

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Efectos de la utilización de productos fitosanitarios sobre el suelo de los sistemas productivos hortícolas

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de General Sarmiento

Autor: **Lic. Giselle A. Querejeta**

Director: Dr. Javier M. Montserrat
Co-Director: Dra. Anita Zalts

Fecha: (Febrero de 2015)

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

FORMULARIO "E" TESIS DE POSGRADO

Niveles de acceso al documento autorizados por el autor

El autor de la tesis puede elegir entre las siguientes posibilidades para autorizar a la UNGS a difundir el contenido de la tesis: a

- a) **Liberar el contenido de la tesis para acceso público.**
- b) *Liberar el contenido de la tesis solamente a la comunidad universitaria de la UNGS:*
- c) *Retener el contenido de la tesis por motivos de patentes, publicación y/o derechos de autor por un lapso de cinco años.*

a. Título completo del trabajo de Tesis: Efectos de la utilización de productos fitosanitarios sobre el suelo de los sistemas productivos hortícolas

b. Presentado por (Apellido/s y Nombres completos del autor): Giselle A. Querejeta

c. E-mail del autor: gisellequerejeta@gmail.com

d. Estudiante del Posgrado (consignar el nombre completo del Posgrado):
Doctorado en Ciencia y Tecnología

e. Institución o Instituciones que dictaron el Posgrado (consignar los nombres desarrollados y completos): Universidad Nacional de General Sarmiento

f. Para recibir el título de (consignar completo):
a) Grado académico que se obtiene: Doctorado
b) Nombre del grado académico: Doctora en Ciencia y Tecnología

g. Fecha de la defensa: / /
 día mes año

h. Director de la Tesis (Apellidos y Nombres): Javier Marcelo Montserrat

i. Tutor de la Tesis (Apellidos y Nombres): Anita Zalts

j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: Enrique Hughes

k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes, planos, videos, archivos digitales, etc.): 135 páginas

l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis: Partido de Moreno, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. Trabajo de investigación realizado entre abril de 2010 y febrero de 2014

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): *Propiedades biológicas, físicas y químicas de suelos de sistemas hortícolas y sistemas no productivos. Disipación de plaguicidas (procimidone, trifluralina y clorpirifós). Análisis cromatográfico. Biodegradación: enriquecimiento, aislamiento y purificación de bacterias resistentes a ciertos plaguicidas (endosulfán). Movilidad vertical de plaguicidas (clorpirifós, trifluralina, atrazina).*

n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres):

La actividad hortícola tradicional tiene asociado un uso intensivo de plaguicidas. Para determinar el impacto de estos productos sobre el suelo productivo se llevaron adelante una serie de ensayos de caracterización biológica, química y física de esta matriz en comparación con suelos del mismo tipo pero no perturbados por la actividad productiva.

Con este propósito, se muestrearon suelos de una huerta del Partido de Moreno (Bs. As.) y se midieron las variables biológicas y físicoquímicas según parámetros espaciales y estacionales. Se determinó la cinética de degradación para trifluralina, procimidone y clorpirifós, y como la actividad degradativa de estos suelos resultó superior a la de los sistemas de referencia se realizó un enriquecimiento, aislamiento y caracterización de los microorganismos de los mismos. Adicionalmente se ensayó su movilidad de clorpirifós, trifluralina y atrazina en columnas de suelo hortícola y de referencia.

Como conclusiones principales de este estudio se puede afirmar que:

-Entre los suelos productivo y controles las propiedades físicoquímicas varían de forma significativa, pero no entre sitios de la misma huerta,

-se observó mayor movilidad de los plaguicidas en los suelos controles que en los hortícolas,

-se lograron aislar siete cepas bacterianas del suelo de la huerta y dos de los suelos controles

-la cinética de degradación de los plaguicidas en los suelos de huerta fue mayor que en las referencias.

o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres):

A horticultura envolve o uso intensivo de agrotóxicos. Para saber se afeta os solos locais, se caracterizaram os solos agrícolas de maneira biológica, química física; e se estudaram cinéticas de degradação e movimento de certos agrotóxicos.

As amostras eram terras de uma horta do Partido Moreno (Bs.As.). Mediu-se variáveis biológicas e físico-químicas segundo parâmetros especiais e da estação.

