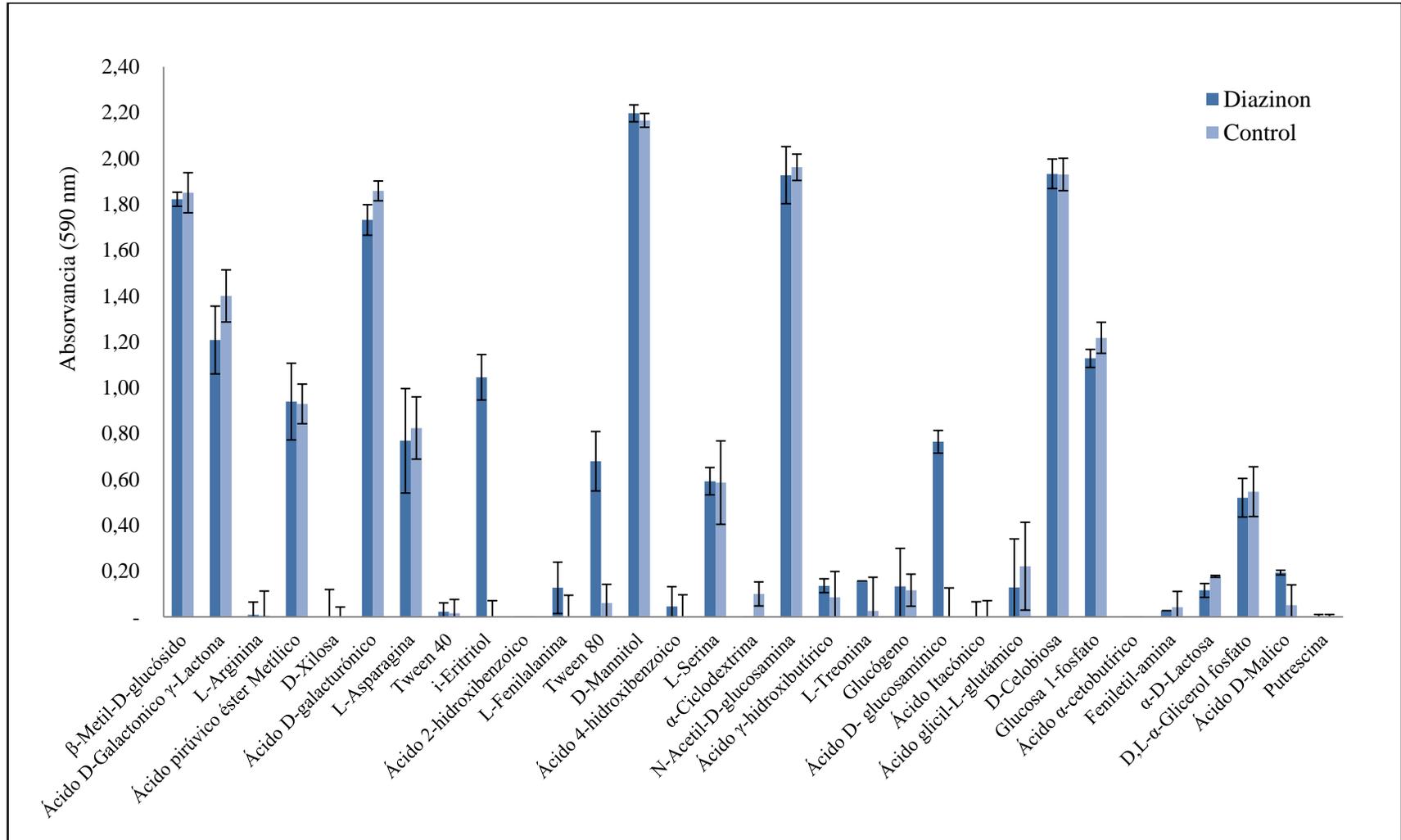


Figura 14. Perfil del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) al día 10 de evaluación.

