

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**IMPACTO DEL OXICLORURO DE COBRE SOBRE LA DEGRADACIÓN DE  
PLAGUICIDAS Y POBLACIONES MICROBIANAS EN LA MATRIZ DE UN LECHO  
BIOLÓGICO**

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  
Biotecnólogo

**EDUARDO IGNACIO SALGADO JARA**  
**TEMUCO-CHILE**  
**2013**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**IMPACTO DEL OXICLORURO DE COBRE SOBRE LA DEGRADACIÓN DE  
PLAGUICIDAS Y POBLACIONES MICROBIANAS EN LA MATRIZ DE UN  
LECHO BIOLÓGICO**

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 Biotecnólogo

**EDUARDO IGNACIO SALGADO JARA  
PROFESOR GUÍA: GONZALO RODRIGO TORTELLA FUENTES  
TEMUCO-CHILE  
2013**

**“IMPACTO DEL OXICLORURO DE COBRE SOBRE LA DEGRADACIÓN DE  
PLAGUICIDAS Y POBLACIONES MICROBIANAS EN LA MATRIZ DE UN LECHO  
BIOLÓGICO”**

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

**PROFESORE CONSEJERO** : OLGA MARGARITA RUBILAR ARANEDA  
INGENIERO AMBIENTAL  
DOCTOR EN CS. DE RECURSOS NATURALES  
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL  
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

**CALIFICACION PRODESIO TESIS:**

## AGRADECIMIENTOS

Tengo muchas personas a las cuales agradecer por haberme ayudado llegar a esta parte de mi vida, tanto en lo personal como académica. Primero y ante todo, agradezco a mis padres Nelson y Sandra por darme una buena educación, no solo la académica, sino que además una basada en la moral y la ética. Les agradezco por comprender el tipo de persona que soy, ser pacientes y comprensivos, pero por sobre toda las cosas, por haberme entregado el mayor regalo de todos, la vida. A mis hermanos Pablo, Sandra y Nicole. Les agradezco por haberme dado momentos de alegría, pena, gozo y rabia. Cada momento con ustedes me ha enseñado lo hermoso que es tener una familia tan variada en personalidades, pues he aprendido a amarlos a pesar de nuestras diferencias, a pesar de nuestros problemas personales. Me siento feliz de ser su hermano.

La familia es un punto importante dentro de nuestras vidas, pero también lo son nuestros amigos que nos acompañan en partes de nuestras vidas y algunos, durante toda nuestra existencia en este mundo. Mi polola, Catalina Vidal. No eres la primera mujer que he amado, pero eres la segunda más importante en mi vida. Me enseñaste que no todo en la vida es el trabajo y los logros personales, que hay que priorizar a las personas, que a veces es mejor causar un dolor pequeño ahora para que mañana no se convierta en un dolor más grande. Te agradezco por siempre estar a mi lado incondicionalmente y por tu constante apoyo, te agradezco por ser la persona que eres. A mi amigo Juan Antonio Rojo, mi más antiguo y querido amigo. Me ayudaste durante los primeros años que nos conocimos, aprendí de ti muchas cosas que me sirvieron en mi vida, comprendiste muchos de mis problemas y me ayudaste a superarlos. Podría decir muchas otras cosas sobre cómo me ayudaste a superarme a mí mismo, pero solo basta con decir que eres y serás mi mejor amigo hasta que me vaya de este mundo. A todos mis amigos les doy gracias por haber compartido con ustedes, por todas experiencias buenas y malas, por cada momento en los que estuvimos juntos.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Gonzalo Tortella por haberme dado la oportunidad de ser su alumno. Cada enseñanza, cada consejo y cada conversación que tuvimos, me sirvió para crecer como persona y como investigador. Le agradezco por ser el tutor que fue conmigo, de ser mas que un profesor y espero que los siguientes tesis que tenga, puedan valorar lo mismo que me entrego a mí. A la Dra. Olga Rubilar por sus consejos y por su buen humor que la caracteriza, le doy las gracias por el apoyo que me entrego durante la redacción de esta tesis, que a pesar de no ser perfecta, me dio palabras de aliento como lo hizo mi tutor. Agradecer al proyecto FODECYT 11100236° por el financiamiento y recursos aportados a esta tesis.

..

## RESUMEN

Los sistemas de biopurificación conocidos como “lechos biológicos”, son una herramienta biotecnológica utilizada para reducir la contaminación puntual por plaguicidas. Su componente principal es la biomezcla, compuesta por paja, turba y suelo en una proporción volumétrica 2:1:1. Esta composición favorece el desarrollo de microorganismos y la degradación de residuos de plaguicidas. En nuestro país se han desarrollado algunos estudios para observar el efecto de los plaguicidas en los microorganismos y como afecta a la degradación de estos agroquímicos. Sin embargo, si bien se han realizado estudios en biomezcla con plaguicidas metabolizables, no se ha realizado un estudio sobre el efecto que pueda tener un plaguicida basado en un metal pesado. Se evaluó el efecto de oxiclورو de cobre (OxCu) sobre la degradación de atrazina (10 mg/kg), diazinon (10 mg/kg), y carbendazima (10 mg/kg), y sobre las actividades enzimáticas y poblaciones microbianas de la biomezcla de un lecho biológico. En este estudio la biomezcla fue contaminada artificialmente con OxCu a dosis de 10, 100, 1,000 mg/kg y con una mezcla de plaguicidas. La biomezcla fue mantenida a 25°C durante 30 días en oscuridad y periódicamente se evaluó la degradación de los plaguicidas (HPLC) y actividades enzimáticas como FDA, deshidrogenasa, fosfatasa acida,  $\beta$ -glucosidasa y fenoloxidasas. Además se evaluó la diversidad de las poblaciones microbianas mediante recuento unidades formadoras de colonias (UFC), electroforesis de gel en gradiente denaturante (DGGE) y por cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). Los resultados obtenidos mostraron que la adición de OxCu no afectó la degradación de los plaguicidas después de 30 días de incubación. Las actividades biológicas fueron afectadas significativamente durante los primeros días de incubación en presencia de 1,000 mg/kg de OxCu en la biomezcla, sin embargo estas se recuperan después de los 30 días de incubación. Los análisis por UFC se vieron afectados en presencia de altas dosis OxCu, pero el efecto inhibitorio fue temporal. El DGGE reveló que la aplicación de OxCu a la biomezcla no causa cambios importantes a nivel de estructura o diversidad de las comunidades, pero la qPCR reveló cambios temporales en la estructura de los grupos microbianos. En conclusión, la aplicación de oxiclورو de cobre a la biomezcla de un lecho biológico no afecta la degradación de los plaguicidas ni altera significativamente la diversidad de las poblaciones microbianas, causando solamente alteraciones temporales en las actividades biológicas de los microorganismos.

## SUMMARY

The biopurification system known as “biobed” are a biotechnological tool used to reduce point source contamination by pesticides. The principal component is the biomixture, composed by straw, peat and top soil in a volumetric proportion of 2:1:1. This composition favors the development of microorganism and therefore the pesticide degradation. Actually, in our country have been developed several studies to evaluate the pesticide degradation, and its effects on microbial communities in the biomixture of biobed system. However, not have been performed studies about the effect of pesticides based in heavy metal on the pesticide degradation, microbial population and biological activities in the biomixture. Therefore, the aim of this study was to study the effects of copper oxichloride (OxCu) (10, 100 and 1,000 mg kg<sup>-1</sup>) in the biomixture on the degradation capacity of three pesticide (atrazine, carbendazim and diazinon) at 10 mg kg<sup>-1</sup> each and on biological activities and microbial communities structure. The biomixture was maintained in dark at 25 °C during 30 days and pesticide degradation (by HPLC), biological activities (FDA, dehydrogenase, acid phosphatase, β-glucosidase and phenoloxidase) and microbial communities structure (by cultivable microorganisms, DGGE and qPCR) were periodically evaluated. The results showed that the pesticide degradation in the biomixture not was negatively affected by the presence of OxCu finding that all pesticide evaluated were dissipated on 90% of the initial concentration added. On the other hand, the biological activities were negatively affected, only with high concentration of OxCu (1,000 mg kg<sup>-1</sup>) and during the first days after that OxCu was added. Similar results were found with the cultivable bacteria, fungi and actinobacterias where only a temporary negative effect was produced by OxCu at higher doses. Finally, fingerprint analysis (DGGE and qPCR) revealed that minimal changed occurred in microbial community structure due to the presence of OxCu in the biomixture in all concentration evaluated. Therefore, it can be concluded that the addition of OxCu to the biomixture at high doses, not affect significantly the microbiological performance of the biomixture of biobed system and could be used to contain residues of this compound in presence of others pesticides without affecting the degradation of these.

## ÍNDICE

Capítulo		Página
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1	Plaguicidas en la agricultura	5
2.1.1	Atrazina	7
2.1.2	Carbendazima	8
2.1.3	Diazinon	9
2.2	Plaguicidas y su efecto en los microorganismos del suelo	9
2.3	El efecto del oxiclورو de cobre sobre los microorganismos del suelo	12
2.4	Lechos biológicos y biomezclas	13
2.5	Degradación de plaguicidas en biomezclas de los lechos biológicos	14
2.6	Efecto de los plaguicidas sobre parámetros microbiológicos de la biomezcla	17
2.6.1	Actividad hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA)	17
2.6.2	Actividad lignolíticas	17
2.6.3	Actividad fosfatasa	18
2.6.4	Actividad deshidrogenasa	19
2.6.5	Análisis de poblaciones microbianas	20
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	22

<b>4.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	23
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	24
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	25
6.1	Compuestos químicos	25
6.2	Preparación del lecho biológico	25
6.3	Ensayo de degradación de plaguicidas	26
6.4	Actividades enzimáticas	27
6.5	Extracción de plaguicidas	28
6.6	Recuento de microorganismos cultivables	30
6.7	Extracción de ADN	31
6.8	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	31
6.9	Electroforesis en Gel de Gradiente Denaturante (DGGE)	33
6.10	Reacción de Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-Tiempo Real o qPCR)	34
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	36
7.1	Degradación de plaguicidas	36
7.1.1	Actividades biológicas	39
7.1.2	Hidrólisis de la Fluoresceína Diacetato (FDA)	39
7.1.3	Actividad lignolítica	40
7.1.4	Actividad fosfatasa	42



7.1.5	Actividad $\beta$ -glucosidasa	43
7.2	Actividad deshidrogenasa	44
7.3	Recuento de microorganismos cultivables	46
7.4	Análisis de las comunidades microbianas mediante técnicas moleculares.	49
7.4.1	Análisis de Electroforesis de Gen en Gradiente Denaturante (DGGE)	49
7.4.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)	53
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de los plaguicidas ha generado grandes cambios en la agricultura, destacándose de forma evidente el aumento de la producción agrícola y la calidad de los productos producidos. La capacidad de los plaguicidas para mantener controlada las plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas ha aumentado a través de los años y de igual manera, la cantidad utilizada de estos productos. Sin embargo, debido a la inadecuada manipulación de estos se han producido una gran cantidad de daños en el medio ambiente, tanto en el suelo como en las aguas superficiales y subterráneas.

Las fuentes de contaminación producto del uso de los plaguicidas han sido descritas mediante dos rutas principales, que son conocidas como contaminación puntual “point source contamination” y no puntual “non-point source contamination” o también conocida como contaminación difusa. La contaminación puntual se refiere principalmente a la contaminación localizada y que se produce debido a la mala manipulación de los agroquímicos y sus residuos, durante actividades de llenado o lavado de estanques de los equipos de aspersión o a través de derrames accidentales. Por otra parte, la contaminación no puntual o difusa, se produce al momento de la aplicación de los plaguicidas donde las características fisicoquímicas de los plaguicidas y el ambiente en el cual se utilizan, provocan que una porción de estos sean diseminados hacia otros sectores. Se ha descrito en la literatura que la primera ruta, es la fuente de mayor contaminación provocada por los plaguicidas. En este sentido, estudios realizados en Alemania han reportado que un 77% de la contaminación total en recursos acuíferos producida por plaguicidas fue dominada por contaminación puntual (Müller et al., 2002). Debido a esto, es que se ha llevado a la búsqueda de soluciones biotecnológicas para los problemas producidos por la contaminación puntual de plaguicidas, como lo son los lechos biológicos o biobeds. La implementación de los lechos biológicos ha sido utilizada en los últimos años en Europa y recientemente en Sudamérica. Los lechos biológicos están conformados por distintos componentes, donde el principal es la biomezcla, la cual está compuesta volumétricamente por suelo (25%), paja de trigo (50%) y turba (25%). Esta biomezcla estimula el desarrollo de los

microorganismos y su actividad biológica para aumentar la capacidad degradadora de plaguicidas. La capacidad de retención y degradación de los plaguicidas en la biomezcla ha sido eficiente, en comparación a un suelo solo al cual se le aplica una cantidad similar de plaguicida (Torstensson et al., 1996; Castillo et al., 1997a). Sin embargo, a pesar de tener una elevada retención y eficiente degradación, el impacto que producen los plaguicidas en los microorganismos de una biomezcla es de gran importancia y ha sido estudiada solo recientemente (Coppola et al., 2011; Marinozzi et al., 2012; Tortella et al., 2013a; Tortella et al., 2013b). Por lo tanto, un mejor conocimiento del impacto que tienen los plaguicidas sobre las comunidades microbianas y las actividades biológicas en la biomezcla de estos sistemas de biopurificación es de gran importancia para asegurar la sustentabilidad de este sistema en el largo plazo, dado que una activa microflora y actividades enzimáticas en la biomezcla del lecho biológico son vitales para el buen funcionamiento de este sistema biotecnológico. En este sentido algunos trabajos realizados en Europa (Vischetti et al., 2008., Coppola et al., 2011., Marinozzi et al., 2012., Sniegowski et al., 2011) han reportado que la aplicación de plaguicidas, solos y en mezcla han causado variaciones en las comunidades microbiológicas en biomezclas basadas en compost. Sin embargo, este efecto negativo fue solo temporal y una recuperación del sistema fue observado en conjunto con la disminución de la concentración de plaguicida aplicado. Al respecto, Vischetti et al. (2008) reportaron que la aplicación de elevadas concentraciones de clorpirifos y metalaxyl en una biomezcla basada en compost compuesta por residuos de poda de parras, la biomasa microbiana y sus actividades biológicas fue afectada negativamente. Sin embargo, los efectos negativos fueron transitorios luego de la disminución de la concentración de los plaguicidas en la biomezcla y la actividad microbiana fue recuperada alcanzando valores similares a los iniciales. Resultados similares fueron reportados por Coppola et al. (2011) cuando estudiaron el efecto de la aplicación de una mezcla de fungicidas sobre las comunidades microbiológicas de una biomezcla de un lecho biológico compuesta por compost y paja de trigo. Estos autores reportaron que ensayos realizados en electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) mostraron cambios de la diversidad microbiana la que fue correlacionada con la aplicación de los fungicidas. En otro estudio, Marinozzi et al. (2012) reportaron que la aplicación de tres fungicidas, mostraron efectos adversos en la estructura microbiológica de una

biomezcla compuesta por residuos de poda y paja de trigo. Sin embargo, los efectos fueron transitorios y los parámetros microbiológicos fueron recuperados después de 60 días de aplicado los plaguicidas. Recientemente estudios realizados por Tortella et al. (2013a, b) demostraron que la aplicación sucesiva de plaguicidas en altas concentraciones (40 mg/kg) como atrazina y carbendazima en una biomezcla tradicional compuesta por paja (50%), turba (25%) y suelo (25%) causó efectos adversos sobre las actividades biológicas de la biomezcla, sin embargo estas fueron recuperadas en el tiempo después de la aplicación de los plaguicidas.

Algunos compuesto que contienen cobre dentro de sus componentes son también utilizados en actividades agrícolas, ya sea como fertilizantes o bien como plaguicidas. Este es el caso de oxiclورو de cobre ( $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ ), compuesto que es utilizado ampliamente para el control de un número significativo de enfermedades de plantas (Nel et al., 1999). Pocos estudio en suelo han evaluado el efecto que producen los compuestos que contienen cobre sobre las poblaciones microbianas y las actividades biológicas y escasa información en la literatura sobre su efecto sobre las poblaciones microbiológicas de los lechos biológicos. Sin embargo, Du Plessis et al. (2005) reportaron que la aplicación de oxiclورو de cobre en altas dosis (100 y 1000 mg/kg) causó un efecto perturbador en las poblaciones microbianas de un suelo franco-arenoso. Resultados similares fueron reportados por Dewey et al. (2012) al evaluar concentraciones entre 0-1000 mg/kg de sulfato de cobre adicionado a un suelo arenoso. Estos autores reportaron que la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas fueron adversamente afectadas a medida que se incrementaba la concentración de Cu.

Como se mencionó anteriormente algunos estudios sobre el comportamiento de las poblaciones microbianas de biomezclas de lechos biológicos, ya sea basadas en compost, tradicional u otras en presencia de plaguicidas han sido reportadas. Sin embargo, a la fecha no existe información del efecto que puede ocasionar la presencia de oxiclورو de cobre sobre las poblaciones microbianas ni la degradación de otros plaguicidas en la biomezcla de un lecho biológico. Esta información es de gran importancia, dado que productos conteniendo cobre son ampliamente utilizados en la agricultura y por lo tanto se generaran residuos de estos productos que podrían ser desechados en los lechos biológicos.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de oxiclورو de cobre sobre la degradación de una mezcla de plaguicidas, las actividades biológicas y la estructura de las comunidades microbianas de la biomezcla de un lecho biológico bajo condiciones de laboratorio.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Plaguicidas en la agricultura

El artículo 2° del Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de plaguicidas (FAO, 1990) define los plaguicidas como «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte».

En un intento por reducir las pérdidas provocadas por diferentes plagas y aumentar la cantidad y calidad de alimentos producidos, la agricultura ha aumentado substancialmente la dependencia por el uso de plaguicidas (Cai et al., 2008., Zhang et al., 2011., EPA, 2007). Si bien la eficiencia de estos agroquímicos ha aumentado con el pasar de los años, también se ha evidenciado que pueden producir un impacto negativo al medio ambiente y a la población, debido a su toxicidad, estabilidad y persistencia (Aktar et al., 2009., Vivekanandhan y Duraisamy, 2012).

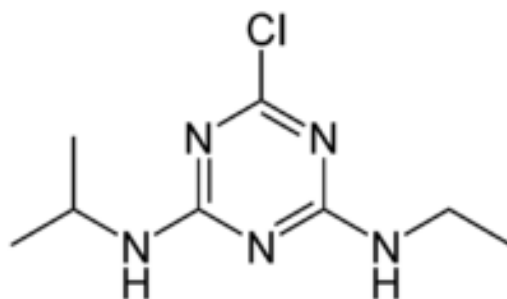
Se han realizado diversos estudios sobre el efecto de los plaguicidas en el medio ambiente y su incidencia en la salud humana, revelando que la forma en la cual estos productos agroquímicos llegan al medio ambiente son variadas, clasificándose principalmente en dos tipos; contaminación puntual y no puntual o difusa.

La contaminación puntual se produce debido a la manipulación inadecuada de los plaguicidas, ya sea en derrames, limpieza inadecuada de los equipos, eliminación de residuos y exceso de rociado. En este contexto, Muller et al. (2002) reportaron que el 77% de la contaminación de aguas por plaguicidas fue debido a contaminación del tipo puntual. Además, varios estudios (Neumann et al., 2002; Jaeken y Debaer, 2005; Hildebrandt et al., 2007) reportan que la contaminación puntual es la que causa mayores efectos negativos, ya que el manejo inadecuado de los plaguicidas provoca la contaminación de los suelos, aguas y productos agrícolas que finalmente afectan al ser humano.