Determinou-se a cinética de degradação para trifluralina, procimidone e clorpirifos; realizou-se o enriquecimento desses três produtos, isolou-se e caracterizou-se as bactérias resistentes. Finalmente, fez-se um experimento de seus movimentos em colunas; os agrotóxicos foram extraídos do solo com solvente e a contagem foi feita por cromatografia gasosa. Comparou-se as amostras da horta com solos não produtivos dentro da área.

Entre controle e solos produtivos as propriedade físico-químicas variam, porem, não entre os locais da mesma horta observou-se maior movimento nos solos controlados.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

*Isolou-se sete cepas bacterianas da horta e dos controles.
A cinética de degradação na horta foi maior que nas referências.*

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres):

Traditional horticulture involves the intensive use of pesticides. To study how it affects local soils, these were characterized biologically, chemically and physically and compared with non- perturbed soil. On the other hand, degradation kinetics and mobility of some pesticides were studied.

Soils from Moreno district (Bs. As.) were sampled. Biological and chemical-physical variables were measured according to spatial and temporal parameters. Degradation kinetics were determined for trifluralyn, procymidone and chlorpyrifos; as the degradation was higher in horticultural soils than in reference soils, resistant bacteria were isolated and characterized. Finally column mobility was determined. All pesticides were extracted from soil using solvent and quantified by gas chromatography. Samples from horticultural units were compared with non-productive soils from the same region.

The main conclusions of this work are:

Physicochemical properties vary between controls and horticultural soil, but are equivalent between sites within the field.

Mobility was higher in control soils.

Seven bacterial strains were isolated from horticultural soil and two from controls.

Degradation kinetics were higher in productive soil than in controls.

q. Aprobado por (Apellidos y Nombres del Jurado):

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma del autor de la tesis:

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Efectos de la utilización de productos fitosanitarios sobre el suelo de los sistemas productivos hortícolas

Publicaciones:

Ramos, Querejeta, Flores, Hughes, Zalts, Montserrat (2010). "Potential Dermal Exposure in greenhouses for manual sprayers: Analysis of the mix/load, application and re-entry stages". Science of the total environment **408**:4062-4068

Querejeta, Ramos, Flores, Hughes, Zalts, Montserrat (2012): "Environmental pesticide distribution in small horticultural and floricultural production units in Argentina". Chemosphere **87**: 566-572

Querejeta, Ramos, Hughes, Vullo, Zalts, Montserrat (2014): "Environmental fate of trifluralin, procymidone and chlorpyrifos in small horticultural production units in Argentina". Water, Air Soil Pollut. **225**:1952

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Aportes Originales:

Si bien existen antecedentes sobre el impacto de estos productos sobre la criptofauna (Rionda, M et al, 2008) o acerca de la distribución de estos productos en distintos cultivos (Ramos et al, 2010), no se han encontrado otros estudios que traten temas vinculados a las alteraciones de los suelos locales argentinos por las prácticas de cultivo hortícola de la zona del periurbano bonaerense; más aún, no se encontraron estudios sobre la capacidad degradadora de los plaguicidas que se trataron en este trabajo en los suelos hortícolas.

En el capítulo tres de este trabajo, referido a resultados y discusión, se pueden observar los datos determinados para las muestras de suelos que dan cuenta de cómo la actividad hortícola modifica diferentes propiedades de esta matriz. Es interesante observar cómo el suelo proveniente de la huerta tuvo mayor capacidad para degradar los productos aplicados. Más aún, la cantidad de bacterias aisladas mediante un enriquecimiento en clorpirifós, procimidone, trifluralina y luego endosulfán, permitieron explicar, al menos parcialmente, por qué el suelo de huerta posee mayor capacidad para degradar los productos frente a uno no hortícola ubicado en la misma área de estudio. Estos resultados permitirían inferir procesos de adaptación bacteriana a este medio, como consecuencia de una presión selectiva dada por la utilización de manera constante de productos fitosanitarios.

Sumado a la cuestión de la cinética de degradación de los plaguicidas mencionados en estos suelos, se encontraron otras modificaciones importantes, tales como las variaciones en algunas propiedades físicoquímicas respecto a los suelos de referencia (tierras no utilizadas para la producción hortícola), en particular propiedades como los contenidos de fósforo, materia orgánica y densidad aparente; parámetros vinculados con la preparación de los suelos para la siembra y el cultivo.