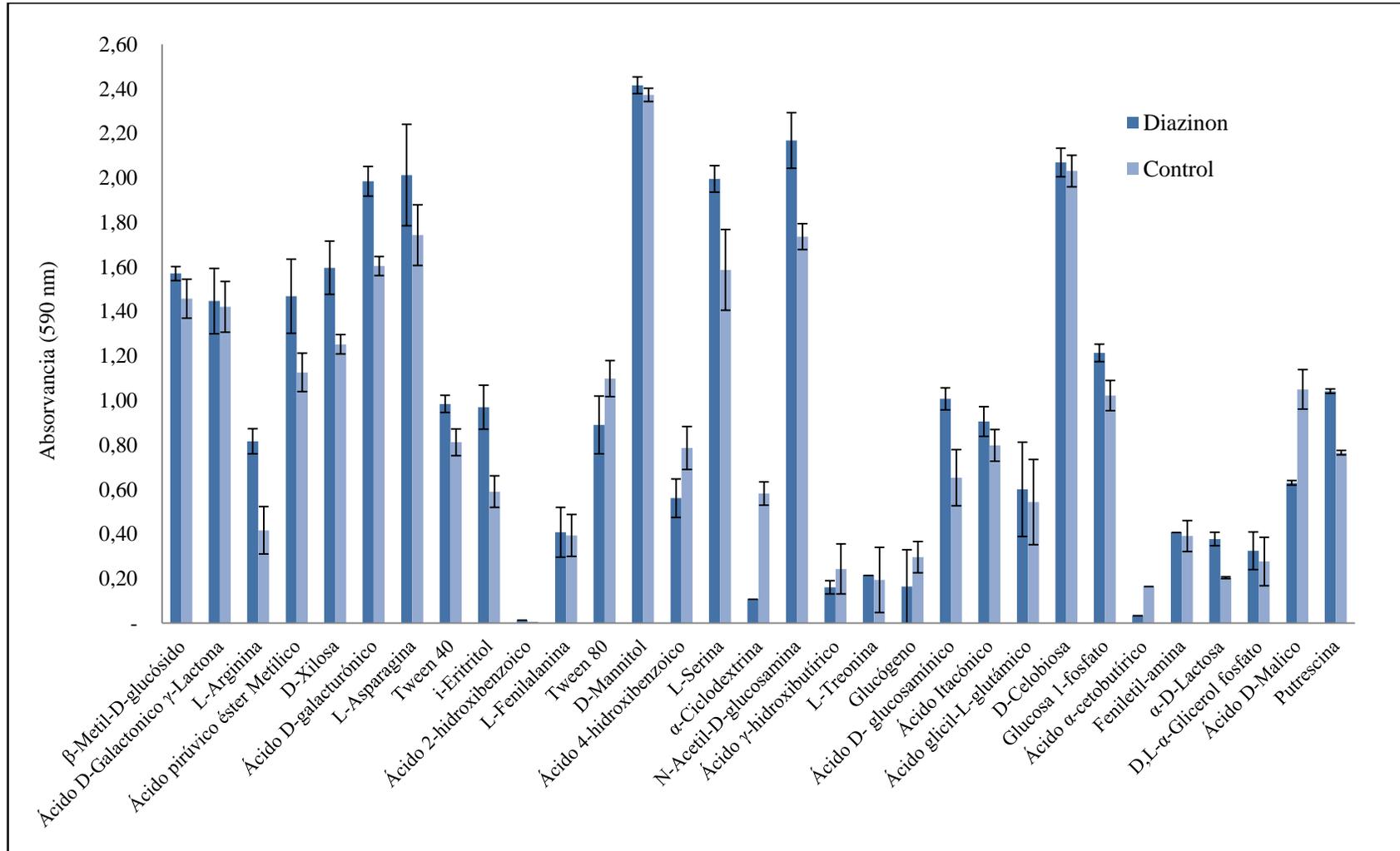


Figura 15. Perfil del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) al día 30 de evaluación.

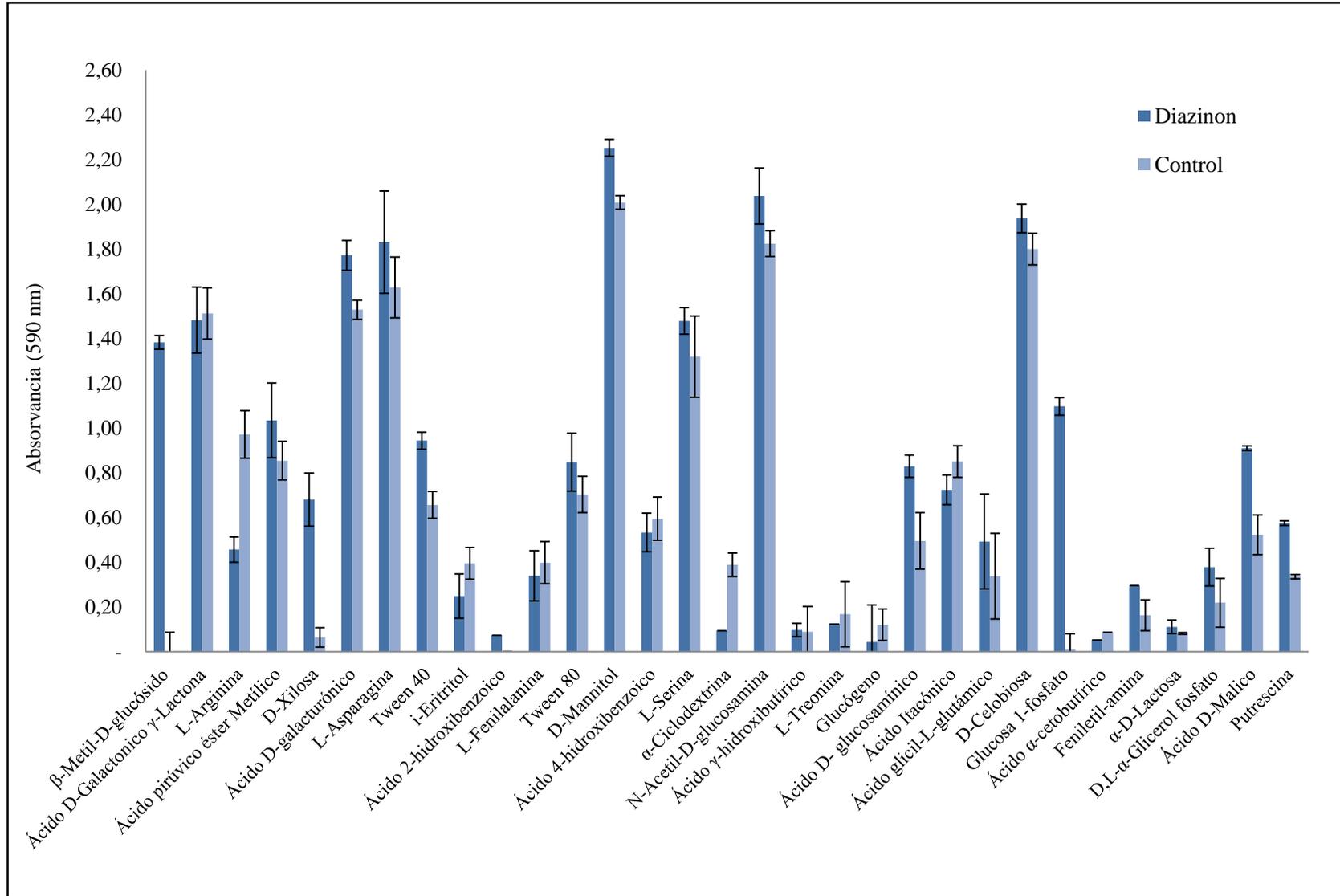


Figura 16. Perfil del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) al día 40 de evaluación.