En la contaminación no puntual se encuentran procesos físico-químicos como la volatilización, precipitación o lixiviación, fenómenos que ocurren de forma natural, sin intervención del hombre (Carter, 2000; Tang et al., 2012; Katagi et al., 2006; Guyot et al., 1994). En un reporte de este tipo de contaminación Taylor et al. (1995), evaluaron la tasa de volatilización de varios plaguicidas. Los resultados demostraron que estos no excedían el 20% en el caso de los menos volátiles, mientras que los de menor estabilidad molecular, poseían una tasa mayor de volatilización, evidenciando que la persistencia de estos plaguicidas en el suelo alcanza valores muy elevados.

En Chile, no se han realizado muchos estudios para evaluar la contaminación de aguas y suelos debido al uso de plaguicidas. Sin embargo, Flores et al. (2009) realizaron estudios en la provincia de Quillota y evaluaron la persistencia de simazina en dos suelos agrícolas con distintos niveles de materia orgánica. Estos autores reportaron que el suelo con mayor contenido de materia orgánica, retuvo un mayor porcentaje del plaguicida que el suelo con menor materia orgánica, concluyendo que los suelos andisoles de nuestro país, tenderían a retener en gran medida los plaguicidas aplicados en la agricultura.

**2.1.1 Atrazina.** La atrazina [2-cloro-4-etilamino-6-sipropilamino-1,3,4-triazina] (Figura 1) es un herbicida sistémico, de absorción radicular y foliar que controla selectivamente malezas anuales de hoja ancha y algunas gramíneas anuales como los cultivos de maíz, sorgo forrajero y plantaciones forestales de pinos y eucaliptos (SAG 2011).



**Figura 1.** Estructura química de la atrazina.

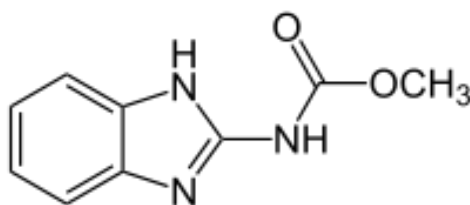
La atrazina posee una persistencia moderada, dependiendo del tipo de suelo, estimándose que la vida media de este compuesto puede variar de un par de meses (Vanderheyden et al., 1997), hasta los 22 años (Jablonowski et al., 2009). También se ha descrito una alta capacidad de movilización desde suelo a aguas subterráneas, provocado en su mayoría por la falta de materia orgánica presente (Konstantinou et al., 2006; Jablonowski et al., 2009; Cerejeira et al., 2003; Laird et al., 1994; Persicani et al., 1993).

Se ha reportado, que este compuesto provoca problemas en el sistema nervioso central, como también en el sistema endocrino del ser humano (Persicani et al., 1993)



**2.1.2 Carbendazima.** La carbendazima [Methyl *1H*-benzimidazol-2-yl-carbamate] (Figura 2) Es un fungicida de amplio espectro, el cual es utilizado para controlar diferentes tipos de plagas en cultivos de cereales, caña de azúcar y diferentes frutales. (EFSA, 2010)

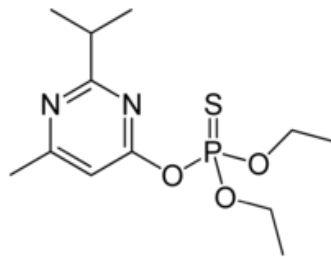
El efecto del contacto del carbendazima con humanos, ha sido reportado por varios autores. Dentro de los efectos tóxicos de este compuesto se encuentra principalmente la falla de las células espermáticas (Yu et al., 2009). Además se ha descubierto que al ser un plaguicida de alto espectro, también causa un impacto negativo a otros organismos. En el suelo se identifica a las lombrices (*Eisena fetida*) y en el agua a los microorganismos como el Zooplancton como los organismos más afectados por la aplicación del fungicida (Van den Brink et al., 2000; Ellis et al., 2010).



**Figura 2.** Estructura química del carbendazima.

El Carbendazima es considerado un plaguicida persistente en el suelo. Su vida media se encuentra en el rango de los 3 a 44 meses, dependiendo de las condiciones ambientales. Por otro lado la capacidad de movilización a través del suelo, ha sido reportada por varios estudios (Jones et al., 2004; Soleil et al., 1979). También se ha reportado que este compuesto posee la capacidad de inhibir funciones biológicas ligadas a la actividad enzimática de los microorganismos (Burrows y Edwards, 2004; Förster et al., 2006). Aun así las comunidades microbianas son capaces de recuperar su actividad enzimática varios meses después de la primera aplicación del plaguicida. (Giller et al., 1997; Wang et al., 2009; 2012; Wang et al., 2009)

**2.1.3 Diazinon.** El diazinon [O,O-Dietil-O-(2-isopropil-6-metil- pirimidin-4-il) fosforotioato] (Figura. 3) es un insecticida organofosforado de amplio espectro. Actúa por contacto, por la vía digestiva y respiratoria de insectos masticadores, minadores y chupadores tanto del suelo como del follaje (SAG 2011). Este insecticida ha sido reportado como un compuesto tóxico para el ser humano. Dentro de los efectos se encuentra la alteración a nivel genético de los espermatozoides y problemas neurológicos (Salazar-Arredondo et al., 2008; Slotkin et al., 2008)



**Figura 3.** Estructura química del diazinon.

Este plaguicida posee una persistencia baja en el suelo, la cual tiene una variación de 26 a 35 días. Los estudios reportan que el diazinon tiene una alta tasa de degradación química, por oxidación, y por la actividad microbiana del suelo (Kouloumbos et al., 2003; Drufovka et al., 2008; Bavcon et al., 2003).

## **2.2 Plaguicidas y su efecto en los microorganismos del suelo**

Los plaguicidas tienen como objetivo, el control de diferentes plagas que afectan a los cultivos agrícolas. Los tipos de plaguicidas se pueden subdividir según el organismo que se quiera controlar, existiendo así productos herbicidas, bactericidas, insecticidas y fungicidas. La efectividad del producto radicará en la plaga que se desea controlar, la calidad del plaguicida, la

dosis y la periodicidad de la aplicación. En ocasiones no basta con la aplicación de un solo producto, por lo que es necesario utilizar dos o más para obtener mejores resultados. La mayoría de estos agroquímicos son de amplio espectro y por lo tanto afectan a un gran número de organismos, muchas veces afectado de forma indirecta a los microorganismos del suelo.

Es necesario saber el comportamiento de estos organismos microscópicos, frente a los productos agroquímicos, ya que los microorganismos son una parte esencial, dentro del ecosistema. Estos tienen una estrecha relación con el balance nutricional del suelo y la capacidad de reciclaje de los nutrientes, lo que ayuda a mantener la fertilidad del suelo (Alexander et al., 1977; Pandey and Singh et al., 2004; Devare et al., 2007). En este sentido, Vig et al. (2008) informaron el efecto de la sucesiva aplicación de distintos insecticidas no específicos, en un suelo agrícola. Los resultados arrojaron un aumento de la población de actinobacterias, la disminución bacteriana y un estado inalterado en la cantidad de hongos del suelo. Solo después de 20 días, se logró retomar valores similares antes de la aplicación de los insecticidas. Este mismo fenómeno se ve relacionado con la respiración microbiana, que frente a concentraciones sobre los 125 mg/kg tiende a aumentar y solo retoma valores normales, posterior a 10 días desde la última aplicación del insecticida. La relación radica en la necesidad de degradar el pesticida, para mantener el nivel de toxicidad en un nivel tolerable para la mayoría de los microorganismos. Un resultado similar fue observado en varios estudios se ha evaluado el efecto de los insecticidas sobre las comunidades microbiológicas del suelo. Digrak y Kazanici (2001) evaluaron algunos insecticidas organofosforados y su efecto en la microbiota del suelo. Ellos descubrieron que el total de bacterias, actinobacterias, bacterias anaeróbicas, endosporas aeróbicas, microorganismos celulolíticos y levaduras no eran inhibidos en presencia de plaguicidas. Sin embargo, la aplicación de plaguicidas causó un efecto estimulante y se encontró que el total de bacterias viables fue mayor que el control. Por otro parte Eisenhauer et al. (2009) donde los clorpirifos incrementaron la biomasa microbiana del suelo. En otros trabajos más recientes, Gu et al. (2010) reportaron el uso del análisis por DGGE, donde observaron cambios significativos en la comunidad bacteriana después de la aplicación de enostroburin en la filosfera de trigo. En otra investigación, Cychón et al. (2010) estudiaron la respuesta de microorganismos indígenas a la aplicación de una mezcla de fungicidas en una aplicación de tres dosis (15, 75 y 1,500 mg/kg).

Estos autores reportaron que la combinación de mancozeb y dimetomorf en todas las concentraciones evaluadas, incrementaron el número total de bacterias cultivables y velocidad de nitrificación, pero no se produjo un cambio en el número de bacterias reductoras de nitrato

Si bien, se ha observado que ciertos plaguicidas tienen un efecto positivo en los microorganismos, también se ha observado efectos contrarios. Gigliotti et al. (1998) reportó el efecto producido por la aplicación de dos dosis (16 y 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de metil-bensulfuron (BSM) en el número microbiano y la actividad microbiana. Los autores reportan que la concentración usada, es más alta a la dosis usada en la agricultura, alterando algunos aspectos de la estructura y actividad de la comunidad microbiológica del suelo. Sin embargo, solamente los microorganismos celulolíticos en el suelo con previa aplicación con plaguicidas se vieron afectados significativamente, y la dosis más alta de plaguicidas (160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en suelo pre-tratado con BSM fue observada una inhibición sustancial en la nitrificación. La respiración celular no se vio afectada por la aplicación del herbicida en ninguna de las muestras. Chu et al. (2008) evaluaron el efecto de clorpirifos solo o en combinación con clorotalonil en las poblaciones microbianas. Estos autores reportaron que la degradación de clorpirifos no se alteraba al combinarse con clorotalonil, pero si fue observada un efecto inhibitorio en los microorganismos del suelo cuando se aplicaba clorpirifos en combinación con este plaguicida. La población de bacterias, hongos y Actinobacterias se vio significativamente afectada reduciendo en 44, 61 y 72% respectivamente, cuando se aplicaban solamente clorpirifos. Con la combinación con clorotalonil el efecto inhibitorio se vio incrementado un 55, 79 y 85% respectivamente.

Yu et al. (2006) evaluaron el efecto de la aplicación repetida de clorotalonil sobre la población y varias enzimas bacteriana, hongos y actinobacterias. Después de la primera aplicación, las poblaciones de bacterias y actinobacterias se vieron significativamente reducidas. Sin embargo, la población de hongos no se sufrió cambios. Después de la segunda aplicación los microorganismos del suelo fueron afectados fuertemente, pero después de la variación inicial, todos los microorganismos mostraron una adaptación gradual al clorotalonil. Por otra parte, los autores reportaron la evaluación de enzimas (fosfatasa ácida y alcalina, ureasa, catalasa e invertasa) mostro una tendencia similar al los microorganismos del suelo, después del efecto

inhibidor causado por clorotalonil. White et al. (2010) evaluaron los efectos de 4 fungicidas (clorotalonil, 1,26 kg/ha; tebuconazole, 0,23 kg/ha; flutriafol, 0,13 kg/ha y ciproconazole, 0,084 kg/ha) en la dinámica de los microorganismos del suelo. Los resultados de los ácidos grasos fosfolípidos (PLFA) y ácidos lipídicos neutrales (NLFA) de los microorganismos del suelo, demostraron que los fungicidas evaluados tuvieron un leve impacto en la dinámica de las comunidades microbianas. Se ha descrito que la degradación del diazinon, no aumenta la población microbiana del suelo sino que permite el desarrollo de microorganismos con capacidad degradadora. Esta aseveración se ve respalda en el estudio de Cycón et al. (2013), en el cual el microorganismo *Serratia marcescens* al adicionarse a un suelo con diazinon, aumenta la tasa de degradación en comparación a un suelo sin este microorganismo. También dentro de las actividades biológicas, se reportó que la actividad de la enzima deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, solo se veía afectada a altas concentraciones (700 mg/kg) en los primeros días de la aplicación del plaguicida, para luego retomar valores similares o superiores en los días posteriores (Singh y Singh., 2005b; Sánchez et al., 2004; Cycón et al., 2009; 2013).

Muchos estudios reportan una alteración en las comunidades microbianas, en las cuales se puede observar una inhibición o una estimulación por parte de los plaguicidas, para su desarrollo (Bhutani et al., 1984; Ratcliff et al., 2006; Eisenhauer et al., 2009). Este cambio en la población, se ve reflejada tanto en su actividad biológica, como también en la capacidad degradadora de los microorganismos autóctonos del suelo (Allievi et al., 1996; Niemi et al., 2009; Moreno et al., 2007; El-Bestawy et al., 2013; Rossel et al., 1997)

Si bien se han realizado varios estudios relacionados con plaguicidas y su efecto en los microorganismos del suelo, son muy poco los estudios realizados en el cobre y su efecto en las actividades biológicas y como afecta a la degradación de plaguicidas metabolizables.

### **2.3 Efecto del oxiclورو de cobre sobre los microorganismos del suelo**

El cobre ha sido reportado como uno de los componentes más utilizados en los fungicidas en la producción agrícola (Büunemann et al., 2006). Se ha reportado en muchos estudios que el cobre

es un potente fungicida y bactericida y que la acumulación de este metal puede producir serias alteraciones en los microorganismos más sensibles del suelo (Bâath et al., 1989; Sauvé et al., 1998; Petersen et al., 2003) Uno de los efectos más perjudiciales para los microorganismos es la interferencia en la producción y con la funcionalidad de las enzimas (Gadd et al. 2001; Wang et al., 2009; Wightwick et al., 2012). También se ha observado que las altas concentraciones de cobre, disminuyen la capacidad de degradación de los plaguicidas aplicados en el suelo (Jindal et al., 2000; Gunasekara et al., 2005; Gaw et al., 2006; Liu et al., 2007; Kim et al., 2011). En este contexto, se ha reportado que una concentración en el suelo superior a 100 mg/kg de este metal pesado, produce una alteración en las comunidades microbianas (Kunito et al., 1999; Viti et al., 2008).

El oxiclورو de cobre  $[\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]$  es un fungicida y bactericida, basado en la eliminación de hongos por medio de partículas de cobre. Se utiliza de forma preventiva en árboles frutales, cítricos, arbustos ornamentales y remolachas. Du plessis et al. (2005) realizó un estudio sobre el efecto en la comunidad microbiana de un suelo arenoso acidificado, al cual se le agregó oxiclورو de cobre. Los autores reportaron que a una concentración de 100 mg/kg, se observó un aumento de la concentración de bacterias en el suelo. Por el contrario, una concentración de 1000 mg/kg causó un descenso significativo el crecimiento de las bacterias cultivables. Estos efectos también se vieron reflejados en la actividad metabólica, en la cual dependiendo de la concentración del fungicida aumentaba o disminuía.

## **2.4 Lechos biológicos y biomezclas**

Un lecho biológico es una instalación que se construye en los sectores de manipulación y acopio de los plaguicidas. La tecnología de los lechos biológicos fue desarrollada en Suecia, en la década de los años 90 y a partir del año 1997 se ha implementado gradualmente en varios países principalmente de Europa y actualmente está siendo ampliamente difundida en América Latina. Esta tecnología de biopurificación conocida como “biobeds” o “lechos biológicos” fue diseñada para evitar y reducir la contaminación por plaguicidas producto de la contaminación puntual.

El lecho biológico consiste básicamente en una excavación impermeabilizada, la cual es rellena con una mezcla constituida por suelo, paja y turba, denominada “biomezcla”, cubierta por una capa vegetal y un sistema de soporte para la maquinaria (Castillo et al., 2008). La biomezcla está constituida volumétricamente por un 25% de turba, 25% de suelo y 50% de paja, los cuales se encuentran homogéneamente mezclados. Esta composición fue originalmente creada en Suecia (Tortensson et al., 1997). Sin embargo, durante los últimos años se han realizado varios estudios donde se han evaluado algunas modificaciones con el objetivo de adaptación a las condiciones locales de cada país (Coppola et al., 2007; Spanoghe et al., 2004; Karanasios et al., 2010a).

El suelo utilizado tiene como objetivo, proporcionar la fuente de los microorganismos para la degradación de los plaguicidas y a su vez, adsorber los plaguicidas vertidos en el lecho. Esto permite una mejor interacción entre ambos, colaborando de esta forma a la degradación de los plaguicidas aplicados. (Torstensson et al., 1996; Castillo et al., 2008). El objetivo de la turba, es el mantener la humedad de la biomezcla y otorgar sitios de adsorción de los agroquímicos y favorecer la degradación natural de estos. Otros factores de importancia en este compuesto, es el aumento de la materia orgánica presente y la disminución del pH (Castillo et al., 2007). Por último, la paja aporta una gran cantidad de lignina y celulosa, lo que permite el desarrollo de los hongos de pudrición blanca, los cuales poseen una gran capacidad de degradación de los plaguicidas (Castillo et al., 1997b; 2001). Varios estudios han demostrado que la biomezcla permite la retención y posterior degradación de los plaguicidas, logrando reducir la concentración o una completa disipación de los agroquímicos (Castillo et al., 2008).

## **2.5 Degradación de plaguicidas en biomezclas de lechos biológicos**

Se ha reportado que una buena biomezcla, es aquella que permite una buena interacción entre el plaguicida y los microorganismos presentes en la biomezcla, además de dar un soporte robusto ante las altas concentraciones de plaguicidas (Castillo et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, la biomezcla estándar u original está compuesta de suelo, turba y paja, la cual ha

mostrado una gran capacidad en la degradación de los plaguicidas. De acuerdo con Torstensson et al. (1997) con una proporción de 50% de paja, 25 % de suelo y 25 % de turba, se logra una degradación sobre el 50% de la concentración de plaguicidas, desde la aplicación en la primavera hasta su evaluación en otoño. La biomezcla de tipo sueca ha demostrado en varios estudios, que posee una buena tasa de disipación de los plaguicidas aplicados (Castillo et al., 2001; Fogg et al., 2003)

Recientemente, Tortella et al. (2012) evaluó el efecto del tiempo de maduración de la biomezcla (0, 15 y 30 días) y el efecto sobre la disipación de clorpirifos en tres concentraciones 200, 320 y 480 mg/kg. Estos autores reportaron que después de 40 días de incubación la biomezcla con 15 días de maduración se mostro una mejor disipación del plaguicida en todas las concentraciones evaluadas. También se ha estudiado la degradación de plaguicidas en la biomezcla tradicional o sueca cuando estos son aplicados repetidamente. Tortella et al. (2013a, b) evaluaron la degradación de atrazina y carbendazima cuando estos eran aplicados repetidamente en dosis de 40 mg/kg. Los resultados obtenidos mostraron que la disipación obtenida fue de 96% y 87% para atrazina y carbendazima respectivamente posterior a la primera aplicación, un 78% de atrazina y un 94% de carbendazima después de la segunda aplicación, y finalmente después de la última aplicación se produjo una disipación de un 96% en ambos plaguicidas.

A pesar de ser un buen sistema para la retención y degradación de plaguicidas, algunos sustratos como la turba y la paja, no se encuentra siempre disponible en todas las regiones o su costo tiende a ser elevado. Es por esto que en los últimos años se ha estado evaluado componentes alternativos, con el objetivo de tener sustratos disponibles y a la vez reducir costos de este sistema (Coppola et al., 2007; Karanasios et al., 2010a; Omirou et al., 2012).