En resumen, se identificaron algunas cuestiones asociadas a cómo afecta la horticultura periurbana los suelos locales. Además, se abrió una posible línea de estudio relacionada con la remediación de suelos debido al aislamiento de cepas autóctonas capaces de metabolizar algunos de los plaguicidas más utilizados en esta actividad.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Indice

ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
Resumen.....	16
CAPÍTULO 1:	18
INTRODUCCIÓN	18
1.1-Introducción	19
1.2- Objetivos	20
1.2.1- Objetivo general	20
1.2.2- Objetivos específicos	20
1.3- Zona de estudio	22
1.3.1- Aspectos productivos	23
1.4- El suelo	24
1.4.1- Perfil del suelo	27
1.4.2- Aire, agua y matriz del suelo.....	28
1.4.3- Arcilla en el suelo.....	29
1.4.4- Materia orgánica.....	30
1.4.4.1- Materia orgánica y actividad microbiana.....	31
1.4.5- Microorganismos del suelo y la práctica agrícola	33
1.4.6- Características generales de los suelos de la zona.....	34
1.5- Interacción entre plaguicidas y el medio	34
1.5.1- Degradación microbiana.....	36
1.5.2- Formas de acción de los plaguicidas.....	38
1.5.2.1- Insecticidas	38
1.5.2.1.1- Insecticidas organoclorados	38
1.5.2.1.2- Insecticidas organofosforados.....	40
1.5.2.2- Herbicidas	41
1.6- Sorción de productos orgánicos al suelo	43
1.7 Plaguicidas utilizados en los ensayos.....	44
1.7.1- Clorpirifós	44
1.7.2- Procimidone.....	46
1.7.3- Trifluralina.....	46
1.7.4- Atrazina.....	47
1.7.5- Endosulfán	49
CAPÍTULO 2:	53

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1- Materiales	54
2.1.1- Plaguicidas	54
2.1.2- Medios de cultivo para microbiología	55
2.1.3- Equipos e instrumentos	55
2.1.4- Valoración de reactivos: ensayo de biomasa microbiana	56
2.2 Metodología	57
2.2.1- Acondicionamiento de muestras	58
2.3-Determinación propiedades biológicas, químicas y físicas de las muestras	59
2.3.1- Muestreo espacial	59
2.3.2- Muestreo temporal.....	59
2.3.3- Caracterización física química y biológica de las tierras	60
2.3.3.1- Densidad Aparente	60
2.3.3.2- Humedad	61
2.3.3.3- Porcentaje de Materia Orgánica	61
2.3.3.4- Retención de agua	61
2.3.3.5- Conductividad y pH.....	62
2.3.3.6- Determinación de fósforo total.....	62
2.3.3.7- Biomasa microbiana	63
2.4- Diseño del ensayo de degradación de los plaguicidas.....	65
2.4.1- Tratamiento de las muestras en laboratorio para el ensayo de degradación	66
2.4.2- Extracción de plaguicidas de la matriz suelo	68
2.5- Enriquecimiento, aislamiento y purificación de bacterias	68
2.5.1- Caracterización morfológica y bioquímica.....	68
2.5.1.1- Caracterización morfológica: Tinción de Gram.....	68
2.5.1.2- Caracterización bioquímica: sistema multipruebas API 20 E-Biomerieux.....	69
2.5.2- Crecimiento bacteriano en presencia de endosulfán	69
2.5.2.1- Toxicidad de los solventes sobre las cepas.....	70
2.5.2.2- Utilización de endosulfán como fuente de carbono y/o azufre.....	70
2.5.3- Evaluación de consorcios.....	72
2.6- Obtención de la muestra para el ensayo de movilidad	73
2.6.1- Procedimiento experimental para la determinación de la movilidad de plaguicidas.....	73
2.7- Análisis cromatográfico.....	75
2.7.1- Linealidad.....	76
2.7.2- Recuperación	78
2.7.3- Resolución	79
2.7.4- Precisión	79
2.7.5- Limite de cuantificación (LC).....	79
CAPÍTULO 3	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
3.1- Propiedades biológicas, químicas y físicas del suelo.....	81