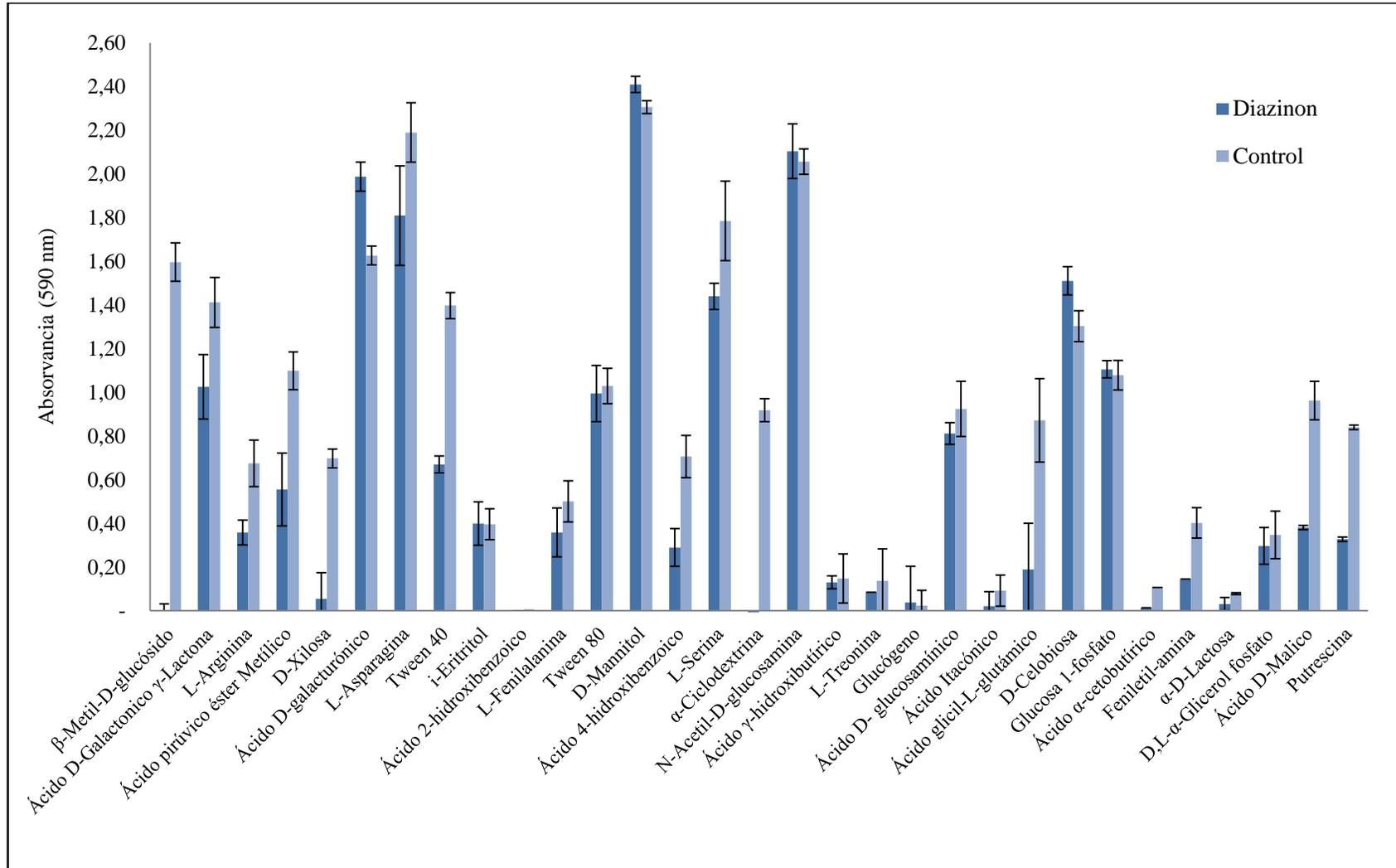


Figura 17. Perfil del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) al día 60 de evaluación.

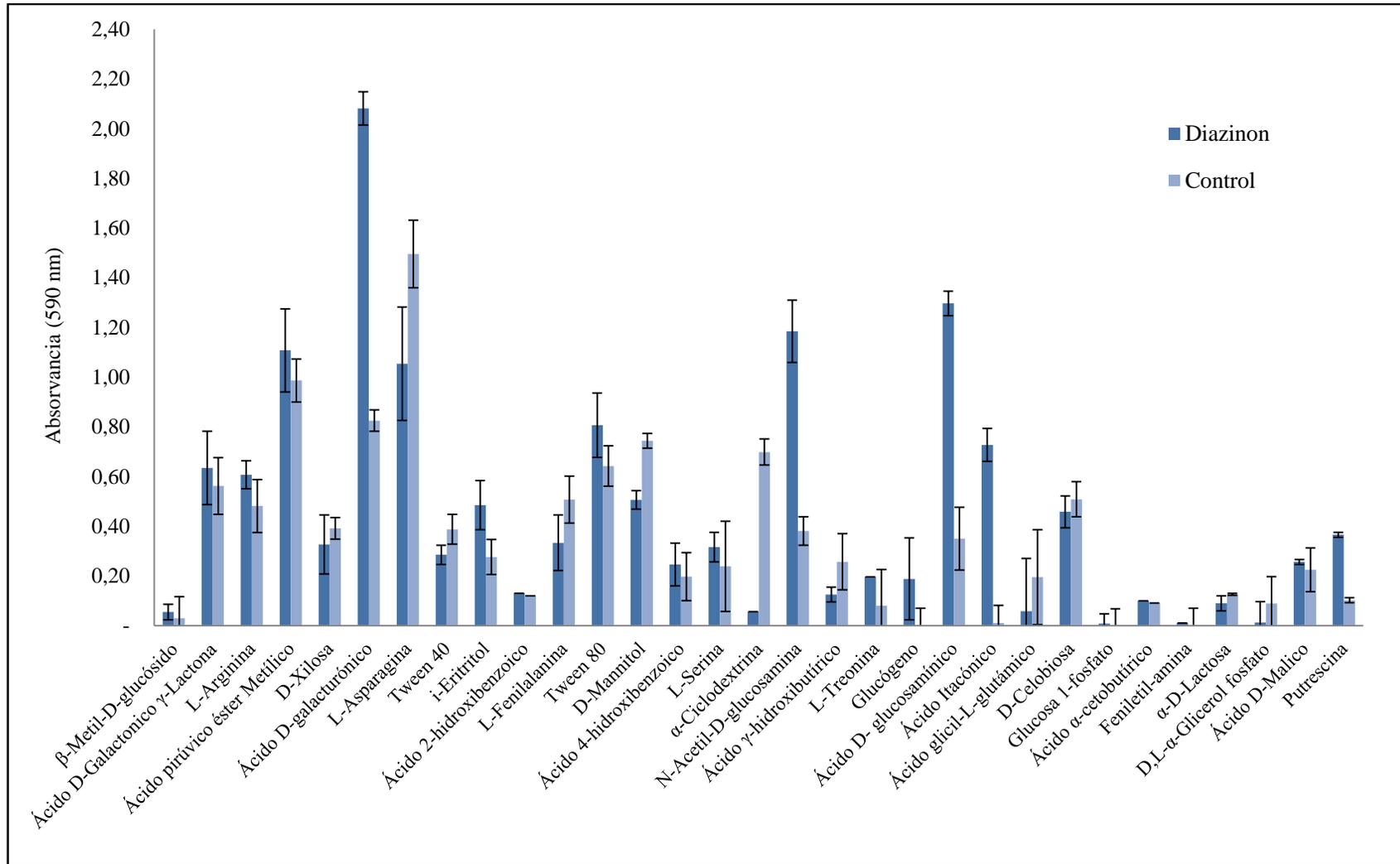


Figura 17. Perfil del nivel fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) al día 90 de evaluación.