Karanasios et al. (2010) realizaron un estudio evaluando el efecto del reemplazo del material lignocelulósica por composta de hojas de olivo, residuos de girasoles, tallos de uvas entre otros desechos agrícolas, sobre la degradación de varios plaguicidas. Los resultados obtenidos por estos autores demostraron que la substitución de de la paja de trigo por compost de tallos de uvas mostró una buena eficiencia en la degradación de los plaguicidas evaluados, de la misma forma que la biomezcla tradicional que fue utilizada como control. En un estudio similar Vichetti et al.



(2008) evaluaron la degradación de clorpirifos a una concentración de 10 y 50 mg/kg, como también de metalaxil en una concentración de 100 mg/kg, en una biomezcla compuesta por 40% de compost de residuos orgánicos, 40% de tallos de uvas y un 20% de suelo. Estos autores reportaron que la degradación de clorpirifos fue menor a la de metalaxil, comparado con la biomezcla tradicional. Sin embargo, cuando los plaguicidas fueron aplicados en conjunto, metalaxil aumentó su tasa de degradación en comparación a la del clorpirifos.

En Chile, también se han realizado algunos estudios para evaluar sustratos alternativos para la composición de la biomezcla de los lechos biológicos. En este contexto, Urrutia et al. (2013) evaluó el efecto de reemplazar total o parcialmente la paja de trigo por otros residuos lignocelulósicos como cascarilla de cebada, aserrín de pino y cascarilla de avena, sobre la degradación de atrazina, clorpirifos e isoproturon. Estos autores reportaron que la substitución parcial de la paja de trigo por cascarilla de avena mostró una alta disipación de los plaguicidas evaluados. Sin embargo una muy baja disipación ( $t_{1/2} > 100$ ) fueron encontrados para todas las biomezclas evaluadas donde la paja de trigo se substituyó completamente. Resultados similares fueron obtenidos por Diez et al. (2013) donde el reemplazo parcial de paja de trigo por sustratos lignocelulósicos alternativos mostró una gran eficiencia en la degradación de 6 plaguicidas evaluados. Sin embargo, una lenta degradación se obtuvo al reemplazar total o parcialmente la paja de trigo por aserrín de pino.

Como se mencionó anteriormente, muchos estudios han evaluado la capacidad de degradación de la biomezcla tradicional así como de biomezclas alternativas. Sin embargo, así como los plaguicidas pueden causar efectos negativos sobre el comportamiento de las comunidades microbiológicas del suelo y afectar algunos parámetros bioquímicos de este, es razonable esperar que los plaguicidas puedan también afectar las poblaciones microbiológicas y actividades enzimáticas de la biomezcla del lecho biológico. Por lo tanto, un mejor conocimiento de la microbiología de la biomezclas del lecho biológico es crucial para la comprensión del impacto de los plaguicidas sobre la diversidad funcional y las comunidades de la biomezclas del lecho biológico.

## **2.6 Efecto de los plaguicidas sobre parámetros microbiológicos de la biomezcla**

La biomezcla tiene como propósito, el mantener las actividades biológicas de los microorganismos en un estado óptimo para la degradación de los plaguicidas. La aplicación de éstos en la biomezcla provoca una cadena de reacciones, las cuales van desde actividades enzimáticas a la modificación de las comunidades microbianas.

**2.6.1 Actividad hidrólisis de la fluoresceína diacetato.** La actividad FDA ha sido poco utilizada en la evaluación de parámetros microbiológicos de la biomezclas de los lechos biológicos. Sin embargo, Karanasios et al. (2010) evaluó los niveles de FDA en biomezclas compuestas por compost de residuos orgánicos expuestas a plaguicidas. Estos autores reportaron que la FDA aumentó significativamente durante los primeros 28 días después de la aplicación de los plaguicidas, seguido por un decrecimiento gradual en la actividad después de 42 días de incubación. Resultados similares han sido reportados por Tortella et al. (2013a) quienes realizaron un ensayo de aplicación repetida de carbendazima en una biomezcla compuesta por paja de trigo, suelo y turba evaluando su efecto sobre diferentes parámetros microbiológicos. Estos autores reportaron diferencias significativas en la FDA después de la tercera aplicación de carbendazima, siendo los valores más altos de FDA (90 fluoresceína  $\mu$  g/h) determinados en la biomezcla contaminada con el plaguicida. Por otra parte Urrutia et al. (2013) evaluaron el efecto de diferentes sustratos (paja de trigo, cascarilla de cebada, aserrín de pino y cascarilla de avena) sobre la degradación de atrazina, clorpirifos e isoproturon. Al evaluar la actividad enzimática, se observaron altos valores de FDA en las biomezclas evaluadas, indicando que todas se encontraban biológicamente activas durante el tiempo de incubación y no fueron afectadas significativamente por la presencia del los plaguicidas.

**2.6.2 Actividad lignolítica.** La actividad ligninolítica de la biomezclas de los lechos biológicos depende en gran medida del sustrato que aporta lignina a los microorganismos, dado que es este sustrato el encargado de estimular el crecimiento de los hongos de pudrición blanca y por lo

tanto la producción de enzimas extracelulares ligninolíticas como lignina peroxidada, manganeso peroxidada y lacasa (Castillo y Torstensson 2007; Castillo 1997). En este contexto, se ha reportado que una alta concentración de nitrógeno en la biomezcla no sería favorable ya que limita o inhibe la producción de las enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca (Castillo et al., 2008; Waldrop et al., 2006; Pigeon et al., 2006). En una revisión realizada por Castillo et al. (2008) se señala que las enzimas ligninolíticas son de gran importancia en la biomezcla ya que participarían directamente en la degradación de los plaguicidas. En relación con esto, Castillo et al. (2007) realizaron un estudio utilizando una biomezcla compuesta por 50% de paja, 25% de turba y 25% de suelo y evaluaron el efecto de la humedad y la temperatura sobre la degradación de metamitron y cloridazon. Los autores reportaron que una correlación positiva entre la actividad fenoloxidasa y la degradación de los plaguicidas fue observada. Por otra parte, resultados contrarios han sido reportados por Tortella et al. (2013a) al evaluar la degradación de carbendazima (40 mg/kg) en una biomezcla compuesta por 50% de paja, 25% de turba y 25% de suelo la cual fue aplicada sucesivamente cada 30 días en tres oportunidades. Estos autores reportaron que aún cuando carbendazima fue degradada eficientemente después de las tres aplicaciones y se obtuvieron valores altos de actividad fenoloxidasa, la degradación del plaguicida no fue positivamente correlacionada con la producción de estas enzimas, indicando que otras enzimas podrían también participar de la degradación de los plaguicidas en la biomezcla. En otro estudio realizado por Karanasios et al. (2010a) evaluando la degradación de una mezcla de plaguicidas en distintos tipos de biomezcla, reportaron que la degradación de los plaguicidas en una biomezcla compuesta por residuos de mazorca de maíz y paja fue alta y similar a la obtenida en una biomezcla convencional con paja, turba y suelo, observándose también un aumento de la actividad lacasa.

**2.6.3 Actividad fosfatasa.** La enzima fosfatasa o fosfohidrolasas realizan la mineralización del fósforo orgánico del suelo, para aumentar la disponibilidad del fósforo para las plantas. Estas enzimas son producidas por hongos y bacterias presentes en la rizósfera (Richardson, 2001). Estas enzimas se dividen en dos tipos dependiendo de su pH, en fosfatasa ácida y fosfatasa

alcalinas (Obserson et al., 1996; Tabatabai, 1994). Este proceso es de suma importancia para la producción agrícola, ya que permite disminuir el uso de los fertilizantes y aprovechar el fósforo orgánico presente en el suelo (Gyaneshwar et al., 2002). En el estudio del efecto de los plaguicidas sobre la actividad microbiana, se ha reportado que el uso de la medición de la actividad fosfatasa permite una visualización de la actividad metabólica de los microorganismos (Van Dyk y Pletschke, 2011)

La actividad fosfatasa no ha sido frecuentemente utilizada para evaluar la calidad de la biomezcla de un lecho biológico. Sin embargo, en un estudio reciente Tortella et al. (2013b) evaluaron el efecto de la aplicación repetida de carbendazima (40 mg/kg) en una biomezcla compuesta de suelo (25%), turba (25%) y paja de trigo (50%) sobre la actividad fosfatasa de la biomezcla. Los autores reportaron que un efecto negativo fue producido por la aplicación del plaguicida sobre la fosfatasa ácida y alcalina. Sin embargo, los efectos fueron temporales y la actividad retornó a niveles similares a los del control después de 90 días de incubación. Resultados similares fueron obtenidos por Tortella et al (2013a) donde la aplicación repetida de atrazina a 40 mg/kg en una biomezcla compuesta por paja, turba y suelo, causó un efecto negativo sobre la fosfatasa ácida de la biomezcla. Aunque contrariamente, un efecto estimulante debido a la presencia del plaguicida fue observado con la fosfatasa alcalina.

**2.6.4 Actividad deshidrogenasa.** La deshidrogenasa son enzimas oxirreductasas, las cuales oxidan compuestos orgánicos por medio de la transferencia de dos átomos de hidrógenos (Trevors, 1984). Su actividad es medida a través de la actividad deshidrogenasa, resultado de varias actividades de esta enzima en el suelo (Cassida, 1977). Esta puede ser utilizada para observar la intensidad de la actividad de los microorganismos en el suelo, ya que esta solo es producida por microorganismos vivos y no se acumula en el tiempo (Tabatabai, 1982; Martens et al., 1992; Cooper y Warman, 1997).

Al igual que la enzima fosfatasa, la actividad deshidrogenasa no se ha utilizado como parámetro frecuente en evaluaciones microbiológicas de los lechos biológicos. Sin embargo, de acuerdo a

lo reportado por Tortella et al. (2013a), se ha observado que la adición de plaguicidas, como carbendazima a la biomezcla ocasiona una reducción de un 30% en su actividad después de 20 días de la aplicación de carbendazima. Aunque, esta actividad es recuperada a los niveles iniciales tras sucesivas aplicaciones del plaguicida, demostrando una posible adaptación de los microorganismos a la presencia del plaguicida. Resultados similares fueron obtenidos al aplicar sucesivamente atrazina a la biomezcla (Tortella et al. (2013b)

**2.6.5 Análisis de poblaciones microbianas.** La evaluación de las poblaciones microbianas en el suelo, ha sido muy amplio a lo largo de los años. Los análisis de biomasa, respiración y actividad enzimática de los microorganismos han aportado un cierto entendimiento de la respuesta de los organismos presentes en el suelo debido a perturbaciones como la aplicación de plaguicidas, pero aun así no se logra observar detalladamente los cambios en las especies microbianas y entender la interacción entre estas comunidades. La mayoría de los microorganismos no pueden ser observados en medios de cultivos, ya que una gran cantidad de ellos no son cultivables. Por lo tanto, la utilización de herramientas moleculares para observar cambios en las comunidades microbiológicas del suelo (Gomez et al., 2006; Ferreira et al., 2009; Wang et al., 2009) y de la biomezcla de lechos biológicos (Coppola et al., 2011; Marinozzi et al., 2012; Tortella et al., 2013a; Tortella et al., 2013b) debido a perturbaciones ambientales o antropogénicas ha sido de gran utilidad.

Si bien, la información en relación al efecto de los plaguicidas sobre las poblaciones microbianas de la biomezcla de los lechos biológicos es escasa y ha sido solo estudiada en detalle durante los últimos 5 años, algunos trabajos incluyendo el uso de herramientas moleculares han sido realizados. En este sentido Coppola et al. (2011) realizaron un estudio de la aplicación de diferentes fungicidas en una biomezcla compuesta por compost de residuos orgánicos y paja de trigo, y evaluar su efecto sobre las comunidades microbianas. Estos autores reportaron que mediante el uso de DGGE fue posible observar una reducción de las comunidades y la diversidad de los hongos presentes en la biomezcla debido a la presencia de los fungicidas. Resultados similares fueron reportados por Marinozzi et al. (2012). Recientemente, Tortella et al. (2013a, b)

evaluaron el efecto de la aplicación de carbendazima y atrazina sobre las comunidades de bacterias, hongos y actinobacterias en una biomezcla compuesta por paja de trigo (50%), suelo (25%) y turba (25%). Estos autores reportaron que mediante el uso de DGGE fue posible observar que las comunidades no fueron afectadas significativamente después de la aplicación de tres dosis sucesivas de los plaguicidas.

Si bien la técnica de DGGE permite observar de la población microbiana y los efectos de los plaguicidas en su estructura, esta solo es una técnica semi-cuantitativa. Es por esto que se emplean otras técnicas moleculares para cuantificar más detalladamente el efecto que se observa a nivel molecular. Una de las técnicas que ha surgido en los últimos años y que posee una alta sensibilidad ha sido la reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time PCR o qPCR) (Kabir et al., 2003; Kolb et al., 2003). Esta técnica tiene como base el uso de un fluoróforo, el cual por cada copia del fragmento amplificado provoca una luminiscencia, que se va acumulando durante los ciclos de amplificación (Raeymaekers, 2000)

Varios autores han reportado que la técnica de la qPCR ha demostrado una excelente correlación, con la degradación de plaguicidas y con otros análisis durante la última década (Evrard et al., 2010; Nielsen et al., 2011; Sagakar et al., 2012; Knudsen et al., 2013). Sin embargo, no existen reportes previos del uso de esta técnica para el estudio de comunidades microbianas en la biomezcla de un lecho biológico.

### **3. HIPÓTESIS**

La degradación de plaguicidas, así como las actividades biológicas y la diversidad de las comunidades microbianas de la biomezcla de un lecho biológico, serán negativamente afectadas debido a presencia de oxiclورو de cobre, siendo este efecto proporcional a la cantidad de oxiclورو de cobre adicionado. Sin embargo, el efecto negativo será atenuado en el corto plazo debido a que los componentes de la biomezcla favorecerán y estimularán el desarrollo de una microbiota robusta, permitiendo una rápida degradación de los plaguicidas presentes en la biomezcla.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la aplicación de oxiclورو de cobre en distintas concentraciones sobre las actividades biológicas y comunidades microbianas de una biomezcla de un lecho biológico.



## **5. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ❖ Evaluar el efecto de la aplicación de oxiclورو de cobre en diferentes concentraciones sobre la degradación de atrazina, diazinon y carbendazima en una biomezcla de un lecho biológico.
- ❖ Evaluar el efecto de la aplicación de oxiclورو de cobre en diferentes concentraciones sobre la diversidad y estructura de comunidades microbianas de una biomezcla de un lecho biológico.
- ❖ Evaluar el efecto de la aplicación de oxiclورو de cobre en diferentes concentraciones sobre las actividades biológicas de una biomezcla de lechos biológicos.

## **6. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 Compuestos químicos**

Para la realización del estudio se utilizaron dos formulaciones de plaguicidas. La primera correspondiente a los estándares analíticos, utilizados para la elaboración de curvas de calibración y posterior cuantificación de los plaguicidas residuales y una segunda correspondiente a las formulaciones comerciales de cada uno de los plaguicidas evaluados, los que fueron utilizados para los ensayos biológicos y de degradación de estos en la biomezcla. El estándar analítico de atrazina (99% de pureza) fue suministrada por Chem Service (West Chester. USA). La formulación comercial de atrazina correspondió a Atranex 50 SC, la que fue obtenida de Agan Chemicals Manufactures Ltd. El estándar analítico de carbendazima (99% de pureza) fue suministrada por Sigma Aldrich (Chile). La formulación comercial de carbendazima correspondió a Itabar 50%, la que fue obtenida de Solchem Ltda., Chile.

El estándar analítico de diazinon (99% de pureza) fue suministrada por Sigma Aldrich (Chile). La formulación comercial de diazinon correspondió a Simpulquil, la que fue suministrada por Drag Oharma (Chile Invetec S.A). La formulación comercial del oxiclورو de cobre utilizado para los ensayos de degradación correspondió a Anasac 70 SC, la que fue obtenida por Agrícola Nacional S.A.C el. (Chile). MBTH (3-metil-2benzotiazolinona hidrazona) y DMAB (3-(dimetilamino) ácido benzoico, fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Chile).

### **6.2 Preparación del lecho biológico**

Para la preparación de la biomezcla se realizó una mezcla de paja (43% de carbón orgánico), suelo y turba comercial (39,6% de carbón orgánico) en una proporción 2:1:1 v/v. El suelo fue recolectado (0-20 cm de profundidad) del campo experimental Maquehue de la Universidad de la Frontera y sus principales propiedades físico-químicas son presentadas en el Cuadro 1. La paja fue fragmentada en pequeños trozos (3 mm) y la turba fue tamizada (3 mm) para obtener

partículas pequeñas. Posteriormente, todos los componentes fueron mezclados homogéneamente y se almacenaron en un recipiente plástico en una cámara de incubación a 25 °C y en oscuridad por 6 meses. La humedad de la biomezcla fue ajustada a un 50% y mantenida durante el tiempo mediante la adición periódica de agua destilada estéril.

**Cuadro 1.** Principales características físico-químicas del suelo utilizado en el estudio

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
N (mg/kg)	36
P (mg/kg)	12
K (mg/kg)	751
Cu (mg/kg)	1.81
pH (H <sub>2</sub> O)	6.1
Materia Orgánica (%)	18
Arena (%)	30.8
Limo (%)	41.8
Arcilla (%)	27.4

### **6.3 Ensayo de degradación de plaguicidas en presencia de oxiclورو de cobre.**

Para el ensayo de degradación se tomaron 2,0 kg peso seco de la biomezcla previamente incubada y traspasada a un recipiente de vidrio de 40 x 20 x 10 cm de alto. Posteriormente, la biomezcla fue homogéneamente contaminada mediante un atomizador con una mezcla de plaguicidas compuesta por atrazina, carbendazima y diazinon los cuales fueron diluidos en un volumen predeterminado de agua destilada estéril y de acuerdo a su formulación comercial para conseguir una concentración final en la biomezcla de 10 mg/kg de cada uno de los plaguicidas.

Posterior a esto la biomezcla fue nuevamente contaminada con oxiclورو de cobre (OxCu, formulación comercial) el cual fue diluido en agua destilada estéril y en una concentración apropiada para lograr una concentración final en la biomezcla de 10, 100 y 1,000 mg/kg. Finalmente, los recipientes con las biomezclas fueron almacenados durante 30 días en una cámara de incubación a  $20 \pm 2$  °C y en oscuridad. La humedad se mantuvo aproximadamente en un 50% mediante adiciones periódicas de agua destilada estéril. Como control se utilizó una biomezcla libre de plaguicidas y OxCu, y como blanco se utilizó una biomezcla contaminada solo con la mezcla de los plaguicidas. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Durante todo el tiempo de incubación y a intervalos fijos de tiempo (0, 7, 14, 21 y 30 días) fueron colectadas muestras de cada uno de los ensayos para la determinación de plaguicida residual y actividades biológicas.

#### **6.4 Actividades enzimáticas**

La actividad fosfatasa fue determinada de acuerdo a la metodología de Tabatabai y Bremmer (1994). Para esto se extrajo 1 g peso seco de biomezcla homogenizada y se llevó a un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Se adicionó 1 mL de *p*-nitrofenil fosfato (PNP) (0.05M) y 4 mL de Buffer universal modificado (MUB) (Anexo 1) a pH 5.5. Posterior a esto, los matraces se incubaron durante 1 hora en un baño termorregulador a 37 °C. Luego de la incubación, se detuvo la reacción adicionando 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5 M) y posteriormente filtrando la solución completa a través de papel filtro Watman n°2 en un matraz de 100 mL que contenía en su interior 4 mL de NaOH (0,5M). Finalmente se homogeniza toda la solución y se filtra nuevamente a través de papel filtro Watman n°2. El filtrado final es colectado y analizado mediante un espectrofotómetro a 405 nm. Para la realización de la curva estándar se utilizó *p*-nitrofenol como sustrato en concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 y 0,6 mg/mL. Los resultados fueron expresados en µg *p*-nitrofenol g/h.