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

3.2-Degradación de plaguicidas	94
3.2.1- Cinética de degradación de clorpirifós, trifluralina y procimidone.....	94
3.2.2- Cinética de degradación de plaguicidas en función de los sitios muestreados	106
3.3- Enriquecimiento y aislamiento de bacterias.....	111
3.3.1- Clorpirifós, procimidone y trifluralina.....	111
3.3.2- Evaluación de consorcios.....	113
3.3.3- Endosulfán	115
3.4 Movilidad de Plaguicidas.....	120
CAPÍTULO 4:	127
CONCLUSIONES.....	127
4- Conclusiones	128
5- BIBLIOGRAFÍA	129

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Índice de tablas

TABLA 1.1: TAMAÑOS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES TEXTURALES DEL SUELO SEGÚN DIFERENTES ORGANIZACIONES	25
TABLA 2.1: CONCENTRACIONES DE PLAGUICIDAS INCORPORADAS EN LAS TIERRAS ESTUDIADAS.	67
TABLA 2.2: COMBINACIONES UTILIZADAS EN LOS MEDIOS LÍQUIDOS	71
TABLA 3.1: PROPIEDADES BIOLÓGICAS, FÍSICAS Y QUÍMICAS. MUESTREO ESPACIAL.....	83
TABLA 3.2: PROPIEDADES BIOLÓGICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS. MUESTREO TEMPORAL.....	87
TABLA 3.3: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA API20E	112
TABLA 3.4: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS API 20E.....	113
TABLA 3.5: ENSAYO DE COMPATIBILIDAD DE CEPAS AISLADAS DE SUELO DE HUERTA	114
TABLA 3.6: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA API20E E INTERPRETACIÓN PARA LA SERIE DE CEPAS HUEN.....	116

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Índice de figuras

FIG. 1.1: UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO CON PORCENTAJE DE ACTIVIDADES FLORÍCOLAS Y HORTÍCOLAS.....	22
FIG 1.2: TRIÁNGULO TEXTURAL SEGÚN CLASIFICACIÓN USDA	26
FIG. 1.3: PERFIL DEL SUELO	28
FIG 1.4: ESQUEMA DE POSIBLES INTERACCIONES Y DESTINOS DE LOS PLAGUICIDAS AL INGRESAR AL MEDIO	35
FIG. 1.5: EJEMPLOS DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS.	39
FIG. 1.6: FAMILIA DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	40
FIG. 1.7: EJEMPLOS DE ALGUNAS ESTRUCTURAS DE HERBICIDAS SEGÚN CLASIFICACIÓN QUÍMICA	42
FIG. 1.8: ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE CLORPIRIFÓS	45
FIG. 1.9: ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE PROCIMIDONE.....	46
FIG. 1.10: ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE TRIFLURALINA.....	47
FIG. 1.11: ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE ATRAZINA	48
FIG. 1.12: RUTA DEGRADATIVA PARA LA ATRAZINA MEDIADA POR MICROORGANISMOS	48
FIG. 1.13: ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE ENDOSULFÁN	50
FIG 1.14: RUTAS DE DEGRADACIÓN DE ENDOSULFÁN.....	51
FIG 2. 1 PLANO DE LA HUERTA MUESTREADA.....	58
FIG 2. 2 PLANO DE LA HUERTA, SITIOS UTILIZADOS PARA EL MUESTREO TEMPORAL	60
FIG 2. 3: CURVA DE CALIBRADO PARA LA MEDICIÓN DE FÓSFORO TOTAL	63