8.6 Análisis de la comunidad fúngica

El análisis de las comunidades fúngicas mediante DGGE muestra diferencias en los patrones de bandas en los distintos días evaluados (Figura 18). Al comparar el perfil de bandas hasta el día 70 se observa una disminución de bandas en la parte superior del gel con respecto al control. Posteriormente las bandas en esta zona del gel no muestran diferencias visibles con respecto a sus controles correspondientes. Sin embargo, desde el día 30 hasta el día 70 de tratamiento, se observa la aparición de una banda con respecto a los controles correspondientes, al centro del gel. La desaparición de bandas en la parte superior del gel, indica que ciertos grupos fúngicos se vieron afectados inicialmente por la aplicación de diazinón, sin embargo en los últimos 20 días de evaluación estos grupos fueron recuperados. La aparición de bandas diferenciales en los tratamientos con diazinón indica que grupos fúngicos fueron estimulados por la presencia de este plaguicida, esta estimulación podría deberse a la utilización de este compuesto como fuente de carbono por parte de este grupo fúngico en particular. Similares resultados fueron observados por Bending *et al.*, (2007) quienes evaluaron el impacto de la aplicación tres fungicidas azosistrobin, tebuconazol y clorotalonil sobre la comunidad microbiana en suelo, observando un cambio sobre la comunidad fúngica tras la aplicación de los fungicidas. Los autores reportaron un cambio en el patrón de bandas; con bandas presentes en el control las cuales estaban ausentes o de baja intensidad en los tratamientos. Coppola *et al.*, (2011) estudiaron el efecto de la aplicación de una mezcla de fungicidas (penconazol, dimetomorfo, metalaxil, azoxistrobin, ciprodinil y fludioxonil) sobre la comunidad fúngica en un lecho biológico, reportando un cambio drástico visible en el patrón de bandas tras la aplicación de estos compuestos, viéndose una reducción en las especies fúngicas con respecto al control.

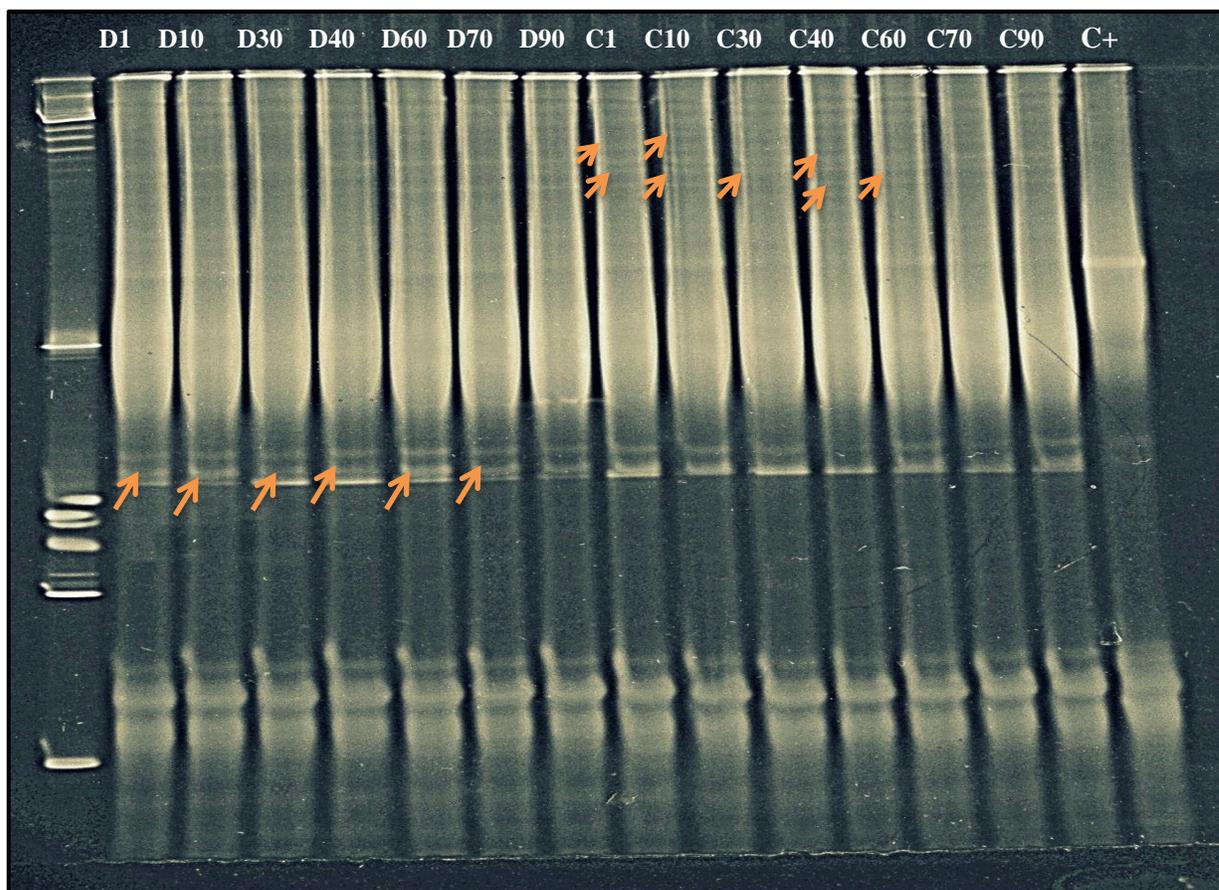


Figura 18. Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) de comunidades de hongos en biomezcla contaminada (diazinón 40 mg ia kg^{-1}) y biomezcla sin contaminar. La letra D indica el tratamiento con diazinón, la letra C indica el control sin aplicación y los números indican los días evaluados. Las flechas indican bandas diferenciales.

9. CONCLUSIONES

La actividad FDA de la biomezcla no fue afectada por la aplicación de diazinón, viéndose estimulada solo al final de la primera aplicación.

La actividad peroxidasa solo se vio afectada al primer día tras la primera aplicación de diazinón, luego la actividad es recuperada con respecto al control, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

La actividad fosfatasa no fue afectada por la aplicación de diazinón, al igual que la actividad fosfatasa alcalina. Se encontró una mayor actividad de la fosfatasa alcalina en la biomezcla en comparación a la fosfatasa ácida.

La actividad respiratoria no se vio afectada durante los primeros 60 días de incubación, sin embargo, los últimos 30 días de evaluación, esta se vio disminuida en un 17%.

El número de microorganismos cultivables no se vio afectado tras la aplicación de diazinón, con excepción de los días 60 y 70 donde se observa una disminución en número, sin embargo esta disminución fue menor al 30%.

La degradación de diazinón fue eficiente para las tres aplicaciones, mostrando un porcentaje de degradación sobre el 50%, sin embargo la eficiencia fue disminuida tras cada aplicación, alcanzando valores de degradación de 90, 77 y 69% para la primera, segunda y tercera aplicación respectivamente, coincidiendo con la disminución en la respiración microbiana los últimos 20 días de estudio.

La diversidad funcional microbiana, analizada mediante los índices de diversidad, no afectó la riqueza y homogeneidad microbiana tras la aplicación de diazinón en la biomezcla.