La actividad lignolítica fue evaluada de acuerdo a la metodología propuesta por Castillo et al. (1994). Para esto, se tomaron 5 g peso seco de la biomezcla y puestos en un matraz Erlenmeyer

de 100 mL. Se adicionó 10 mL de buffer succinato lactato (100 mM a pH 5) (Anexo 2) y se incubó durante una hora un agitador orbital (250 r.p.m) a temperatura ambiente. Luego de la incubación, la muestra se traspasó a un tubo de teflón de 50 mL y centrifugado a 4,500 r.p.m durante 10 minutos. Posterior a esto se tomó el sobrenadante y filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa (0,45  $\mu\text{m}$ ). Para realizar la medición de la actividad fenoloxidasa se utilizó una cinética enzimática de una duración de 5 minutos en un espectrofotómetro a 590 nm. La mezcla de reacción contenía 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  (20 mM), 100  $\mu\text{L}$  de MBTH (1,4 mM) y 300  $\mu\text{L}$  de DMAB (6,6 mM) adicionado en este mismo orden y para iniciar la reacción enzimática, se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 mM). Debido a que no se realizaron correcciones debido a la presencia de lignina peroxidasa (LiP) and laccase (Lac), la medición realizada puede representar la suma de manganeso peroxidasa, LiP and laccase (Castillo and Torstensson, 2007) y por lo tanto expresadas como actividad fenoloxidasas (U/ kg).

La actividad deshidrogenasa fue evaluada mediante la metodología propuesta por Casida et al. (1977). Para esto, se procedió a extraer 2 g peso seco de la biomezcla y se llevó a tubos de vidrio de 30 mL al cual se le adicionó 4 mL de buffer Tris (pH 6) (ver anexo) con 2 mL de 2,3,5-trifeniltetrasolium cloruro al 1% (TTC) y se dejó incubando durante 24 hrs a 37 °C en un baño termostático. Luego de la incubación, se adicionaron 10 mL de metanol y se agitó vigorosamente para extraer el producto de la reacción (trifenilformasan, TFF) el cual presenta una coloración rosácea. Luego se traspasó toda la solución a un tubo de teflón y se procedió a centrifugar a 4,000 r.p.m por 10 minutos a 4 °C. La concentración de TFF en el sobrenadante fue determinado por medio de un espectrofotómetro a 485 nm. Para la realización de la curva estándar se utilizó TFF (1% p/v) como sustrato en concentraciones de 0-3,33-6,67-16,7-33,3  $\mu\text{g/ml}$ . El resultado final fue expresado en  $\mu\text{g}$  TFF por g/h.

La actividad de hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA) fue evaluada, utilizando la metodología descrita por Schnurer y Rosswall (1982). Para esto, se extrajo 1 g peso seco de la biomezcla y se llevó a tubos de vidrio de 30 mL al cual se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de solución FDA (2 mg/mL) y 9,9 mL de buffer fosfato (60 mM) (ver anexo). Luego se dejó los tubos incubando durante una hora a 37 °C en un baño termostático. Posterior a la incubación se detuvo la

reacción, añadiendo a los tubos 10 mL de acetona grado analítico y agitando vigorosamente. Posteriormente la solución contenida en los tubos fue filtrada a través de papel Watman N° 2 en un matraz de 100 mL. El filtrado fue medido mediante un espectrofotómetro a 490 nm y los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g FDA g/ h}$ .

La actividad  $\beta$ -glucosidasa, fue analizada mediante la metodología propuesta por Eivazi y Tabatabai, (1988). Para esto, se extrajo 1 g peso seco de la biomezcla y se llevó a un tubo de vidrio de 30 mL al cual se le adicionó 0,25 mL de tolueno, 1 mL de una solución de *p*-nitrofenil- $\beta$ -*o*-glucosidasa (25 mg/mL) y 9,9 mL de buffer MUB (pH 6.0). Luego los tubos fueron mantenidos en incubación durante una hora a 37 °C en un baño termorregulado. Posterior a la incubación, se adicionó en cada tubo 1 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  (0.5 M) y 4 mL de buffer Tris (pH 12) y se realizó un filtración de la solución a través de papel Wattman N °2 para luego realizar el análisis enzimático por espectrofotometría a 405 nm. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g PNF g/ h}$ .

## **6.5 Extracción de plaguicidas**

Para la determinación de carbendazima y diazinon residual en la biomezcla se tomaron 5 g peso seco de la biomezcla de cada uno de los ensayos (en triplicado) y puestos en matraces Erlenmeyer de 100 mL a los cuales se adicionó 30 mL de acetonitrilo grado HPLC y sellados con un tapón de goma para evitar volatilización del solvente. Posteriormente, los matraces se llevaron a un agitador orbital y mantenidos a 350 r.p.m durante 2 horas para ser luego ser llevados a un baño de ultrasonido durante 30 minutos. Entonces, la solución resultante fue transferida a tubos de teflón de 50 mL y centrifugados a 15,000 r.p.m durante 10 minutos. El sobrenadante de las muestras fue filtrado mediante filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE, Millipore) de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosidad y analizado mediante cromatografía líquida (HPLC). Para la determinación de atrazina residual en la biomezcla se procedió de la misma manera que para la determinación de los otros dos plaguicidas, reemplazando solo el solvente de extracción acetonitrilo por metanol grado HPLC.

Para el análisis de los plaguicidas se inyectaron las muestras previamente filtradas, en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Lachrom Elite Merck Hitachi, equipado con una bomba L-2130, inyector Rheodyne 7725 con un loop de 20  $\mu\text{m}$  y un detector de arreglo de diodo modelo L-2455. Para la separación se utilizó una columna C18 (Chromolith RP-18e, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100 mm). Como eluyente A se utilizó acetato de amonio (1 mM) y como eluyente B se utilizó acetonitrilo grado HPLC. La tasa de flujo utilizada fue de 1 mL/min, en modo isocrático. La temperatura de la columna fue mantenida a 30 °C y el detector fue ajustado a 222, 249 y 290 nm para atrazina, diazinon y carbendazima respectivamente.

## **6.6 Recuento de microorganismos cultivables**

Para la determinación de microorganismos cultivables en la biomezcla se procedió a extraer 10 gr. peso seco de la biomezcla, y puesta en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de solución salina de NaCl (0,85% p/v) previamente esterilizada a 121 °C durante 20 minutos y agitado a 200 r.p.m en un agitador orbital durante 1 hora. Posteriormente los tubos se dejaron decantar durante 30 minutos y con el sobrenadante se realizó una dilución seriada de concentraciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Para la determinación de hongos se tomó 1 mL de la dilución  $10^{-4}$ , la cual fue adicionada a una placa Petri estéril conteniendo agar rosa de bengala estreptomycinina (Oxoid Ltd, Uk) y mantenida en una estufa de cultivo a 25 °C durante 48 hrs. Para el aislamiento de actinobacterias se utilizó 1 mL de la dilución  $10^{-5}$  la cual fue adicionada a una placa Petri estéril conteniendo agar para aislamiento de actinobacterias (Actinomycetes isolation agar, Difco) y mantenida en una estufa de cultivo a 30 °C durante 72 hrs. Para el aislamiento de bacteria se utilizó 1 mL de dilución  $10^{-6}$  y adicionado en una placa Petri estéril conteniendo Agar Plate Count (Difco) y mantenida en una estufa de cultivo a 30 °C durante 48 hrs. Todos los medios de cultivo utilizados fueron diluidos de acuerdo a la recomendación del fabricante y posteriormente esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min previo a su utilización.

## **6.7 Extracción de ADN**

La extracción de ADN total desde la biomezcla se realizó utilizando un kit de extracción de DNA de suelo (Nucleo Spin Soil®, Macherey-Nagel), utilizando entre 400 y 500 mg de la biomezcla y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado mediante un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una longitud de 260 y 280 nm para confirmar su pureza.

## **6.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó 10 µL de buffer “Green GoTaq® Flexi” 5X, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de DNTP’S (10 mM), 1 µL de primer forward (10 mM), 1 µL primer reverse (10 mM), 0,25 µL de Taq polimerasa (5U µL, Go Taq® Flexi DNA polimerase, Promega Corp), 3 µL de ADN (50 ng µL) y 31,25 µL de agua destilada estéril desionizada. Los partidores utilizados para la amplificación de las regiones ribosomales de actinobacterias, bacterias y hongos se observan en el Cuadro 2. Todas las PCR, fueron realizadas utilizando un termociclador (Multigene, Labnet).

El programa de PCR en la identificación de los hongos fue realizada con una denaturación inicial de 8 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de una denaturación de 30 segundos a 94 °C, una hibridación de 30 segundos a 58 °C y una extensión de 1 minuto a 72 °C, para finalizar con una extensión de 5 minutos a 72 °C. Para el programa de reacción de PCR en la identificación de bacterias fue realizada con una denaturación inicial de 8 minutos a 94 °C, seguida de 32 ciclos de una denaturación de 30 segundos a 94 °C, una hibridación de 30 segundos a 58 °C y una extensión de 1 minuto a 72 °C, para finalizar con una extensión de 5 minutos a 72 °C. El programa de la reacción de PCR en la identificación de actinobacterias se realizó una primera amplificación con los partidores F243 y R1378 con una denaturación inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de una denaturación de 95 °C por 30 segundos, una hibridación a 60 °C por 30 segundos y una extensión de 72 °C por 90 segundos, para finalizar con una



extensión a 72 °C por 10 minutos. El producto de PCR fue purificado con el kit Cycle Pure Kit (Omega Bio-Teck) antes de realizar la segunda amplificación con los partidores F341-GC y R534 utilizando el programa de reacción de PCR de bacterias anteriormente descrito.

La visualización de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel red 6X (Invitrogen) con un volumen de 10 µL de muestra y se llevó a una cámara de electroforesis horizontal a 90 volts durante 40 minutos, para posteriormente ser visualizado en un transluminador UV.

**Cuadro 2.** Partidores utilizados para la reacción de PCR, en la amplificación de las regiones variables de ADN ribosomal de actinobacterias, bacterias y hongos.

Primers	Secuencia	Blanco	Región	Referencia
ITS 3-GC 1	(GC) ATCGATGAAGAACGCAGC	Hongos	5,8 S	(White et al., 1990)
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Hongos	5,8 S	(White et al., 1990)
F341-GC 2	(GC) CCTACGGGAGGCAGCAG	Bacterias	16 S	(Muyzer et al., 1993)
R534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Bacterias	16 S	(Muyzer et al., 1993)
F243	GGATGAGCCCGCGGCCTA	Actinomicetos	16 S	(Heuer et al., 1997)
R1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAC	Actinomicetos	16 S	(Heuer et al., 1997)
GC 1	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCCCC			
GC 2	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG			

## 6.9 Electroforesis en Gel de Gradiente denaturante (DGGE)

Para el estudio de las comunidades microbianas se utilizaron los productos de PCR resultantes de actinobacterias, bacterias y hongos los cuales fueron analizados mediante DGGE utilizando un gel de poliacrilamida (Anexo 3) con gradiente lineal denaturante urea-formamida 20% y 50% para actinobacteria, un gradiente de 30% y 60% de para hongos y un gradiente de 40% y 70% de para bacterias. Los productos de PCR (20  $\mu$ L) fueron cargados en el gel de poliacrilamida y se realizó la electroforesis a 80 volts a una temperatura de 60 °C por 17 horas.

Para la visualización del gel, se utilizó una solución de nitrato de plata de acuerdo a la metodología propuesta por Sanguinetti et al. (1994). Para realizar el revelado, se traspasó el gel a una fuente de vidrio o acero inoxidable conteniendo 200 mL de una solución de Cains 1 X , preparada a partir de 20 mL de una solución 8X (10 mL  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{O}_2$  y 390 mL Etanol 95%) aforando a 200 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y se agitó durante 10 minutos. Luego se traslado el gel a otra fuente conteniendo 200 mL de Cains 1 X y 4 mg de nitrato de plata (Merck) y se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada deshionizada y trasladada a otra fuente con una solución reveladora (250 mL de NaCl 1,5% con 600  $\mu$ L de formaldehido y 10 mg de  $\text{NaBH}_4$ ) y se agitó a una agitación constante hasta obtener una completa visualización de las bandas. Finalmente se traslado a otra fuente para detener la reacción utilizando solución de 200 mL de Cains 1X. Para la visualización del gel de poliacrilamida se utilizó un transluminador de luz blanca.

El análisis de agrupamiento jerárquico (dendograma) de los perfiles de bandas obtenidos desde la técnica de DGGE, se realizó mediante el software Phoretix 1D (Nonlinear Dynamics, Durham, USA). La similitud en los perfiles de las bandas se calculó sobre la base del coeficiente de correlación de Pearson en base al UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritmo de agrupamiento. Sobre la base de la matriz obtenida a partir del análisis Phoretix 1D, los cambios en la presencia (o ausencia) y la abundancia de grupos bacterianos se analizaron mediante escalamiento multidimensional no paramétrico (nMDS) usando el programa

PRIMER-v6 (<http://www.primer-e.com/demo/demo.htm>) con índice de similitud de Bray-Curtis según lo descrito por Yang et al. (2003).

### **6.10 Reacción de Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-Tiempo Real o qPCR)**

Para la cuantificación de las comunidades microbianas se procedió a utilizar la técnica de la qPCR. Para esto se utilizó el ADN previamente obtenido 6.7. Para la reacción de qPCR se utilizó 4  $\mu\text{L}$  del buffer (HOT FIRE Pol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, Solis BioDyne Data Sheet), 0,6  $\mu\text{L}$  del primer forward (10  $\mu\text{M}$ ), 0,6  $\mu\text{L}$  del primer reverse (10  $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{L}$  de ADN (0,5 ng/  $\mu\text{L}$ ) y 10,4  $\mu\text{L}$  de agua estéril desionizada. Los partidores utilizados para la amplificación de las regiones ribosomales de actinobacterias, bacterias y hongos se observan en el Cuadro 3. La reacción de qPCR, fue llevada a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, Step One Plus Real-Time PCRT System).

El programa para la reacción de qPCR fue realizada con una denaturación inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos con una denaturación de 15 segundos a 95 °C, una hibridación de 20 segundos según la temperatura de los cebadores (Cuadro 3) y una extensión de 20 segundos a 72 °C. El programa se llevo de acuerdo según las especificaciones de la enzima de la polimerasa.

La cuantificación de los productos de PCR, fue realizado mediante el programa “Step One Software. V2.2.2” utilizando una curva de cuantificación estándar con un microorganismo conocido. El análisis se realizó en base a la cuantificación de la cantidad de ADN acumulado y el número del umbral de ciclo (CT) durante la fase exponencial de la amplificación de los genes, donde finalmente se cuantifica utilizando la curva estándar. Los resultados fueron expresados en número de copias de la región ribosomal.

**Cuadro 3.** Partidores utilizados para la reacción de qPCR, en la amplificación de las regiones variables de ADN ribosomal de actinobacterias, bacterias y hongos.

Primer	Secuencia	Hibridación	Blanco	Región	Referencia
Eub338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	63°C	Bacterias	16 S	(Muyzer et al., 1993)
Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	63°C	Bacterias	16 S	(Muyzer et al., 1993)
Actino235	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	60°C	Actinomicetos	16 S	(Fierer et al., 2005)
FR1	AICCATTTCATCGGTAIT	58°C	Hongos	16 S	(Vainio y Hantula 1999)
FF390	CGATAACGAACGAGACCT	58°C	Hongos	16 S	(Vainio y Hantula 1999)

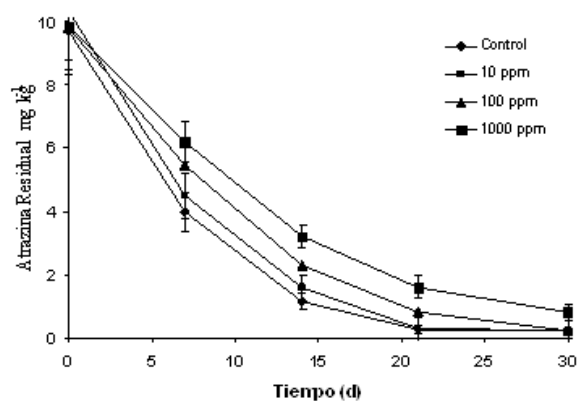
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Degradación de plaguicidas en la biomezcla

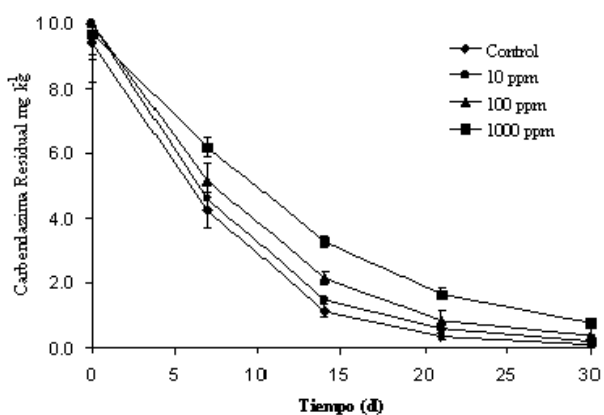
La disipación de carbendazima, atrazina y diazinon en la biomezcla en presencia de diferentes concentraciones de OxCu fueron evaluados durante 30 días y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. Después de 30 días de incubación de la biomezcla la se observó que la disipación de atrazina fue eficiente en todas las concentraciones de OxCu evaluadas comparadas al control, obteniéndose valores de disipación mayores al 90% (Figura. 5a). Sin embargo, cuando la biomezcla fue contaminada con una elevada dosis de OxCu (1,000 mg/kg) un decrecimiento en la eficiencia de disipación de atrazina fue observado. Esto se ve reflejado en la vida media ( $t_{1/2}$ ) de atrazina la cual aumenta en el tratamiento con 1000 mg/kg (7,7 días) comparado al control y los tratamientos con 10 y 100 mg/kg de OxCu los cuales obtuvieron una  $t_{1/2}$  de aproximadamente 5 días. Resultados similares fueron obtenidos en la disipación de carbendazima como se muestra en la Figura 4b, donde una menor disipación de carbendazima (92%) en relación al control fue observada. Sin embargo, la disipación de este plaguicida en la biomezcla fue más sensible a la presencia de OxCu, dado que con todas las dosis evaluadas se observó un decrecimiento en la eficiencia de disipación en relación al control. Como se observa en la Fig. 4b, la  $t_{1/2}$  obtenida aumentó con respecto al control (4,6 días), obteniéndose valores de 5,3, 6,3 y 7,7 días para las biomezclas contaminadas con 10, 100 y 1,000 mg/kg de OxCu respectivamente. Finalmente los resultado obtenidos en la disipación de diazinon en la biomezcla se muestra en la Figura 12c, donde se observó una menor disipación del plaguicida (91%) con respecto al control (99%) después de 30 días de evaluación. Como se observa en la Figura 4c, se produjo un aumento en la  $t_{1/2}$ , con respecto al control (4,4 días) obteniéndose valores de  $t_{1/2}$  de 5,5, 7,2, y 7,6 días para las biomezclas contaminadas con 10, 100 y 1,000 mg/kg de OxCu respectivamente.