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

FIG 2. 4: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL ENSAYO DE BIOMASA MICROBIANA Y JUSTIFICACIÓN DEL CAMBIO QUÍMICO MEDIANTE EL DIAGRAMA DE ESPECIACIÓN	65
FIG 2. 5: ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DEL ENDOSULFÁN Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO BACTERIANO	72
FIG 2. 7: CURVAS DE CALIBRADO PARA TRIFLURALINA EN LAS DIFERENTES MATRICES SIENDO A) SOLVENTE Y B) SUELO	76
FIG 2. 8 CURVAS DE CALIBRADO PARA PROCIMIDONE EN LAS DIFERENTES MATRICES, SIENDO A) SOLVENTE Y EN B) SUELO	77
FIG 2. 9: CURVAS DE CALIBRADO PARA CLORPIRIFÓS EN LAS DIFERENTES MATRICES A) SOLVENTE Y EN B) SUELO	78
FIG 3. 1: MUESTREO ESPACIAL. HUMEDAD (A), FÓSFORO TOTAL (B), DENSIDAD (C), RESPIRACIÓN MICROBIANA (D), PH (E), VOLUMEN RETENIDO (F), CONDUCTIVIDAD (G) Y MATERIA ORGÁNICA (H). LOS DATOS FUERON NORMALIZADOS TENIENDO EN CUENTA LOS % DE HUMEDAD	85
FIG 3. 2: MUESTREO TEMPORAL (PROMEDIO DE LOS PARÁMETROS MEDIDOS EN LOS POLÍGONOS PARA CADA TIEMPO) MATERIA ORGÁNICA (A), FÓSFORO TOTAL (B), HUMEDAD (C), RESPIRACIÓN MICROBIANA (D), VOLUMEN RETENIDO. LOS DATOS FUERON NORMALIZADOS TENIENDO EN CUENTA LOS % DE HUMEDAD	88
FIG 3.3: COMPARACIÓN ENTRE TIERRA DE HUERTA Y CONTROLES (REFERENCIA Y EUCALIPTO). PH (A), MATERIA ORGÁNICA (B), HUMEDAD (C), FÓSFORO TOTAL (D), DENSIDAD (E), RESPIRACIÓN MICROBIANA (F), VOLUMEN RETENIDO (G) Y CONDUCTIVIDAD (H). LOS VALORES FUERON NORMALIZADOS TENIENDO EN CUENTA EL %HUMEDAD	90
FIG 3. 4: DISIPACIÓN DE TRIFLURALINA, CLORPIRIFÓS Y PROCIMIDONE EN (A) TIERRA DE HUERTA Y (B) TIERRA DE REFERENCIA. DOSIS 0,015-0,035 MG/G TIERRA.....	95
FIG 3. 5: RESPIRACIÓN MICROBIANA EN TIERRA DE REFERENCIA (A) Y TIERRA DE HUERTA (B). DOSIS 0,015-0,035 MG/G TIERRA	97
FIG 3. 6: DISIPACIÓN DE TRIFLURALINA EN (A) TIERRA DE HUERTA, (B) TIERRA DE REFERENCIA Y (C) TIERRA DE EUCALIPTO. DOSIS 0,200 MG/G TIERRA SECA	98

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

FIG 3. 7: DISIPACIÓN DE CLORPIRIFÓS EN (A) TIERRA DE HUERTA, (B) TIERRA DE REFERENCIA Y (C) TIERRA DE EUCALIPTO. DOSIS 0,15 MG /G TIERRA	99
FIG 3. 8: DISIPACIÓN DE PROCIMIDONE EN (A) TIERRA DE HUERTA, (B) TIERRA DE REFERENCIA Y (C) TIERRA DE EUCALIPTO. DOSIS 0,20 MG/G TIERRA	100
FIG 3. 9: RESPIRACIÓN MICROBIANA EN TIERRA DE HUERTA (A), TIERRA DE REFERENCIA (B) Y TIERRA DE EUCALIPTO (C). DOSIS: 1,15-0,20 MG/G TIERRA	102
FIG 3. 10: RECUENTO DE BACTERIA HETERÓTROFAS AEROBIAS TOTALES EN TIERRA DE HUERTA (A), TIERRA DE REFERENCIA (B) Y TIERRA DE EUCALIPTO (C). DOSIS: 0,15-0,20 MG/G TIERRA.....	103
FIG 3. 11: MAPA DE LA HUERTA MUESTREADA Y PUNTOS DENTRO DE LA MISMA TOMADOS PARA EL MUESTREO DE DEGRADACIÓN POR SITIOS CON LOS CORRESPONDIENTES CULTIVOS.....	108
FIG 3. 12: DEGRADACIÓN POR SITIOS DE TRIFLURALINA (A), PROCIMIDONE (B) Y CLORPIRIFÓS (C).....	109
FIG 3. 13: CRECIMIENTO EN PLACA ENRIQUECIDA CON CLORPIRIFÓS, TRIFLURALINA Y PROCIMIDONE EN SUS FORMULACIONES COMERCIALES	111
FIG 3.14 AGAR CON ENDOSULFÁN COMO ÚNICA FUENTE DE C. CRECIMIENTO DE HUEN 3 (A) Y HUEN 1 (B).....	118
FIG 3. 15: EVALUACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE ENDOSULFAN -POR TRIPLICADO- COMO FUENTE DE CARBONO SOLAMENTE (A) Y COMO FUENTE DE AZUFRE Y CARBONO (B).....	120
FIG 3. 16: MOVILIDAD DE ATRAZINA EN SUELOS DE HUERTA (A) Y REFERENCIA (B).....	121
CONSIDERANDO LA SECCIÓN 1 EL FRAGMENTO DE 0-5 CM, SECCIÓN 2 5-10CM, SECCIÓN 3 10-15CM, SECCIÓN 4 15-20 CM, SECCIÓN 5 20-25 CM.....	121
FIG 3. 17: MOVILIDAD DE TRIFLURALINA EN SUELOS DE HUERTA (A) Y REFERENCIA (B).....	122
CONSIDERANDO LA SECCIÓN 1 EL FRAGMENTO DE 0-5 CM, SECCIÓN 2 5-10CM,	