Los perfiles fisiológicos de la comunidad bacteriana, monitoreada a través de la utilización de sustratos carbonados, presentaron cambios a través del tiempo tras la aplicación de diazinón.

La aplicación de diazinón provoca cambios en la comunidad fúngica a través de los distintos tiempos evaluados mediante DGGE, presentando bandas diferenciales, indicando que ciertos grupos fúngicos fueron afectados o estimulados tras la aplicación de diazinón.

Si bien la diversidad y comunidad microbiana presentaron un cambio por la aplicación de diazinón, estos cambios no afectaron la capacidad degradadora del lecho biológico. No obstante los grupos fúngicos y bacterianos puntuales que se vieron afectados por la aplicación diazinón, deben ser considerados para posteriores análisis.

10. LITERATURA CITADA

- Adesodun, J.K., Davidson, D.A. y Hopkins, D.W.** 2005. Micromorphological evidence for changes in soil faunal activity following application of sewage sludge and biocide. *Applied soil ecology*. 29: 39-45.
- Alef, K.** 1995. Estimation of soils respiration. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Alef, K. and Nannipieri, P. (eds.) Academic Press. London. Pp 215–216.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R., y Abarkeli, R.B.** 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*. 52: 799–804
- Ayansina, A.D.V y Oso, B.A.** 2006. Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. *African journal of biotechnology*. 5:129-132.
- Báez, M., Rodríguez, M., Lastra, O., Peña, A., De La Colina, C. y Sanchez-Rasero, F.** 1996. Residuos de plaguicidas en aguas superficiales de la V región de Chile. Estudio prospectivo. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 41:271-276.
- Barr, D y Aust, S.** 1994. Pollutant degradation by white rot fungi. *Rev Environ Contam Toxicol.* 138:49–72.
- Barra, R. Cisternas, M., Urrutia, R., Pozo, K., Pacheco, P., Parra, O. y Focardi, S.** 2001. First reporto in chlorinated pesticide deposition in a sediment core from a small lake in central Chile. *Chemosphere*. 45:749-757.
- Baxter, J. y Cummings, S.P.** 2008. The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. *Journal of applied microbiology*. 104:1605-1616.
- Bending, G., Rodríguez-Cruz, M., Lincoln, S.** 2007. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere*. 69: 82-88.
- BIOLOG**, 2011. Microbial Community Analysis with EcoPlates™. (En línea) Visitada el 05 de Agosto, 2011.
<<http://www.biolog.com/products/?product=Microbial%20Community%20Analysis%20with%20EcoPlates%26%23x2122%3B>>.
- Brunius, G.** 1980. Technical aspects of 3060-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Current Biology*. 4, 321–323.
- Castillo M.d.P, Torstensson L, Stenström J.** 2008. Biobeds for environmental protection from pesticide use, a review. *J Agric Food Chem*. 56(15):6206–6219.

- Castillo, M. d. P., Ander, P., y Stenström, J.** 1997. Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnol. Tech.* 11: 701-706.
- Castillo, M. P., y Torstensson, L.** 2007. Effect of Biobed Composition, Moisture, and Temperature on the Degradation of Pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5725-5733
- Castillo, M. P., Ander, P., Stenstrom, J., y Torstensson, L.** 2000. Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in two solid substrate fermentation systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 16: 289-295.
- Castillo, M. P., Von Wirén-Lehr, S., Scheunert, S., y Torstensson, L.** 2001. Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biol Fertil Soils.* 33:521–528
- Castillo, M., Andersson, A., Ander, P., Stenstrom, J. y Torstensson, L.** 2001. Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 17: 627-633.
- Cea, M., Jorquer, M., Rubilar, O., Langer, H., Tortella y G., Diez, M.C.** 2010. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol by *Anthracoxyllum discolor* and its effect on soil microbial community. *Journal of Hazardous Materials.* 181: 315–323.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M. y Sanyal N.** 2008. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of microbiology.* 48:114-127
- Chu, X., Fang, H., Fan, X., Wang, X., Shan, M., Feng, B. y Yu, Y.** 2008. Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorotalonil and their effects on soil microbial populations. *Journal of environmental science.* 20:464-469.
- Coppola, L., Castillo, M.d.P., Monaci, E., y Vischetti, C.** 2007. Adaptation of the Biobed Composition for Chlorpyrifos Degradation to Southern Europe Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 56: 396-401.
- Coppola, L., Comitini, F., Casucci, C., Milanovic, V., Monaci, E., Marinozzi, M., Taccari, M., Ciani, M., y Vischetti, C.** 2011. Fungicides degradation in an organic biomixture: impact on microbial diversity. *New Biotechnology.* 29: 99-106.
- Cycón M., Piotrowska-Seget Z., y Kozdrój J.** 2010a. Microbial characteristics of sandy soil exposed to diazinon under laboratory conditions. *World J Microbial Biotechnol.* 26:409-418.

- Cycón, M., Piotrowska, Z. y Kozdroj, J.** 2010b. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International biodeterioration and biodegradation*. 64:316-323.
- Digrak, M. y Kazanici, F.** 2001. Effect of some organophosphorous insecticide on soil microorganisms. *Turkey journal Biology*. 25:51-58.
- Digrak, M. y Özçelik S.** 1998. Effect of some pesticides on soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (6):916-922.
- Dumontet S, Perucci P y Bufo AS.** 1997. Soil organic amendments and herbicidal treatments: effect on soil microbial biomass. *Actes du XXVII Congres du Groupe Francais des Pesticides*. Orleans, France. Pp. 211.
- Dutta, M., Sardar, D., Pal, R. y Kole, R. K.** 2010. Effect of chlorpyrifos on microbial biomass and activities in tropical clay loam soil. *Environ Monit Assess.* 160:385–391
- Eisenhauer, N., Klier, M., Partsch, S., Sabais, C.W., Scherber, Ch., Weisser, W. y Scheu, S.** 2009. No interactive effects of pesticide and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Applied soil ecology*. 42:31-36.
- Fang, H., Yu, Y., Chu, X., Wang, X., Yang, X. y Yu, J.** 2009. Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *Journal of environmental science*. 21:380-386.
- Fang, H., Yu, Y., Wang, X., Chu, X., Pan, D. y Yang, E.** 2008. Effects of repeated applications of chlorpyrifos on its persistence and soil microbial functional diversity and development of its degradation capability. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 81(4):397-400.
- Fenlon, KA., Jones, KC., y Semple, KT.** 2007. Development of microbial degradation of cypermethrin and diazinon in organically and conventionally managed soils. *J Environ Monit.* 9:510-515.
- Fischer, P., Bach, M., Burhenne, J., Spiteller, M., y Frede, H.G.** 1996. Pesticides in streams. Part 3: non-point and point sources in small streams. *DGM*. 40, 168–173.
- Floch, C., Chevremont, A., Joanico, K., Capowiez, Y. y Criquet, S.** 2011. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog Ecoplates. *European Journal of soil Biology*. 47, 256-263.
- Focardi, S., C. Fossi, C., Leonzio, S., Corsolini y O. Parra.** 1996. Persistent organochlorine residues in fish and water birds from the Biobio River, Chile. *Environ. Monitor. Assess.* 43: 73-92.