Si bien a la fecha no han sido reportados estudios del efecto de OxCu sobre la degradación de plaguicidas en biomezclas de lechos biológicos, algunos resultados similares a los obtenidos en

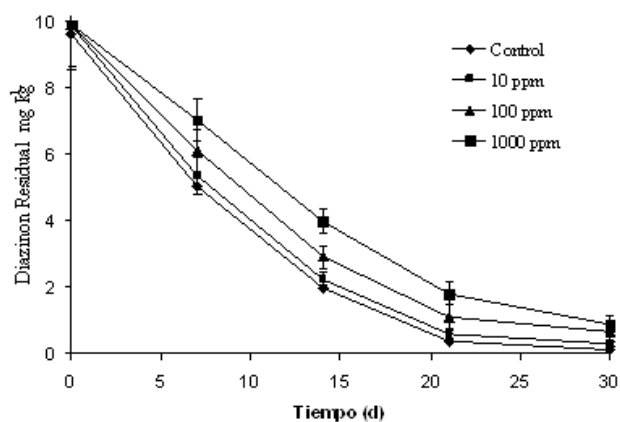
este estudio han sido reportados para suelo. En este contexto resultados reportados por Dewey et al. (2012) al evaluar el efecto de sulfato de cobre sobre tasa de degradación de atrazina e indoxacarb en un suelo, mostraron que una diferencia significativa en la degradación de atrazina con altas concentraciones de cobre 500 y 1000 mg/kg con respecto al control fue encontrada, mientras que el indoxacarb no presentó cambios significativos en su degradación con las diferentes concentraciones de sulfato de cobre evaluadas. En otro estudio Liu et al. (2007) investigaron el efecto de cobre sobre la degradación de dos plaguicidas piretroides, cipermetrin y cialotrin en suelo. Estos autores reportaron que la presencia de cobre a una concentración de 10 mg/kg incremento la vida media de los plaguicidas. En el presente estudio la presencia de cobre en la biomezcla también mostró crear un incremento en la vida media de los tres plaguicidas evaluados. Sin embargo, a diferencia de lo reportado para suelo, la biomezcla mostró ser mucho más resistente a la presencia del OxCu, mostrando un incremento en la vida media de los plaguicidas solo con concentraciones mayores a 100 mg/kg.



	Control	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
k	0.14	0.14	0.13	0.09
r <sup>2</sup>	0.90	0.90	1.00	1.00
t <sub>1/2</sub>	5.0a	5.0a	5.4a	7.7b



	Control	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
k	0.15	0.13	0.11	0.09
r <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.99	1.00
t <sub>1/2</sub>	4.61a	5.30b	6.32c	7.71d



	Control	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
k	0.16	0.13	0.10	0.09
r <sup>2</sup>	0.98	0.98	0.97	0.99
t <sub>1/2</sub>	4.4a	5.5b	7.2c	7.6c

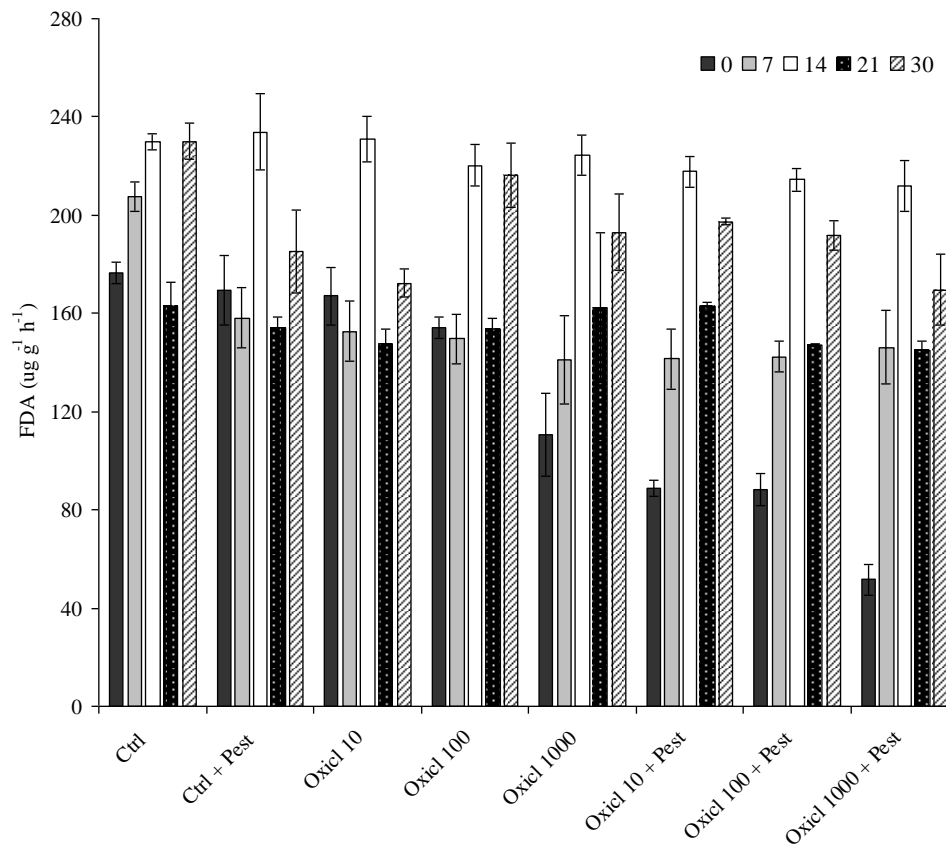
**Figura 4:** Disipación de los plaguicidas en la biomezcla de lechos biológicos en presencia de OxCu a concentraciones de 10, 100 y 1,000 mg/kg (a) atrazina (b) carbendazima (c) diazinon.

## 7.2 Actividades biológicas

**7.2.1 Hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA).** Los resultados obtenidos para la FDA se pueden observar en la Figura 5. Como se aprecia en la Figura 5, un efecto negativo sobre la FDA con respecto al control se puede apreciar inmediatamente después de la aplicación de OxCu en concentraciones de 100 y 1,000 mg/kg. Además este efecto negativo sobre la actividad enzimática se ve fuertemente incrementado cuando ambos contaminantes, OxCu y los plaguicidas se encuentran presentes en la biomezcla. En este sentido una fuerte reducción de la FDA en relación al control fue observada cuando la biomezcla fue contaminada con la mezcla de plaguicidas y 1,000 mg/kg de OxCu. Sin embargo, a pesar del efecto negativo causado por ambos contaminantes, los valores de FDA fueron recuperados a partir del día 7 después de la aplicación de los plaguicidas. Resultados similares a los obtenidos en este estudio han sido reportados por Tortella et al. (2013a) al estudiar la aplicación de carbendazima sobre una biomezcla compuesta por paja, turba y suelo y evaluar su efecto en la actividad biológica. Estos autores reportaron que aplicaciones sucesivas de carbendazima a 40 mg/kg causó efectos negativos en la actividad FDA después de las dos primeras aplicaciones. Sin embargo, después de la tercera aplicación los valores de FDA fueron similares a los del control. Estudios realizados en biomezclas basadas en compost han mostrado una tendencia distinta. Karanasios et al. (2010a) estudiaron la aplicación de una mezcla de plaguicidas (azoxistrobina, buprofezina, clorpirifos, dimeoato, iprodione, metalalxil y metribuzina) en distintas biomezclas con diferentes sustratos lignocelulósicos (cáscaras de naranja, cultivos de girasol, cultivos de maíz, hojas de olivo, mazorcas de maíz, paja, residuos para hongos comestibles y tallos de uva). Estos autores reportaron un aumento inicial en la FDA debido a la presencia de los plaguicidas. Sin embargo, la actividad mostró un descenso después de 28 días de aplicados los plaguicidas. En otro trabajo, Urrutia et al. (2013) evaluaron el del reemplazo de la paja de trigo por otros sustratos lignocelulósicos (cascarilla de cebada, aserrín de pino y cascarilla de avena) y efecto en la degradación de plaguicidas y actividades biológicas de la biomezclas. Estos autores reportaron que la actividad FDA fue alta comparadas al control en todas las biomezclas evaluadas, no siendo afectada por la presencia de los plaguicidas. A diferencia de otros estudios, los ensayos



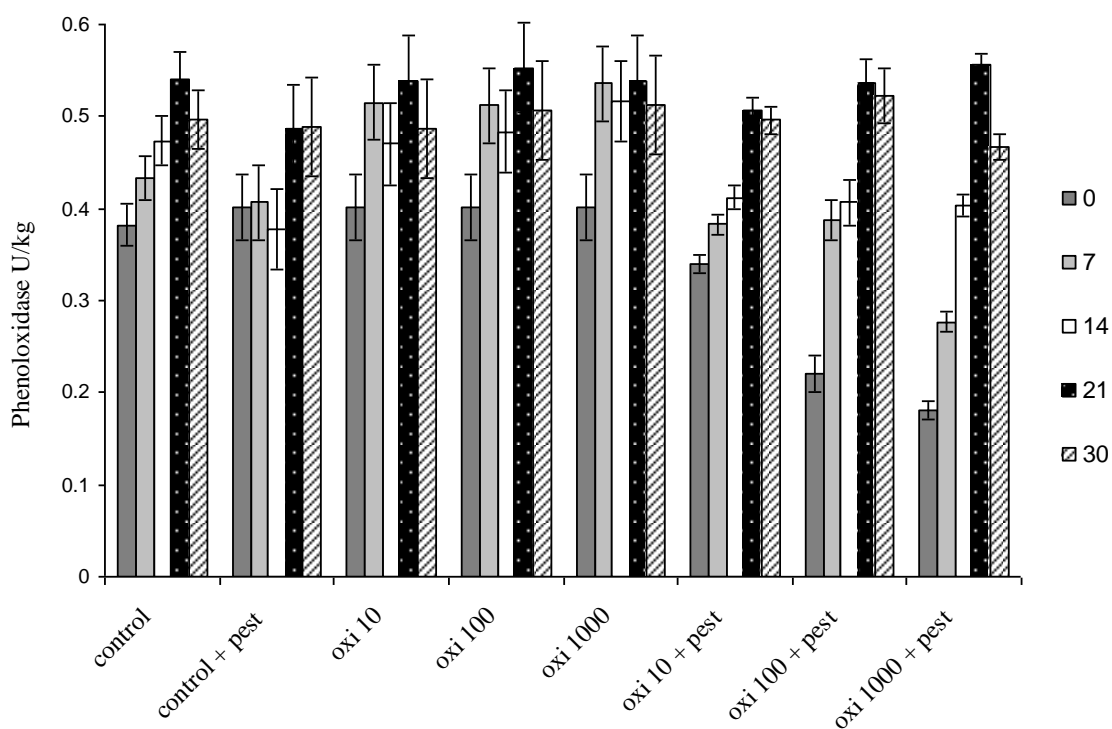
realizados mostraron un fuerte descenso de la FDA inmediatamente después de la aplicación de los plaguicidas y OxCu. Sin embargo, la biomezcla mostró una gran capacidad de resiliencia, demostrando que ésta actividad no es inhibida por la presencia de OxCu en altas dosis.



**Figura 5:** Efecto de las diferentes concentraciones de OxCu y mezcla de plaguicidas, sobre la actividad fluoresceína diacetato de la biomezcladespués de 30 días de incubación.

**7.2.2 Actividad lignolíticas.** La actividad lignolítica, fue evaluada a través de la actividad fenoloxidasa y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6. Como se aprecia en la Figura 6, la mezcla de plaguicidas o la aplicación solamente de OxCu a la biomezcla no afectaron la actividad lignolítica de ésta. En este sentido, la actividad fenoloxidasa muestra un decrecimiento significativo con respecto al control en los tratamientos con altas dosis de OxCu (100 y 1,000

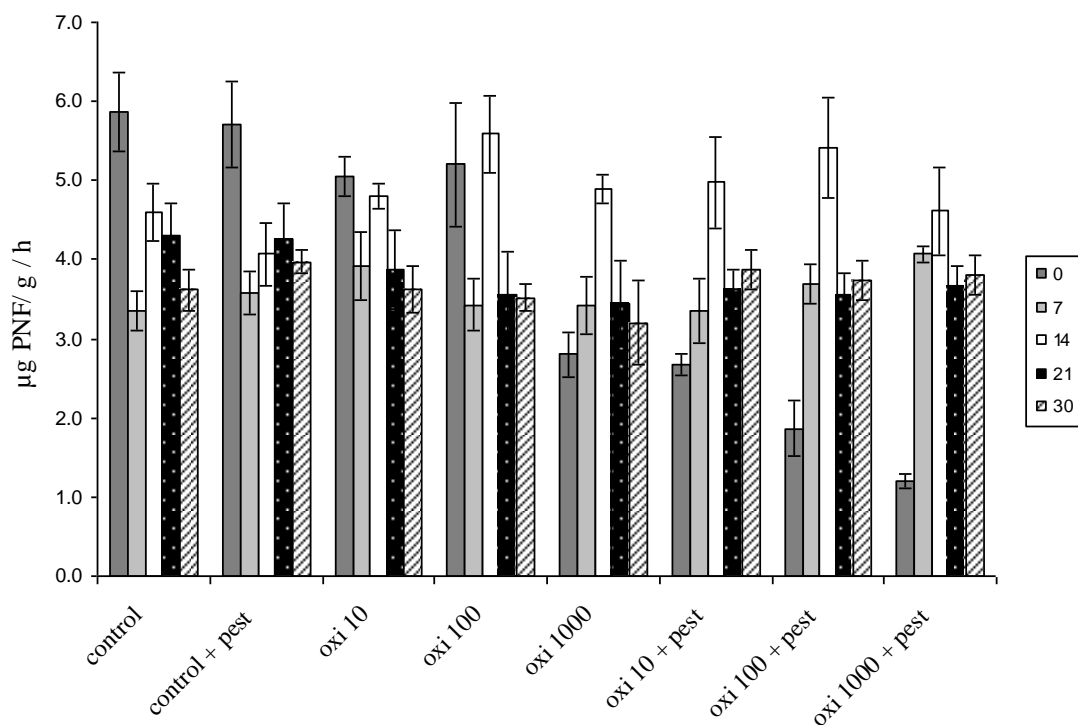
mg/kg) y en presencia de los plaguicidas. Sin embargo, la actividad es recuperada después de 7 días de aplicado los plaguicidas a la biomezcla. Si bien no se han realizado estudios sobre el efecto de OxCu en la actividad ligninolíticas en suelo o en biomezclas de lechos biológicos, resultados reportados por Tortella et al. (2013b) mostraron resultados similares a los encontrados en este estudio donde la aplicación sucesiva de atrazina (40 mg/kg) sobre una biomezcla tradicional causó un decrecimiento en la actividad fenoloxidasa después de la aplicación del plaguicida. Sin embargo la actividad fenoloxidasa fue recuperada y valores superiores a los del control fueron observados después de 90 días de incubación. Un efecto similar fue reportado por Karanasios et al. (2010a) donde se observó que la actividad lacasa de una biomezcla compuesta por distintos substratos lignocelulósicos fue incrementada por la presencia de una mezcla de plaguicidas



**Figura 6:** Efecto de las diferentes concentraciones de OxCu y mezcla de plaguicidas, sobre la actividad fenoloxidasa de la biomezcla durante 30 días de incubación.

**7.2.3 Actividad fosfatasa.** Los resultados obtenidos de la evaluación de la fosfatasa ácida (Figura 7) muestran un efecto inhibitorio inmediato cuando la biomezcla fue contaminada solo con una alta dosis de OxCu (1,000 mg/kg) y sin presencia de los plaguicidas y cuando ambos compuestos, es decir OxCu en todas las concentraciones evaluadas y los tres plaguicidas están presentes en la biomezcla. Sin embargo, este efecto negativo observado y al igual que en las demás actividades enzimáticas evaluadas fue recuperada después de 90 días de incubación.

A la fecha no se han reportado estudios acerca del efecto del Cu sobre las propiedades biológicas de la biomezcla de lechos biológicos. Sin embargo, Wyszowska et al. (2006) han reportado que concentraciones de Cu (50 y 450 mg/kg) mostraron una fuerte reducción de la actividad fosfatasa ácida del suelo, especialmente con 450 mg/kg donde no se observó una recuperación de la actividad durante el tiempo de duración del ensayo. En este mismo contexto Wyszowska et al. (2005) evaluó el efecto de diferentes concentraciones de cobre (20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 mg/kg) en un suelo con paja de triticale. Estos autores reportaron un efecto inhibitorio de la actividad de la fosfatasa acida en presencia de cobre sobre los 60 mg/kg en suelo sin paja, mientras que los efectos negativos causados por el cobre fueron atenuados en el suelo enmendado con paja de triticale. Los resultados encontrados por Wyszowska et al. (2005) podrían explicar en parte lo encontrado en este estudio, donde la biomezcla al contener un componente lignocelulósico favorecería la actividad microbológica o serviría como un sustrato atenuante a las condiciones tóxicas presentadas por el cobre.

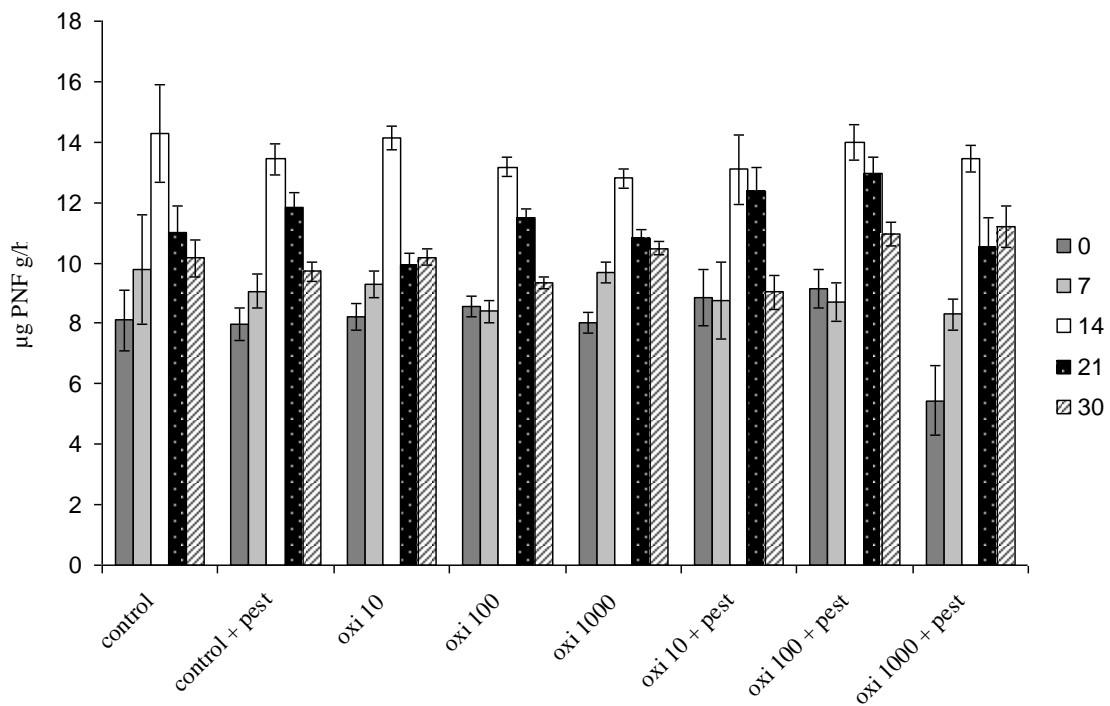


**Figura 7:** Efecto de las diferentes concentraciones de OxCu y mezcla de plaguicidas, sobre la actividad fosfatasa ácida de la biomezcla durante 30 días de incubación.

**7.2.4 Actividad  $\beta$ -glucosidasa.** Los resultados obtenidos en la actividad  $\beta$ -glucosidasa (Figura 8) mostraron que esta actividad enzimática fue muy estable en el tiempo y no se observaron diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos con respecto al control, Sin embargo, un claro efecto inhibitorio fue observado en la biomezcla que fue contaminada con los tres plaguicidas y 1,000 mg/kg de OxCu, aunque este efecto fue solo temporal y la actividad fue recuperada completamente después de 30 días de incubación, donde claramente se puede asociar esta recuperación con un descenso en la concentración de los plaguicidas de la biomezcla.