- Fogg, P. y Boxall, A.** 2004. Leaching of Pesticides from Biobeds: Effect of Biobed Depth and Water Loading. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6217–6227.
- Fogg, P., y Boxall, A.** 2003b. Degradation of Pesticides in Biobeds: The Effect of Concentration and Pesticide Mixtures. *Journal of agricultural and food chemistry.* 51: 5344-5349.
- Fogg, P., Boxall, A., Walker, A., y Jukes, A.** 2004. Degradation and leaching potential of pesticides in biobed systems. *Pest Manag Sci.* 60:645–654.
- Fogg, P., Boxall, A., Walker, A., y Jukes, A.** 2003a. Pesticide degradation in a 'biobed' composting substrate. *Pest Management Science.* 59: 527-537.
- Garland, J.L., y Mills, A.L.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology.* v.57, p. 2351-2359.
- Garland, J.L., y Mills, A.L.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology.* 57: 2351-2359.
- Gianfreda, L., y J. M. Bollag.** 2002. Isolated enzyme for the transformation and detoxification of organic pollutants, Marcel Dekker edition, New York.
- Gigliotti, C., Allievi, L., Salardi, C., Ferrari, F. y Farini, A.** 1998. Microbial ecotoxicity and persistence in soil of the herbicide bensulfuran methyl. *Journal environmental Science and health.* 33:399-409.
- Gomez, E., Ferreras, L., y Toresani, S.** 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology.* 97, 1484–1489.
- Gómez, M., Martínez-Toloedo, M.V., Salmerón, V., Rodelas, B., y Gonzáles-López, J.** 1999. Influence of the insecticides profenofos and diazinon on the microbial activities of *Azospirillum brasilense*. *Chemosphere.* 39: 945-957.
- Gray, T. R. G.** 1990. Methods for studying the microbial ecology of soil. In R. Grigorova, & J. R. Norris (Eds.), *Methods in microbiology.* 22: 309–342.
- Green, V.S., Stott, D.E., y Diack, M.** 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology & Biochemistry.* 38: 693–701.
- Gregoire, C., Elsaesser, D., Huguenot, D., Thierry, Lebeau, J.L., Annalisa, Merli., Robert, Mose6., Elodie, Passeport., Sylvain, Payraudeau., Tobias, Schütz., Ralf, Schulz., Gabriela, Tapia-Padilla., Julien, Tournebize., Marco, Trevisan., y Adrien, Wanko.** 2009. Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems *Environmental Chemistry Letters.* 7: 205-231

- Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G. y Zhang, H.** 2010. Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of environmental science*. 22:134-141.
- Hazardous Substances Data Bank**, 2011. (En línea) Visitado el 14 de Agosto, 2011. <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>>
- Helweg A, Bay H, Hansen H.P.B, Rabolle M, Sonnenborg A, y Stenvang L.** 2002. Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82:583–590.
- Henriksen, V., Helweg, A., Spiliid, H., Felding, G., y Stenvang, L.** 2003. Capacity of model biobeds to retain and degrade mecoprop and isoproturon. *Pest Management Science*. 59: 1076-1082.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. y Wellington, E. M. H.** 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol.* 63, 3233-3241.
- Hildebrandt, A., Lacorte, S. y Barceló, D.** 2007. Assessment of priority pesticides, degradation products and pesticide adjuvant in groundwater and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Anal Bioanal Chem.* 387:1459-1468.
- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M., y Nasu, M.** 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* 32:129–141.
- Jaeken P, y Debaer C.** 2005. Risk of water contamination by plant protection products (PPP) during pre- and post treatment operations. *Annu Rev Agric Eng.* 4: 93-114.
- Johnsen, K., Jacobsen, C., Torsvik, V. y Sorensen, J.** 2001. Pesticide effect on bacterial diversity in agricultural soils-a review. *Biology and fertility soils.* 33:443-453.
- K. C. Ting y G. S. Tamashiro.** 1996. Off-line high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction clean-up for confirmation of pesticide residues in fresh produce by gas chromatography-mass spectrometry *J. Chromatogr.* 745, 455.
- Kanazawa, J.** 2004. Biodegradability of pesticides in water by microbes in activated sludge, soil and sediments. *Environ Monit Assess.* 9:57-70.
- Kara, E.E., Arli, M., y Uygur, V.** 2004. Effects of the herbicide Topogard on soil respiration and, nitrification, and denitrification in potato-cultivated soils differing in pH. *Biol Fertil Soils.* 39: 474-478.

- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., Karpouzas, D.G., y Menkissoglu-Spiroudi, U.** 2010. Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere*. 80: 914–921.
- Karpouzas, D. y Capri, E.** 2006. Risk analysis of pesticides applied to rice paddies using RICEWQ 1.6.2v and RIVWQ 2.02. *Paddy Water Environment*. 4:29-38.
- Karpouzas, D.G., Karanasios, E., y Menkissoglu-Spiroudi, U.** 2004. Enhanced microbial degradation of cadusafos in soil from potato monoculture demonstration and characterization. *Chemosphere*. 56: 549-559.
- Kotterman MJJ, Vis EH, y Field JA.** 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl Environ Microbiol*. 64(8):2853–2858.
- Li, XY., Su, ZC., Li, X., Zhang, CG., y Zhang, HW.** 2010. Assessing the effects of acetochlor on soil fungal communities by DGGE and clone library analysis. *Ecotoxicology*. 19: 1111–1116.
- Lundgren, B.** 1981. Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos*. 36: 17–22.
- Luo, HF., Qi, HY., y Zhang, HX.** 2004. The impact of acetochlor on the bacterial diversity in soil. *Acta Microbiol Sin*. 44: 519–522.
- Mahugija J. y Kishimba M.** 2007. Organochlorine pesticides and metabolites in young leaves of *Mangifera indica* from sites near a point source in Coast region, Tanzania. *Chemosphere*. 68: 832-837.
- Mahugija, J. y Kishimba, M.** 2005. Concentrations of pesticide residues in grasses and sedges due to point source contamination and the indications for public health risks, Vikuge, Tanzania. *Chemosphere*. 61:1293-1298.
- Marshall, M., Cocolin, L., Mills, D., y VanderGheysynt, J.** 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 934-948.3
- Martínez-Toledo MV, Salmerón V, y Gonzáles-López J.** 1993. Effects of diazinon and quinalphos on some functional groups of soil microflora. *Toxicol Environ Chem*. 37: 165-172.
- Mason, P. J.; Foster, I. D. L.; Carter, A. D.; Walker, A.; Higginbotham, S.; Jones, R. L.; y Hardy, I. A. J.** 1999. Relative importance of point source contamination of surfacewaters: RiverCherwell catchment monitoring study. In *Human and environmental exposure to xenobiotics*; Del Re, A. A. M., Brown, C., Capri, E., Errera, G., Evans, S. P., Trevisan, M., Eds.; La Goliardica Pavese. Pavia, Italy, 405-412.

- McIntosh, R. P.** 1967. An index of diversity and the relation of certain concepts to diversity. *Ecology*. 48, 392–404
- Monkiedje, A., Llori, M., y Spiteller, M.** 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 1939-1948.
- Müller K, Bach M, Hartmann H, Spiteller M, y Frede H.** 2002. Point- and nonpoint-source pesticide contamination in the Zwesten Ohm Catchment, Germany. *J Environ Qual*. 31: 309-318.
- Muyzer, G., De Wall, E., y Uitterlinden, A.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. 59: 695-700.
- Nahas, E.** 2002. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia, Campinas*. 61:267-275.
- Nannipieri P, Gregos S y Ceccanti B.** 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil Biochemistry*. Vol. 6. Smith JL and Paul EA(eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA. Pp. 293–354.
- Newmann, M., Schulz, R., Schäfer, K., Müller, W., Mannheller, W. y Liess, M.** 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Water Research*. 36: 835-842.
- Oberson, A; Bessonm, JM; Maire, N y Sticher, H.** 1996. Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biol Fertil Soils*. 21: 138-148.
- Omar, S. y Abdel-Sater, M.** 2001. Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. *Water, Air, and Soil Pollution*. 127, 49-63.
- Pankhurst, CE., Hawke, BA., McDonald, HJ., Kirby, CA., Buckerfield, JC., Michelsen, P., Brien, KA., Gupta, VVSR y Doube, BM.** 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Aust J Exp Agr*. 35:1015–1028.
- Paszczynski, A y Crawford, RL.** 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Prog*. 11(4):368–379.
- Perucci, P., Vischetti, C. y Battistoni, F.** 1999. Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions. *Soil Biol Biochem*. 31:195–204.

- Pozo, C., Martínez-Toledo, M., Rodelas, B., y González-López, J.** 2003. Response of soil microbiota to the addition of 3,3-diaminobenzidine. *Applied Soil Ecology*. 23: 119-126.
- Ratcliff, A., Busse, M. y Shestak, C.** 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soil. *Applied soil ecology*. 34:114-124.
- Richardson, AE; Hadobas, PA y Hayes, JE.** 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant J*. 25: 641-649.
- Saeki, M. y Toyota, K.** 2004. Effect of bensulfuron-methyl (a sulfonylurea herbicide) on the soil bacterial community of a paddy soil microcosm. *Biology and Fertility Soils*. 40:110-118.
- Sánchez, ME., Estrada, IB., Martínez, O., Martín-Villacorta, J., Aller, A., y Morán, A.** 2004. Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. *Chemosphere*. 57:673-679.
- Schnü rer, J., y Rosswall, T.** 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*. 6: 1256–1261.
- Shannon, CE., y Weaver, W.** 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. Illinois, USA: University of Illinois Press.
- Singh, BK., Walker, A., y Wright, DJ.** 2002. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics. *Bull Environ Contam Toxicol*. 69:181–188.
- Singh, J. y Singh, DK.** 2005. Bacterial, azotobacter, actinomycetes, and fungal population in soil after diazinon, imidacloprid, and lindane treatments in groundnut (*Arachis hypogea* L.) fields. *J Environ Sci Health B*. 40: 785-800.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Van Elsas, J.D., y Wernars, K.** 1999. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2614.
- Subhani, A., El-ghamry, A., Changyong, H. y Jianming, X.** 2000. Effects of pesticides (herbicides) on soil microbial biomass-A Review. *Pakistan Journal of biological science*. 3(5): 705-709.
- Swisher, R., y Carroll, G.C.** 1980. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbial Ecology*. 6, 217–226.
- Tabatabai, MA.** 1994. Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Ed. A.Klute. Second Edition. SSSA, Madison, Pp. 788-826.

- Tarazona, J.V., Fresno, A., Aycard, S., Ramos, C., Vega, M.M. y Carbonell, G.** 2000. Assessing the potential hazard of chemical substances for the terrestrial environment. Development of hazard classification criteria and quantitative environmental indicators. *Sci. Total Environ.* 247: 151–164.
- Torstensson, L. y Castillo, M.d.P.** 1997. Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pestic Outlook.* 8: 24-27.
- Torstensson, L.** 2000. Experiences of biobeds in practical use in Sweden. *Pesticide outlook.* 11:206-212.
- Torstensson, L.** 1996. Herbicides in the Environment. Proceedings of the Second International Weed Control Congress, Copenhagen, Denmark,; Vol. 1-4, 267-274.
- Tortella, G., Rubilar, O., Cea, M., Wulff, C., Martinez, O. y Diez, M.C.** 2010. Biostimulation of agricultural biobeds with NPK fertilizer on chlorpyrifos degradation to avoid soil and water contamination. *Journal Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (4): 464 – 475.
- Vischetti, C., Capri, E., Trevisan, M., Casucci, C. y Perucci, P.** 2004. Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination at farm level. *Chemosphere.* 55: 823–828.
- Vischetti, C., Monaci, E., Cardinali, A., Casucci, C. y Perucci, P.** 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere.* 72: 1739–1743.
- Wainwright, M.** 1978. A review of the effects of pesticides on microbial activity in soils. *European Journal of Soil Science.* 29 (3) 287-298.
- Wesenberg D, Kyriakides I, y Agathos SN.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Prog.* 22(1–2):161–187.
- Yasouri, FN.** 2006. Plasmid mediated degradation of diazinon by three bacterial strains of *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. and *Agrobacterium* sp. *Asian J Chem.* 18:2437-2444.
- Yu, L., Shan, M., Fang, H., Wang, X. y Chu, X.** 2006. Responses of soil microorganisms and enzymes to repeated applications of chlorothalonil. *Journal of agricultural and food chemistry.* 54:10070-10075.
- Zhang, B., Bai, Z., Hoefel, D., Tang, L., Wang, X., Li, B. y Zhuang, G.** 2009. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Science of the total environment.* 407:1915-1922.