A la fecha no existen reportes en relación a la determinación de actividad  $\beta$ -glucosidasa en biomezcla de lechos biológicos. Sin embargo, se ha reportado que en el suelo la aplicación de bromuro de metilo y cloropicrina causó un decrecimiento de esta actividad en el tiempo, sin que existiese una recuperación de esta actividad (Klose y Ajwa 2004). Resultados similares fueron

reportados por Bishnu et al. (2008), quien encontró que la aplicación de una mezcla de plaguicidas (etion, clorpirifo y restos de endosulfan) causó una disminución importante de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, indicando que al endosulfan fue el principal responsable de la disminución de la actividad enzimática. Los resultados obtenidos de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en este estudio demuestran la robustez de la biomezclas, en la cual solo se ve afectada levemente por la mezcla de plaguicidas con diferentes concentraciones de OxCu y una rápida recuperación de la actividad en el tiempo.

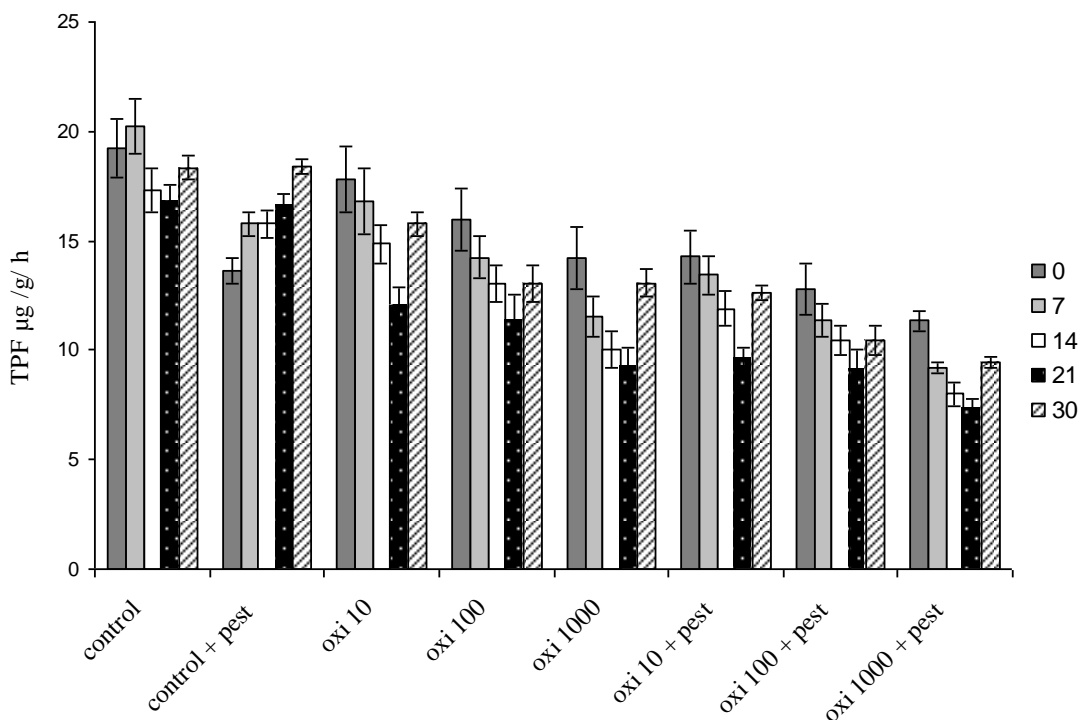


**Figura 8:** Efecto de las diferentes concentraciones de oxicloruro de cobre y mezcla de plaguicidas, sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa a través del tiempo.

**7.2.5 Actividad deshidrogenasa.** Los resultados encontrados para la actividad deshidrogenasa, los cuales se observan en la Figura 9, claramente muestran que esta actividad enzimática, tuvo un comportamiento similar a la FDA y la fosfatasa ácida, mostrando una clara inhibición en la

biomezcla contaminada solo con 1,000 mg/kg de OxCu y en todas las biomezclas con plaguicidas y las tres concentraciones de OxCu. Los resultados claramente demuestran que la actividad deshidrogenasa se ve afectada en la biomezcla con altas dosis de OxCu y que este efecto se ve incrementado cuando este compuesto es adicionado en conjunto con plaguicidas a la biomezcla. Además, al igual que las otras actividades enzimáticas evaluadas, la actividad deshidrogenasa se recuperó después de 30 días de incubación, retornando a valores similares a los del control.

Si bien, a la fecha escasa información es posible encontrar en relación a estudios con cobre en la biomezcla de lechos biológicos, se ha reportado que la actividad deshidrogenasa es bastante sensible a la presencia de plaguicidas en la biomezcla. En este contexto, Tortella et al. (2013a, b) reportaron que la aplicación de atrazina o carbendazima en 3 aplicaciones sucesivas durante 90 días, causaron un efecto negativo en la actividad deshidrogenasa durante los primeros 20 días después de la aplicación de los plaguicidas, para luego retomar valores similares al control. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la aplicación de la mezcla de plaguicidas no afectó a la actividad deshidrogenasa en la biomezcla, sin embargo en comparación a los resultados reportados por Tortella et al (2013a, b) ésta diferencia podría estar dada por las distintas concentraciones de plaguicida utilizado. Por otro lado el OxCu solo en una dosis de 1,000 mg/kg afecta la actividad de la deshidrogenasa, mientras que la combinación de los plaguicidas con OxCu en sus diferentes concentraciones, produce un efecto decreciente mayor. Sin embargo, los efectos negativos producidos en la actividad deshidrogenasa rápidamente comienzan a recuperarse a partir del día 14, mientras que en estudios realizados en suelo (Wyszkowska et al., 2006) no solo se observa una actividad deshidrogenasa alterada, sino que además no logra recuperarse después del tiempo como lo permite la biomezcla de los lechos biológicos.



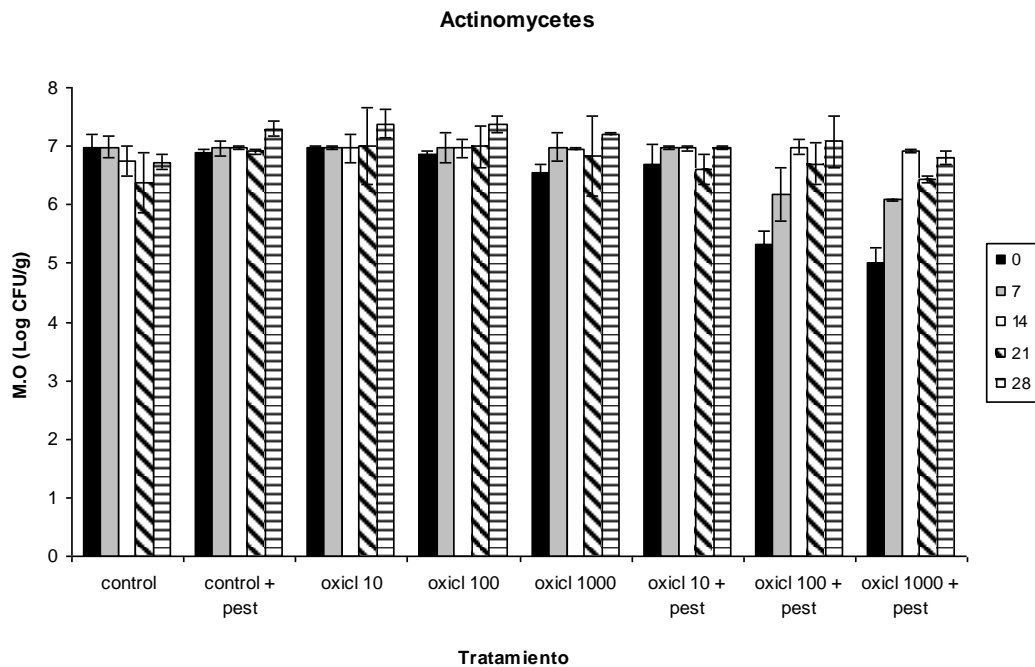
**Figura 9:** Efecto de las diferentes concentraciones de OxCu y mezcla de plaguicidas, sobre la actividad deshidrogenasa de la biomezcla durante 30 días de incubación.

## 7.2 Recuento de microorganismos cultivables

El recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) de actinobacterias, bacterias y hongos, se puede observar en las Figuras 10, 11 y 12. La UFC obtuvo valores similares durante los 30 días desde la aplicación de los plaguicidas respecto al control. En los tratamientos evaluados, solo a los cuales se aplicó una mezcla de plaguicidas (atrazina, carbendazima y diazinon) y oxiclóruo de cobre en una concentración de 100 y 1,000 mg/kg, se observó un efecto negativo en el crecimiento de bacterias, hongos, y actinobacterias. Sin embargo, una recuperación de todos los microorganismos evaluados fue observado después de 30 días de

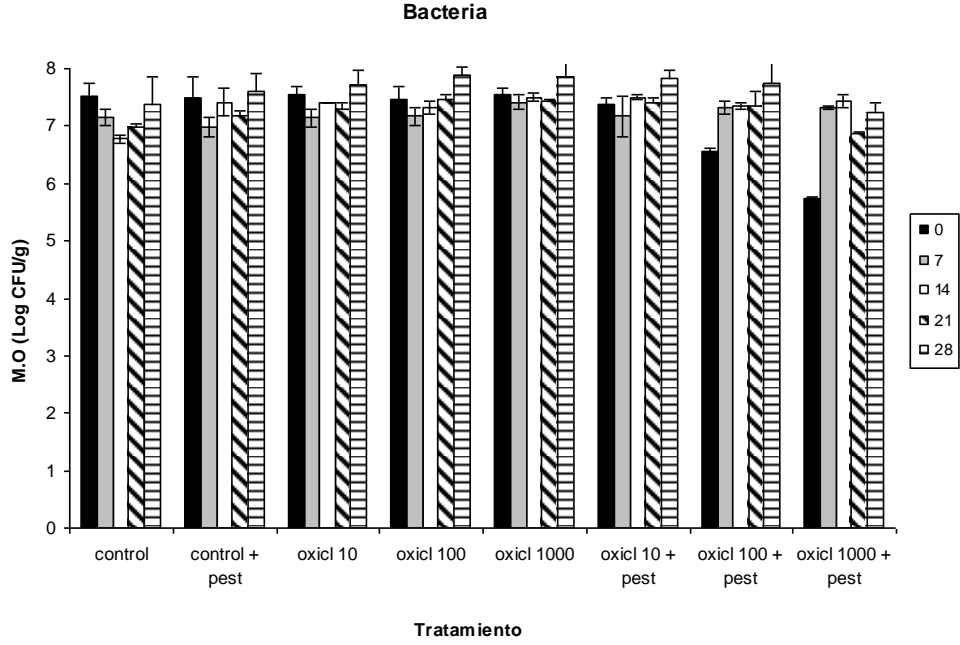
incubación de la biomezcla. En los tratamientos donde solo se aplicó oxiclورو de cobre o solo plaguicidas no mostraron diferencias respecto al control.

Resultados similares fueron reportados por Tortella et al. (2013a,b) donde aplicaciones sucesivas de carbendazima y atrazina causan efectos negativos transitorios sobre los hongos, actinobacterias y bacterias cultivables de la biomezcla. En otro estudio realizado por Coppola et al. (2011), los resultados mostraron que la aplicación sucesiva de una mezcla de fungicidas no causó un efecto sobre las UFC de bacteria en una biomezcla a base de compost. Sin embargo, una notoria alteración negativa del número de hongos cultivables fue observada.

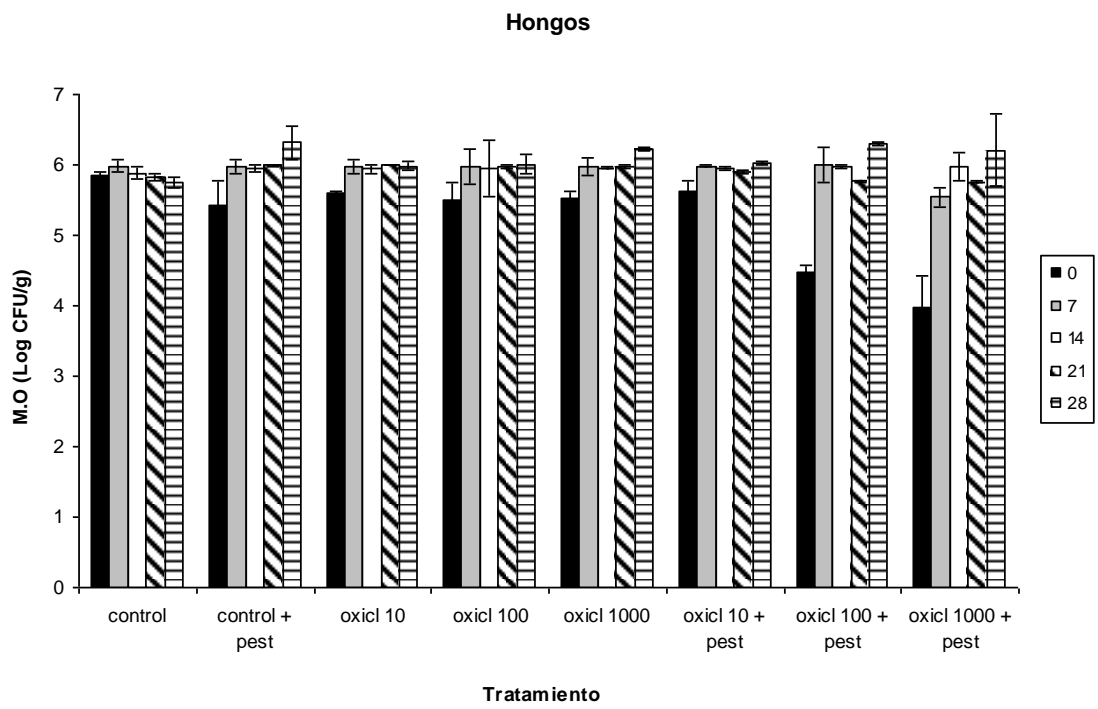


**Figura 10:** Efecto de la aplicación de OxCu y mezcla de plaguicidas en el tiempo, sobre el número de actinobacterias cultivables.





**Figura 11:** Efecto de la aplicación del OxCu y mezcla de plaguicidas en el tiempo, sobre el número de bacterias cultivables.



**Figura 12:** Efecto de la aplicación de OxCu y mezcla de plaguicidas en el tiempo, sobre el número de hongos cultivables.

### 7.3 Análisis de las comunidades microbianas mediante técnicas moleculares

**7.3.1 Análisis de la electroforesis de gel en gradiente denaturante (DGGE).** El análisis de dendograma y el nMDS describen el efecto de la aplicación de plaguicidas y OxCu a dosis de 10, 100, 1,000 mg/kg sobre la estructura de la diversidad microbiana (ribotipos 16S rDNA y ITS genes) presente en la biomezcla a los 0, 14, y 28 días desde su aplicación (Figura 15). Los resultados revelaron una intensa similitud entre las bandas de DGGE en todas las muestras analizadas, independiente del tratamiento, dosis y tiempo de aplicación, lo que indica la presencia de un gran número de ribotipos igualmente abundantes en los sistemas de la biomezcla. El nMDS análisis reveló una gran similitud entre las muestras de actinobacterias y solo pequeñas diferencias en las muestras Ct-0, TrB-0, TrC-0, Tr3-28, TrC-28, que agrupan aparte de todas las otras muestras (Figura 15a). La estructura de la comunidad de actinobacterias no fue afectada por la dosis de OxCu ni el tiempo transcurrido desde su aplicación, según lo observado en el dendrograma con una similitud mayor del un 95% entre las muestras tratadas y no tratadas. Resultados similares han sido reportados en el estudio de Tortella et al. (2013b) en comunidades de actinobacterias presentes en una biomezcla bajo aplicaciones consecutivas de atrazina, no observándose diferencias significativas entre el ensayo con atrazina y el control.

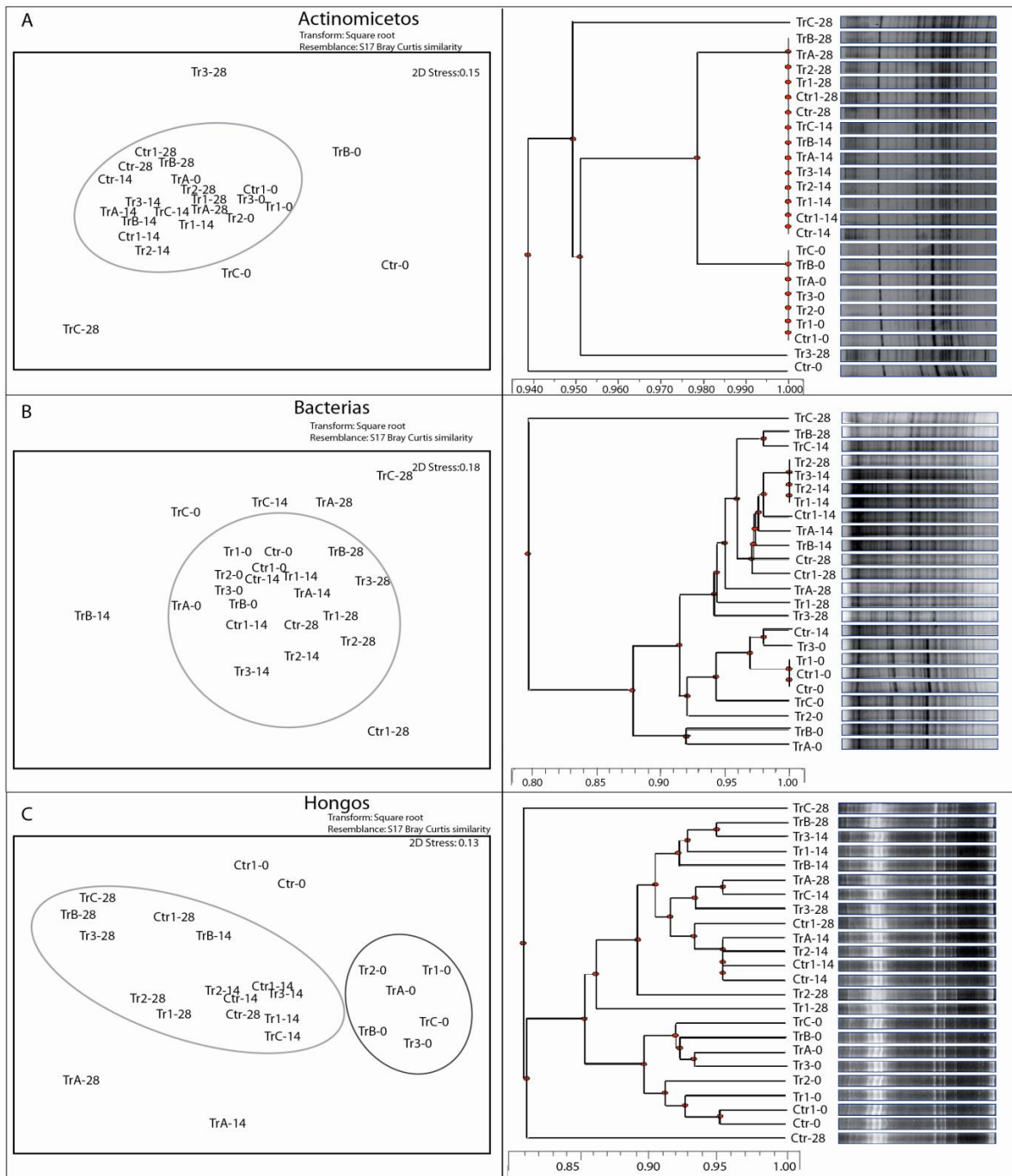
El análisis nMDS de las comunidades bacterianas reveló la existencia de un gran grupo. Sin embargo, el ensayo con mezcla de plaguicida y OxCu 1,000 mg/kg (TrC) a los 0, 14 y 28 días (TrC-0, TrC-14, TrC-28), mostraron diferencias con respecto al total de las muestras, describiendo que la aplicación de dosis altas de OxCu podrían afectar las comunidades microbiológicas, independiente el tiempo transcurrido desde su aplicación.