Zhang, B., Zhang, H., Jin, B., Tang, L., Yang, J., Li, B., Zhuang, G. y Bai, Z. 2008. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. *Journal of environmental sciences*. 20:1356-1362.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de ANOVA factorial para la FDA en la primera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	11,641	3	3,880	25,584	,000
tratamiento	,064	1	,064	,425	,524
periodo * tratamiento	2,274	3	,758	4,998	,012
Error	2,427	16	,152		
Total	254,267	24			
Total corregida	16,406	23			

ANEXO 2. Prueba T-Student para la FDA al día 30 de la primera aplicación de diazinón.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
FDA	Se han asumido varianzas iguales	,840	,411	4,063	4	,015	1,03831204 8861744	,25552763365 3918	,32885360 1160547	1,7477704 96562940
	No se han asumido varianzas iguales			4,063	3,626	,019	1,03831204 8861744	,25552763365 3918	,29902743 6130406	1,7775966 61593081

a aplicación= 1, periodo=30

ANEXO 3. Análisis de ANOVA factorial para la hidrólisis de la fluoresceína diacetato en la segunda aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	29,609	3	9,870	8,021	,002
tratamiento	,019	1	,019	,016	,902
periodo * tratamiento	1,022	3	,341	,277	,841
Error	19,687	16	1,230		
Total	174,379	24			
Total corregida	50,337	23			

ANEXO 4. Análisis de ANOVA factorial para la hidrólisis de la fluoresceína diacetato en la tercera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	8,416	3	2,805	7,749	,002
tratamiento	1,387	1	1,387	3,830	,068
periodo * tratamiento	,270	3	,090	,248	,861
Error	5,792	16	,362		
Total	157,236	24			
Total corregida	15,864	23			

ANEXO 5. Análisis de ANOVA factorial para la actividad peroxidasa en la primera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	1,929(a)	7	,276	2,420	,119
periodo	5,678	1	5,678	49,849	,000
tratamiento	1,086	3	,362	3,178	,085
periodo * tratamiento	,025	1	,025	,221	,651
Error	,818	3	,273	2,394	,144
Total	,911	8	,114		
Total corregida	8,519	16			
	2,841	15			

ANEXO 6. Prueba T-Student para la actividad peroxidasa al día 30 de la primera aplicación de diazinón.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Superior	Inferior
peroxidasa									
Se han asumido varianzas iguales			1,279	2	,329	,840106434 446057	,65669596921 2387	-1,985428 27010109 0	3,6656411 38993204
No se han asumido varianzas iguales			1,279	1,209	,393	,840106434 446057	,65669596921 2387	-4,761496 26131628 0	6,4417091 30208400

a aplicación=1, periodo=30

ANEXO 7. Análisis de ANOVA factorial para la actividad peroxidasa en la segunda aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	,515	3	,172	18,303	,001
tratamiento	,045	1	,045	4,806	,060
periodo * tratamiento	,024	3	,008	,865	,498
Error	,075	8	,009		
Total	2,646	16			
Total corregida	,660	15			

ANEXO 8. Análisis de ANOVA factorial para la actividad peroxidasa en la tercera aplicación de diazinón

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	,065	3	,022	2,191	,167
tratamiento	,011	1	,011	1,071	,331
periodo * tratamiento	,014	3	,005	,464	,715
Error	,079	8	,010		
Total	1,393	16			
Total corregida	,168	15			

ANEXO 9. Análisis de ANOVA factorial para la actividad fosfatasa ácida durante la primera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	31,525	3	10,508	,863	,481
tratamiento	,204	1	,204	,017	,899
periodo * tratamiento	1,843	3	,614	,050	,984
Error	194,921	16	12,183		
Total	675,753	24			
Total corregida	228,493	23			

ANEXO 10. Análisis de ANOVA factorial para la actividad fosfatasa ácida durante la segunda aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	107,536	3	35,845	4,337	,020
tratamiento	,107	1	,107	,013	,911
periodo * tratamiento	11,334	3	3,778	,457	,716
Error	132,241	16	8,265		
Total	1101,684	24			
Total corregida	251,218	23			

ANEXO 11. Prueba T-Student para la actividad fosfatasa acida para el día primero de la segunda aplicación de diazinón.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error t.p. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Superior	Inferior
F. acida									
Se han asumido varianzas iguales	1,198	,335	-,058	4	,957	-,184615384 615386	3,1930232953 46988	-9,049869 28376405 0	8,6806385 14533280
No se han asumido varianzas iguales			-,058	2,617	,958	-,184615384 615386	3,1930232953 46988	-11,24216 17987671 40	10,872931 02953637 0

a aplicación=2, periodo=1

ANEXO 12. Análisis de ANOVA factorial para la actividad fosfatasa ácida durante la tercera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	23,091	3	7,697	4,431	,019
tratamiento	1,578	1	1,578	,908	,355
periodo * tratamiento	22,514	3	7,505	4,320	,021
Error	27,791	16	1,737		
Total	912,303	24			
Total corregida	74,974	23			

ANEXO 13. Prueba T-Student para la actividad fosfatasa ácida en el día primero de la tercera aplicación.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error t _p de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Superior	Inferior
F. acida	6,837	,059	5,522	4	,005	3,30256410	,59804634818	1,6421212	4,9630069
Se han asumido varianzas iguales						2564102	9262	46452611	58675590
No se han asumido varianzas iguales			5,522	2,014	,031	3,30256410	,59804634818	,74664541	5,8584827
						2564102	9262	5324669	89803530

a aplicación=3, periodo=1

ANEXO 14. Análisis de ANOVA factorial para la actividad fosfatasa alcalina durante la primera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	960,140	3	320,047	1,415	,275
tratamiento	27,307	1	27,307	,121	,733
periodo * tratamiento	48,412	3	16,137	,071	,974
Error	3619,411	16	226,213		
Total	16624,836	24			
Total corregida	4655,269	23			

ANEXO 15. Análisis de ANOVA factorial para la actividad fosfatasa alcalina durante la segunda aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	1310,247	3	436,749	4,490	,018
tratamiento	12,637	1	12,637	,130	,723
periodo * tratamiento	244,320	3	81,440	,837	,493
Error	1556,382	16	97,274		
Total	7929,100	24			
Total corregida	3123,586	23			

ANEXO 16. Análisis de ANOVA factorial para la actividad fosfatasa alcalina durante la tercera aplicación de diazinón.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
periodo	470,024	3	156,675	2,334	,113
tratamiento	161,920	1	161,920	2,413	,140
periodo * tratamiento	15,292	3	5,097	,076	,972
Error	1073,816	16	67,114		
Total	19620,111	24			
Total corregida	1721,053	23			