Este efecto podría ser explicado por el estudio de Dell'Amico et al. (2008) en el cual se evaluó el efecto del cobre sobre las poblaciones microbianas de un suelo. Se observó que a concentraciones más altas de cobre en el suelo (315 mg/kg), más modificaciones ocurren en la población bacteriana, donde solo las bacterias más resistentes a metales pesados son los que permanecen (*Pseudomonas* sp. y *Basillus* sp.). También se corrobora con el estudio de Wakelin

et al. (2010) el cual realizó un estudio del efecto de un gradiente de cobre sobre la comunidad bacteriana de un suelo, obteniendo resultados similares en el cambio de la comunidad bacteriana.

Dos grandes grupos fueron observados en la estructura de las comunidades bacterianas, según el análisis de dendograma (Figura 15b). Un grupo está formado por los controles, ensayos con oxiclورو de cobre y ensayos con mezcla de plaguicidas y oxiclورو de cobre (Ct, Ct1, Tr1, Tr2, Tr3, TrA, TrB y TrC) en el día 0 con una similitud de un 95% y el segundo a los controles y tratamientos antes mencionados a los 14 y 24 días desde su aplicación con una similitud de 85% (Figura 15b). Este resultado sugiere que hubo cambios en las comunidades bacterianas bajo los tratamientos en los días posteriores a la aplicación (14 y 28 días). Sin embargo, los cambios no se relacionaron con la aplicación de los tratamientos, observándose muestras tratadas y no tratadas agrupadas en función al tiempo de aplicación. Según los resultados reportados por Tortella et al. (2013a) en el cual se observó un cambio entre el control y el tratamiento con atrazina, en el cual la similitud bajó de un 90% a un 80% al día 40 del análisis. El cambio observado por las comunidades bacterianas a través del tiempo, no es producido por los diferentes tratamientos, sino por los cambios propios de la biomezcla.

Finalmente, los resultados observados indican que las comunidades de hongos presentes en la biomezcla son afectados tempranamente por la aplicación de la mezcla de plaguicida con las diferentes concentraciones de oxiclورو de cobre. La Figura 15c, muestra las diferencias en la estructura de la comunidad fúngica con una similitud de 85%. Así también el nMDS análisis muestra dos grupos asociados al tiempo de aplicación y no al tratamiento. Resultados similares fueron reportados por Tortella et al. (2013b) observaron el efecto de la constante aplicación de atrazina en las comunidades microbianas de una biomezcla. Los cambios producidos en la comunidad fúngica, fue debido a los tiempos de aplicación y no al tratamiento. Al igual que otro de sus trabajos Tortella et al. (2013a) en un estudio similar, cambiando la atrazina por carbendazima, en la que se produjo una variación en la población fúngica, pero posteriormente recuperó al final del ensayo.



**Figura 13:** Cluster y escalamiento multidimensional no paramétrico (nMDS) el análisis de los perfiles de DGGE (a) actinobacterias, (b) bacterias, (c) hongos. Los carriles de la biomezcla contraminada con oxícloruro de cobre, mezcla de plaguicidas con oxícloruro de cobre y el control, se denotan como Tr1 a Tr3, TrA a TrC y CTr respectivamente. La numeración 0, 14 y 28 indican los días de muestreo.

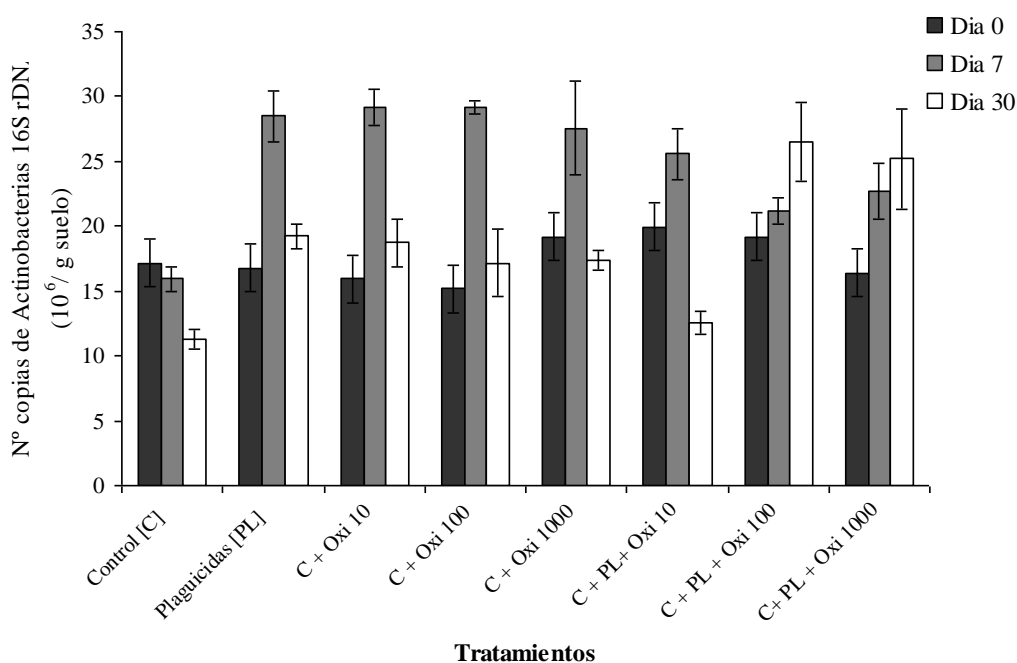
**7.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).** Las Figuras 14, 15 y 16, muestran la cantidad estimada del número de copias de la región 16S de los diferentes microorganismos analizados.

El grupo de actinobacterias (Figura 14) analizados mostraron un leve aumento en los tratamientos con OxCu a 1,000 mg/kg y la mezcla de plaguicidas con diferentes concentraciones de OxCu 10, 100 y 1,000 mg/kg en el inicio del tratamiento. Al día 7 de la evaluación, se observó un aumento del número de copias en todos los tratamientos, pero significativamente mayor en el tratamiento solo con la mezcla de plaguicidas y los tratamientos con las diferentes concentraciones con oxiclورو de cobre. Al final del ensayo, los tratamientos disminuyeron la cantidad de copias, con excepción de los tratamientos con la mezcla de plaguicidas y con oxiclورو de cobre 100 y 1,000 mg/kg.

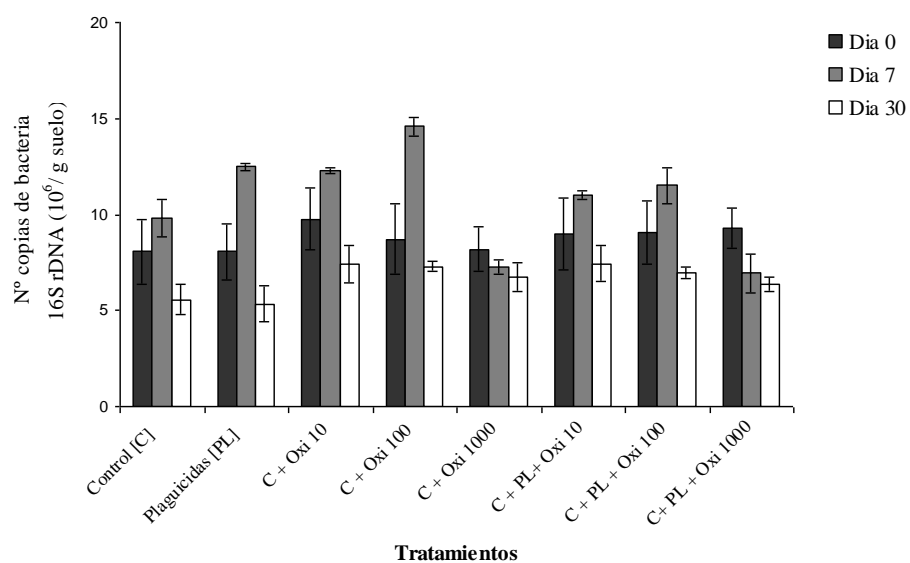
El grupo de bacterias (Figura 15) presentó un aumento en la cantidad de las copias con los tratamientos con mezcla de plaguicidas y con los tratamientos con oxiclورو de cobre 100 y 1,000 mg/kg, mientras que el tratamiento con oxiclورو de cobre de 1,000 mg/kg y el tratamiento con la misma concentración del fungicida pero con la mezcla de plaguicidas, obtuvieron valores inferiores al control durante el día 7 de evaluación. Al final de la evaluación se pudo observar un aumento en la cantidad de números de copias en todo los ensayos respecto al control, con excepción del ensayo con mezcla de plaguicidas que retomó valores similares al control.

El grupo de hongos (Figura 16) presentó un aumento en el número de copias en los ensayos con las diferentes concentraciones de oxiclورو de cobre 10, 100 y 1,000 mg/kg, mientras que los ensayos con las mismas concentraciones del fungicida y con mezcla de plaguicidas, disminuyeron de forma proporcional, en comparación con el control en el día 7. El día 30 se pudo observar valores similares al control en todo los ensayos, con excepción a los que se aplicó oxiclورو de cobre 10, 100 y 1,000 mg/kg y el ensayo con mezcla de plaguicida con 10 mg/kg de oxiclورو de cobre, los cuales mantenían un número de copias mayor en comparación al control.

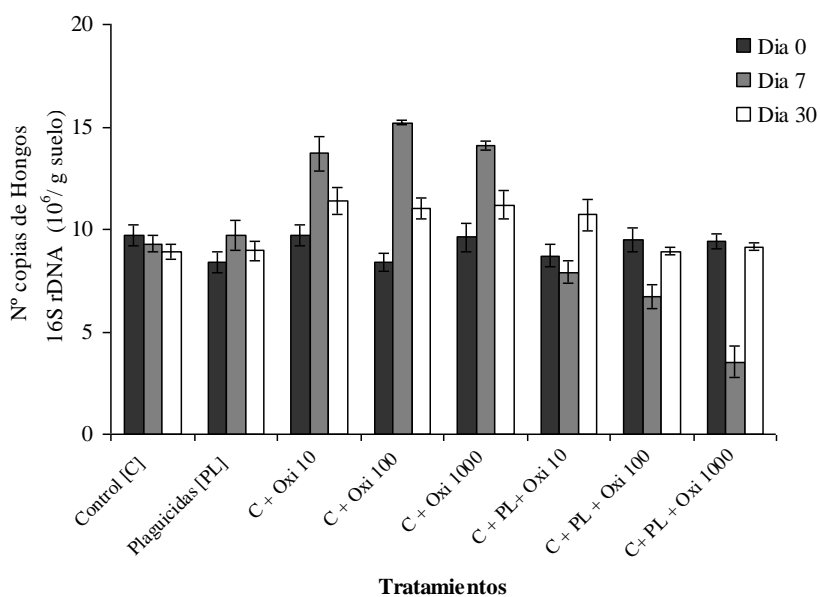
Resultados similares se han reportado en la evaluación del efecto de plaguicidas en los microorganismos. En este contexto, Laurent et al. (2003) evaluó el efecto de la atrazina sobre la expresión de las regiones ribosomales de bacterias (16S) y hongos (18S) de un suelo. Los autores reportaron un aumento temporal del grupo de bacterias, para luego retomar valores similares al control. En contraste con este resultado, los hongos tuvieron una disminución de su número en comparación al control. Quian et al. (2007) evaluó el efecto de validamicin en los microorganismos de un suelo. El análisis de las regiones ribosomales de bacterias (16S y hongos (18S), permitió observar un aumento en la cantidad del número de copias de las regiones ribosomales en los ensayos con altas concentraciones del plaguicida, tanto de bacterias como de hongos en el día 7. Finalmente, los ensayos retomaron valores similares al control, pero solamente en el grupo de bacterias, mientras que las concentraciones más altas de validamicin tuvieron un efecto positivo en el grupo de hongos.



**Figura 14:** Número de copias por gramos de suelo de la región ribosomal 16S rADN de actinobacterias de la biomezcla en presencia de OxCu y mezcla de plaguicidas durante 30 días mediante qPCR.



**Figura 15:** Número de copias por gramos de suelo de la región ribosomal 16S rADN de bacterias de la biomezcla en presencia de OxCu y mezcla de plaguicidas durante 30 días mediante qPCR.



**Figura 16:** Número de copias por gramos de suelo de la región ribosomal 16S rADN de actinobacterias de la biomezcla en presencia de OxCu y mezcla de plaguicidas durante 30 días mediante qPCR.

## 8. CONCLUSIONES

La disipación de los plaguicidas en la biomezcla del lecho biológico fue eficiente en presencia de oxiclورو de cobre. Sin embargo, un leve efecto de retardo en la disipación de estos se puede observar cuando se utilizan concentraciones altas de oxiclورو de cobre, lo que se ve reflejado en un aumento de la vida media de los plaguicidas evaluados. Por lo tanto es recomendable mantener concentraciones menores a 1000 mg/kg en la biomezcla cuando se desee lograr una rápida disipación de los plaguicidas en el lecho.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que después de la aplicación de oxiclورو de cobre a la biomezcla, las actividades biológicas en general se ven afectadas negativamente pero solo por periodos cortos de tiempo y en presencia de altas concentraciones del compuesto.

El número de organismos cultivables en la biomezcla no mostró ser afectado significativamente después de la aplicación de oxiclورو de cobre en ninguna de las concentraciones evaluadas, situación que fue confirmada por estudios de DGGE que mostraron que solo pequeños cambios ocurrieron en las comunidades microbianas, pero no atribuibles a la presencia de oxiclورو de cobre.

La utilización de la técnica de la PCR en tiempo real (qPCR) permitió observar detalladamente un efecto positivo del oxiclورو de cobre sobre la población de actinobacterias y de bacterias, mientras que la población de hongos disminuyó proporcionalmente en presencia de oxiclورو de cobre con la mezcla de plaguicidas.

Si bien las actividades biológicas microbianas, diversidad microbiana y degradación de los plaguicidas fueron afectadas durante los primeros días, tanto positiva como negativamente, los efectos fueron temporales y al final del estudio se observó una recuperación de los valores en cada tratamiento. Por lo tanto, este estudio permitió demostrar la capacidad de la biomezcla para disipar rápidamente una mezcla de plaguicidas y mantener o recuperar las actividades biológicas de los microorganismos en presencia de los plaguicidas y oxiclورو de cobre en altas dosis.



## 9. REFERENCIAS

- Aktar, W., Sengupta, D., y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.
- Alexander, M. (1977). *Introduction to soil microbiology*: John Wiley & Sons
- Allievi, L., Gigliotti, C., Salardi, C., Valsecchi, G., Brusa, T., y Ferrari, A. (1996). Influence of the herbicide bentazon on soil microbial community. *Microbiological research*, 151(1), 105-111.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R. y Abarkeli, R.B. (2003) Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazillian soils. *Chemosphere*. 52:799-804.
- Bavcon, M., Trebše, P., y Zupančič-Kralj, L. (2003). Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector. *Chemosphere*, 50(5), 595-601.
- Bhutani, V., Bhan, S., y Chopra, S. (1984). The influence of herbicides on the soil microflora in a plum orchard. *Scientia horticultrae*, 23(2), 191-194.
- Bishnu, A., Saha, T., Mazumdar, D., Chakrabarti, K., y Chakraborty, A. (2008). Assessment of the impact of pesticide residues on microbiological and biochemical parameters of tea garden soils in India. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43(8), 723-731.
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Triplett, E. W. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1935-1943.
- Burrows, L. y Edwards, C. (2004). The use of integrated soil microcosms to assess the Impact of carbendazim on soil ecosystems. *Ecotoxicology*. 13 (1-2), 142-161.
- Bååth, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(3-4), 335-379.
- Bünemann, E., Schwenke, G., y Van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Soil Research*, 44(4), 379-406.

- Cai, Q., Mo, C., Wu, Q., Katsoyiannis, A. y Zeng, Q. (2008). The status of soil contamination By semivolatile organic chemicals (SVOCs) in China: a review. *Science of the Environment*. 389 (2), 209-224.
- Casida, L. (1977). Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 630-636.
- Castillo, M. P., Stenstrom, J. y Ander, P. (1994). Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolimine hydrazone and 3-(dimethylamino)benzoic acid. *Anal Biochem*. 218: 399-404.
- Castillo, M.d.P. (1997a). Degradation of pesticides by *Phanerochaete chrysosporium* in Solid Substrate Fermentation. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.
- Castillo, M. d. P., Ander, P., y Stenström, J. (1997b). Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnology Techniques*, 11(9), 701-706.
- Castillo, M., Andersson, A., Ander, P., Stenström, 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 and Biotechnology*, 17(6), 627-633.
- Castillo, M. d. P., y Torstensson, L. (2007). Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5725-5733.
- Castillo, M. Del Pilar, Torstensson L. & Stenström J.(2008): Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Uses-A Review. Published in *J. Agric. Food Chem*, 56, 6206-6219.
- Carter, A. (2002). How pesticides get into water-and proposed reduction measures. *Pesticide outlook*. 11(4), 149-156.
- Cerejeira, M., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M., Silva-Fernandes, A. (2003). Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37(5), 1055-1063.
- Chu, X., Fang, H., Fan, X., Wang, X., Shan, M., Feng, B. and 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.

- Cooper, J., & Warman, P. R. (1997). Effects of three fertility amendments on soil dehydrogenase activity, organic C and pH. *Canadian journal of soil science*, 77(2), 281-283.
- Coppola, L., Castillo, M. d. P., Monaci, E., y Vischetti, C. (2007). Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to southern Europe conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(2), 396-401.
- Coppola, L., Comitini, F., Casucci, C., Milanovic, V., Monaci, E., Marinozzi, M., Vischetti, C. (2011). Fungicides degradation in an organic biomixture: impact on microbial diversity. *New Biotechnology*, 29(1), 99-106.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., y Kozdrój, J. (2010). Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to Sandy soils. *International biodeterioration and biodegradation*, 64:316-323.
- Cycoń, M., Wójcik, M., y Piotrowska-Seget, Z. (2009). Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76(4), 494-501.
- Cycoń, M., Żmijowska, A., Wójcik, M., y Piotrowska-Seget, Z. (2013). Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *Journal of environmental management*, 117, 7-16.
- Diez, C. M., Tortella, G.R., Briceño, G., Castillo, M.P., Díaz, J., Palma, G., Altamirano, C., Calderón, C. y Rubilar, O. (2013). Influence of novel lignocellulosic residues in a biobed biopurification system on the degradation of pesticides applied in repeatedly high doses. *Journal of Biotechnology*, 16: 6-17.
- Dewey, K.A., Gaw, K.S., Northcott, G.L., Lauren, D.R. y Hackenburg, S. (2012) The effects of copper on microbial activity and the degradation of atrazine and indoxacarb in a New Zealand soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 52:64-74.
- Digrak, M. y Özçelik S. 1998. Effect of some pesticides on soil microorganism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (6):916-922
- Digrak, M. and Kazanici, F. 2001. Effect of some organophosphorous insecticide on soil microorganisms. *Turkey Journal Biology* 25:51-1
- Dell'Amico, E., Mazzocchi, M., Cavalca, L., Allievi, L., y Andreoni, V. (2008). Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiological research*, 163(6), 671-683.

- Devare, M., Londoño-R, L., y Thies, J. (2007). Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: a 3-year field analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 2038-2047.
- Drufovka, K., Danevčič, T. a., Trebše, P., y Stopar, D. (2008). Microorganisms trigger chemical degradation of diazinon. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(3), 293-296.
- Du Plessis, K., Botha, A., Joubert, L., Bester, R., Conradie, W., y Wolfaardt, G. (2005). Response of the microbial community to copper oxychloride in acidic sandy loam soil. *Journal of applied microbiology*, 98(4), 901-909.
- EFSA- European Food Safety Authority. (2010). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. EFSA J. 8 (5), 1508. [Http//dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1508](http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1508).
- Eisenhauer, N., Klier, M., Partsch, S., Sabais, A. C., Scherber, C., Weisser, W. W., y Scheu, S. (2009). No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 31-36.
- Eivaizi, F. & Tabatabai, M.A.(1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 20(5), 601-606.
- El-Bestawy, E., Sabir, J., Mansy, A., & Zabermawi, N. (2013). Isolation, identification and acclimatization of Atrazine-resistant soil bacteria. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 119-130.
- Ellis, S. R., Hodson, M. E., y Wege, P. (2010). The soil-dwelling earthworm *Allolobophora chlorotica* modifies its burrowing behaviour in response to carbendazim applications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(6), 1424-1428.
- EPA. Pesticides Industry Sales and Usage 2006-2007 Market Estimates. (2007). Eivazi, F. Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and agalactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20,601–606.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., Durand, G., Quiniou, L., y Laroche, J. (2010). Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 321-331.
- Ferreira, E. P. d. B., Dusi, A. N., Costa, J. R., Xavier, G. R., y Rumjanek, N. G. (2009). Assessing insecticide and fungicide effects on the culturable soil bacterial community by analyses of variance of their DGGE fingerprinting data. *European Journal of Soil Biology*, 45(5), 466-472.

- FAO. 1990. *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*. (Versión enmendada). Roma.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R. y Jackson, R.B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *American Society for Microbiology*. 71(7), 4117-4120.
- Flores, C., Morgante, V., González, M., Navia, R., y Seeger, M. (2009). Adsorption studies of the herbicide simazine in agricultural soils of the Aconcagua valley, central Chile. *Chemosphere*, 74(11), 1544-1549.
- Fogg, P., Boxall, A. B., y Walker, A. (2003). Degradation of pesticides in biobeds: The Effect of concentration and pesticide mixtures. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51(18), 5344-5349.
- Förster, B., Garcia, M., Francimari, O., y Römbke, J. (2006). Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazonia, Brazil). *European Journal of Soil Biology*, 42, S171-S179.
- Gadd, G. M., Ramsay, L., Crawford, J. W., y Ritz, K. (2001). Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2), 311-316.
- Gaw, S., Wilkins, A., Kim, N., Palmer, G., y Robinson, P. (2006). Trace element and DDT concentrations in horticultural soils from the Tasman, Waikato and Auckland regions of New Zealand. *Science of the Total Environment*, 355(1), 31-47.
- Gigliotti, C., Allievi, L., Salardi, C., Ferrari, F. and Farini, A. 1998. Microbial exotoxicity and persistence in soil of the herbicide bensulfuran methyl. *Journal environmental of Science and Health*, 33:399-409.
- Gómez, E., Ferreras, L. y Toresani, S. (2006). Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology*. 97, 1484-1489.
- Giller, K., Beare, M., Lavelle, P., Izac, A., y Swift, M. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied soil ecology*, 6(1), 3-16.
- Gunasekara, A. S., TenBrook, P. L., Palumbo, A. J., Johnson, C. S., y Tjeerdema, R. S. (2005). Influence of phosphate and copper on reductive dechlorination of thiobencarb in California rice field soils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 10113-10119.

- Guyot, C. (1994). Strategies to minimize the pollution of water by pesticides *Pesticides in Ground and Surface Water*. 87-152
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L., y Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil*, 245(1), 83-93.
- 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*. 387:1459-1469.
- Heuer, H., Kressek, M., Baker, P., Smalla, K., Wllington, E.M.H. (1997). Analysis of actinomycete communities by especific amplification opf genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoreic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241.
- Hlasko, A., J. Kucharski y J. Wyszowska (2001). "The effect of contamination with copper on soil physicochemical properties and activity of soil enzymes." *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*(476): 173-180.
- Jaeken, P. y DEbaer C. (2005). Risk of water contamination by plant protection products (PPP) during pre- and post treatment operations. *Annu Rev Agric Enga.* 4:93-114.
- Jablonowski, N. D., Köppchen, S., Hofmann, D., Schäffer, A., y Burauel, P. (2009).Persistence of <sup>14</sup>C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22years. *Environmental Pollution*, 157(7), 2126-2131.
- Jindal, T., Singh, D. K., y Agarwal, H. (2000). Persistence, degradation and leaching of coumaphos in soil. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 35(3), 309-320.
- Jones, S. E., Williams, D. J., Holliman, P. J., Taylor, N., Baumann, J., Förster, B., Rodrigues, J. M. (2004). Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME)—an instrument for testing potentially harmful substances: fate of the model chemical carbendazim. *Ecotoxicology*, 13(1-2), 29-42.
- Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T., y Itoh, K. (2003). Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96(4), 337-343.
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., Karpouzas, D. G., y Ehaliotis, C. (2010a). Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in Southern Europe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 9147-9156.

- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., Karpouzas, D. G., y Menkissoglu-Spirodi, U. (2010b). Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere*, 80(8), 914-921.
- Katagi, T. (2006). Behavior of pesticides in water-sediment systems *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 133-251.
- Kim, B., Kim, Y. S., Kim, B. M., Hay, A. G., y McBride, M. B. (2011). Effect of soil metal contamination on glyphosate mineralization: Role of zinc in the mineralization rates of two copper-spiked mineral soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 596-601.
- Klose, S., y Ajwa, H. A. (2004). Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(10), 1625-1635.
- Knudsen, B. E., Ellegaard-Jensen, L., Albers, C. N., Rosendahl, S., y Aamand, J. (2013). Fungal hyphae stimulate bacterial degradation of 2, 6-dichlorobenzamide (BAM). *Environmental Pollution*, 181, 122-127.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., y Conrad, R. (2003). Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2423-2429.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., y Albanis, T. A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 141(3), 555-570.
- Kouloumbos, V. N., Tsiipi, D. F., Hiskia, A. E., Nikolic, D., y van Breemen, R. B. (2003). Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO<sub>2</sub> aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(8), 803-817.
- Kunito, T., Saeki, K., Oyaizu, H., y Matsumoto, S. (1999). Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(2), 174-181.
- Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K., & Jackson, P. J. (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2463-2472.
- Laird, D. A., Yen, P. Y., Koskinen, W. C., Steinheimer, T. R., y Dowdy, R. H. (1994). Sorption of atrazine on soil clay components. *Environmental science & technology*, 28(6), 1054-1061.

- Liu, T.F., Sun, C., Ta, N., Hong, J., Yang S.G. and Chen, C.F (2007). "Effect of copper on the degradation of pesticides cypermethrin and cyhalothrin." *Journal of Environmental Sciences* **19**(10): 1235-1238.
- Ma Y X, Carola H, Jeremy W. (2003). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 23: 1561-1569.
- Martens, D., Johanson, J., y Frankenberger Jr, W. (1992). Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. *Soil Science*, 153(1), 53-61.
- Marinozzi, M., Coppola, L., Monaci, E., Karpouzas, D.G., Papadopoulou, E., Menkissoglouspiroudi, U. y Cischetti, C. (2012). The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (4), 2456-2555.
- Laurent, M.F., Piutti, S., Hallet, S., Wagschal, I., Philippot, L., Catroux, G., y Soulas, G. (2003). Monitoring of atrazine treatment on soil bacterial, fungal and atrazine-degrading communities by quantitative competitive PCR. *Pest management science*, 59(3), 259-268.
- McCaig, A. E., Glover, L. A., y Prosser, J. I. (1999). Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1721-1730.
- Moreno, J. L., Aliaga, A., Navarro, S., Hernández, T., y García, C. (2007). Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. *Applied Soil Ecology*, 35(1), 120-127.
- Müller, K., Bach, M., Hartmann, H., Spiteller, M. y Frede, H.G. (2002). Point- and nonpoint-source pesticide contamination in the Zwerster Ohm Catchment, Germany. *Journal of Environmental Pollution*, 3 (1), 309-318.
- Mullis, K. B., y Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 317-322.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., y Uitterlinden, A. G. (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(3), 695-700.
- Nel, A., Krause, M., Neervana, R. y Van Zyl, K. (1999). A guide for the Control of Plant Diseases. Pretoria, South Africa: National Department of Agriculture.



- Neumann, 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.
- Nielsen, M. S., Bælum, J., Jensen, M. B., y Jacobsen, C. S. (2011). Mineralization of the herbicide MCPA in urban soils is linked to presence and growth of class III *tfd* A genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(5), 984-990.
- Niemi, R. M., Heiskanen, I., Ahtiainen, J. H., Rahkonen, A., Mäntykoski, K., Welling, L., Ruuttunen, P. (2009). Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Applied Soil Ecology*, 41(3), 293-304.
- Oberson, A., Besson, J., Maire, N., y Sticher, H. (1996). Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 21(3), 138-148.
- Omirou, M., Dalias, P., Costa, C., Papastefanou, C., Dados, A., Ehaliotis, C. y Karpouzias, D.G. (2012). Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide- contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and fields studies. *Environmental Pollution*, 166, 31-39.
- Pandey, S., y Singh, D. K. (2006). Soil dehydrogenase, phosphomonoesterase and arginine deaminase activities in an insecticide treated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) field. *Chemosphere*, 63(5), 869-880.
- Persicani, D. (1993). Atrazine leaching into groundwater: comparison of five simulation models. *Ecological modelling*, 70(3), 239-261.
- Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S., Mazzatura, A., y Casucci, C. (2000). Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 32(1), 17-23.
- Pigeon, O., De Vleeschouwer, C., Cors, F., Weickmans, B., De Ryckel, B., Pussemier, L., Culot, M. (2005). Development of biofilters to treat the pesticides wastes from spraying applications. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(4), 1003.
- Qian, H., Hu, B., Cao, D., Chen, W., Xu, X., y Lu, Y. (2007). Bio-safety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 78(3), 239-244.
- Raeymaekers, L. (2000). Basic principles of quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, 15(2), 115-122.

- Ratcliff, A. W., Busse, M. D., y Shestak, C. J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 34(2), 114-124.
- Richardson, A. E., Hadobas, P. A., y Hayes, J. E. (2001). Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal*, 25(6), 641-649.
- Rossel, D., Tarradellas, J., Bitton, G., y Morel, J.-L. (1997). Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. *Soil ecotoxicology*, 179-206.
- Sagarkar, S., Mukherjee, S., Nousiainen, A., Björklöf, K., Purohit, H. J., Jørgensen, K. S., y Kapley, A. (2013). Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. *Environmental Pollution*, 172, 108-115.
- Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M. d. J., Rojas-García, E., Hernández-Ochoa, I., y Quintanilla-Vega, B. (2008). Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology*, 25(4), 455-460.
- Sanchez, M., Estrada, I., Martinez, O., Martin-Villacorta, J., Aller, A., y Moran, A. (2004). Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. *Chemosphere*, 57(7), 673-679.
- SAG. 2011. Atrazina 50 SC HERBICIDA SISTEMICO SUSPENSION CONCENTRADA. <http://www.sag.cl/sites/default/files/ATRAZINA%2050%20SC%2009-12-2011.pdf>
- SAG. 2011. Diazinon 60 EC CONCENTRADO EMULSIONANTE. <http://www.sag.cl/sites/default/files/Diazinon%20600%20EC%2025-032011%2002.pdf>
- Sauvé, S., Dumestre, A., McBride, M., y Hendershot, W. (1998). Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(8), 1481-1489.
- Schnürer, J., y Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and environmental microbiology*, 43(6), 1256-1261.
- Seghers, D., Wittebolle, L., Top, E. M., Verstraete, W., y Siciliano, S. D. (2004). Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1475-1482.

- Singh, J., y Singh, D. K. (2005a). Bacterial, azotobacter, actinomycetes, and fungal population in soil after diazinon, imidacloprid, and lindane treatments in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) fields. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 40(5), 785-800.
- Singh, J., y Singh, D. K. (2005b). Dehydrogenase and phosphomonoesterase activities in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) field after diazinon, imidacloprid and lindane treatments. *Chemosphere*, 60(1), 32-42.
- Slotkin, T. A., y Seidler, F. J. (2008). Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicology and applied pharmacology*, 233(2), 211-219.
- Smit, E., Leeftang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., y Wernars, K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2284-2291.
- Sniegowski, K., Bers, K., Ryckeboer, J., Jaeken, P., Spanoghe, P. y Springael, D. (2011). Robust linuron degradation in on-farm biopurification systems exposed to sequential environmental changes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6614-6621.
- Soleil, Z., Sandler, D., y Dinooor, A. (1979). Mobility and persistence of carbendazim and thiabendazole applied to soil via drip irrigation. *Phytopathology*, 69, 1273-1277.
- Spanoghe, P., Maes, A., & Steurbaut, W. (2004). Limitation of point source pesticide pollution: results of bioremediation system. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(4), 719-732.
- Tabatabai, M. (1982). Soil enzymes. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*(methods of soil an 2), 903-947.
- Tabatabai, M. (1994). Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties* (methods of soil an 2), 775-833.
- Tang, X., Zhu, B., y Katou, H. (2012). A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. *Journal of Environmental Sciences*, 24(3), 351-361.
- Taylor, A. (1995). The Volatization of pesticide residues. *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, 9, 257-257.

- Petersen, T.A., Leser, T. D., Marsh, T. L., y Nybroe, O. (2003). Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(1), 53-62.
- Torstensson, L. (1996). *Herbicides in the environment*. Paper presented at the 2. International Weed Control Congress, Copenhagen (Denmark), 25-28 Jun 1996.
- Torstensson, L., y Castillo, M. (1997). Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pesticide Outlook*, 8.
- Tortella, G., Mella-Herrera, R., Sousa, D., Rubilar, O., Acuña, J., Briceño, G., y Diez, M. (2013b). Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. *Journal of Hazardous Materials*.
- Tortella, G., Mella-Herrera, R., Sousa, D., Rubilar, O., Briceño, G., Parra, L., y Diez, M. (2013a). Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities. *Chemosphere*, 93(6), 1084-1093.
- Tortella, G., Rubilar, O., Castillo, M., Cea, M., Mella-Herrera, R., y Diez, M. (2012). Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages. *Chemosphere*, 88(2), 224-228.
- Trevors, J. (1984). Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TT assay. *Soil biology and Biochemistry*, 16(6), 673-674.
- Urrutia, C., Rubilar, O., Tortella, G., y Diez, M. (2013). Degradation of pesticide mixture on modified matrix of a biopurification system with alternatives lignocellulosic wastes. *Chemosphere*.
- Vainio, E.J. y Hantula, J. (1999). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104 (8):927-936
- Van den Brink, P. J., Hattink, J., Bransen, F., Van Donk, E., y Brock, T. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. *Aquatic toxicology*, 48(2), 251-264.
- Van Dyk, J. S., y Pletschke, B. (2011). Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 82(3), 291-307.

- Vanderheyden, V., Debongnie, P., y Pussemier, L. (1997). Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. *Pesticide Science*, 49(3), 237-242.
- Vig, K., Singh, D., Agarwal, H., Dhawan, A., y Dureja, P. (2008). Soil microorganisms in cotton fields sequentially treated with insecticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 69(2), 263-276.
- 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(11), 1739-1743.
- Viti, C., Quaranta, D., De Philippis, R., Corti, G., Agnelli, A., Cuniglio, R., y Giovannetti, L. (2008). Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide amended olive orchard and vineyard soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 309-318.
- Vivekanandhan, N., y Duraisamy, A. 2012. Ecological Impact of Pesticides Principally Organochlorine Insecticide Endosulfan: A Review.
- Von Wirén-Lehr, S., del Pilar Castillo, M., Torstensson, L., y Scheunert, I. (2001). Degradation of isoproturon in biobeds. *Biology and Fertility of soils*, 33(6), 535-540.
- Waldrop, M. P., y Zak, D. R. (2006). Response of oxidative enzyme activities to nitrogen deposition affects soil concentrations of dissolved organic carbon. *Ecosystems*, 9(6), 921-933.
- Wakelin, S., Chu, G., Lardner, R., Liang, Y. McLaughlin, M. (2010). A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil Processes. *Pedobiologia*, 53(2) 149-158.
- Wang, Q.Y., Zhou, D.-M., y Cang, L. (2009). Microbial and enzyme properties of Apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1504-1509.
- Wang, X., Song, M., Gao, C., Dong, B., Zhang, Q., Fang, H., y Yu, Y. (2009). Carbendazim induces a temporary change in soil bacterial community structure. *Journal of Environmental Sciences*, 21(12), 1679-1683.
- Wang, X., Song, M., Wang, Y., Gao, C., Zhang, Q., Chu, X., Yu, Y. (2012). Response of soil bacterial community to repeated applications of carbendazim. *Ecotoxicology and environmental safety*, 75, 33-39.

- Wang, Y.-S., Huang, Y.-J., Chen, W.-C., y Yen, J.-H. (2009). Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community. *Journal of hazardous materials*, 172(1), 84-91.
- Wightwick, A. M., Salzman, S. A., Reichman, S. M., Allinson, G., y Menzies, N. W. (2012). Effects of copper fungicide residues on the microbial function of vineyard soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Wyszkowska, J., Kucharski, J. y Lajszner, W. (2005). " Enzymatic Activities in Different Soil Contaminated with Copper." *Polish Journal of Environmental Studies* 14(5) 1230-1485.
- Wyszkowska, J., Kucharski, J. y Lajszner, W. (2006). "The effects of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals." *Polish Journal of Environmental Studies* 15(6): 927.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfad, D., Shinsky, J., White, T. (Eds.), PCR Protocols: A guide to Methods and Applications Academic Press, 315-322.
- White, P. M., Potter, T. L. y Culbreath, A.K. 2010. Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Science of The Total Environment*, 408 (6):1393-1402.
- Yan, P., Lu, M., Guan, Y.M., Zhang, W.M., Zhang, Z.Z. (2011). Remediation of oil-based drill cutting through a biosurfactant-based washing followed by a biodegradation treatment. *Bioresource Technol.* 102:10252-10259.
- Yu, G., Liu, Y., Xie, L., y Wang, X. (2009). Involvement of Sertoli cells in spermatogenic failure induced by carbendazim. *Environmental toxicology and pharmacology*, 27(2), 287-292.
- Yu, Y. L., Shan, M., Fang, H., Wang, X., y Chu, X. Q. (2006). Responses of soil microorganisms and enzymes to repeated applications of chlorothalonil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10070-10075.
- Zhang, B., Zhang, H., Jin, B., Tang, L., Yang, J., Li, B., Bai, Z. (2008). Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 20(11), 1356-1362.
- Zhang, W., Jiang, F., y Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2), 125-144.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo 1.

Reactivos	Cantidad
Tris	3,025 g
Ácido Málico	2,9 g
Ácido Cítrico	3,5 g
Ácido Bórico	1,57 g
NaOH (1N)	122 mL

Llevar todos los reactivos a un matraz de aforo de 250 mL y aforar con H<sub>2</sub>O destilada.

### 10.2 Anexo 2.

Reactivos	Cantidad
Ácido Succinato (118,09 MW)	5,92 g
Ácido Láctico (90,08 MW)	4 mL

Llevar todos los reactivos a un matraz de aforo de 1 L y aforar con agua destilada. Se debe ajustar a un pH 4,5 con NaOH

### 10.3 Anexo 3.

Reactivos	0%	100%
40%acry/bisacrilamida 37.5:1	200 mL	200 mL
Buffer TAE 50X	10 mL	10 mL
Glicerol	20 mL	20 mL
Urea	-	421.6 g
Formamida desionizada	-	400 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	a 1,000 mL	a 1,000 mL