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

SECCIÓN 3 10-15CM, SECCIÓN 4 15-20 CM, SECCIÓN 5 20-25 CM..... 122

**FIG 3. 18 MOVILIDAD DE CLORPIRIFÓS EN SUELOS DE HUERTA (A) Y
REFERENCIA (B)..... 123**

**CONSIDERANDO LA SECCIÓN 1 EL FRAGMENTO DE 0-5 CM, SECCIÓN 2 5-10CM,
SECCIÓN 3 10-15CM, SECCIÓN 4 15-20 CM, SECCIÓN 5 20-25 CM..... 123**

**FIG 3. 19: MOVILIDAD DE PROCIMIDONE EN SUELOS DE HUERTA (A) Y
REFERENCIA (B)..... 124**

**CONSIDERANDO LA SECCIÓN 1 DESDE EL EXTREMO SUPERIOR DE LA
COLUMNA, EL FRAGMENTO DE 0-5 CM, SECCIÓN 2 5-10CM, SECCIÓN 3 10-15CM,
SECCIÓN 4 15-20 CM, SECCIÓN 5 20-25 CM 124**

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Resumen

La producción hortícola es una de las actividades que en los últimos años fue progresando sobre el periurbano bonaerense, con la característica particular de que involucra el uso de plaguicidas en forma manual e intensiva. Para saber cómo repercuten estas prácticas en los suelos locales, se planteó el objetivo de estudiar algunos de los efectos que los plaguicidas tienen sobre dicha matriz. Específicamente, se estudiaron las cinéticas de degradación y movilidad de ciertos plaguicidas y se caracterizaron los suelos hortícolas de manera biológica, química y física. En todos los casos se obtuvieron resultados relativos, es decir, comparativos respecto de la situación de suelos control no perturbados.

En particular, se muestrearon suelos de una huerta dedicada al cultivo de frutas y verduras, ubicada en Cuartel V (Partido de Moreno, provincia de Bs. As. Argentina). Las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo se estudiaron teniendo en cuenta la distribución espacial dentro de la huerta y el parámetro temporal/estacional. En estas etapas siempre se compararon las muestras de huerta con suelos no productivos dentro de la misma zona. Se determinó, además, la cinética de degradación para tres plaguicidas: trifluralina, procimidone y clorpirifós, experimento para el cual se utilizó microcosmos de suelo de la huerta y del suelo de referencia. En paralelo, se realizó un enriquecimiento microbiano de muestras de suelo en estos tres productos y se aislaron las bacterias tolerantes a ellos, las cuales se caracterizaron morfológica y bioquímicamente así como también se hicieron pruebas de compatibilidad entre las cepas aisladas. Por último, con algunos de los plaguicidas mencionados, se ensayó la movilidad vertical comparando el suelo de huerta y el suelo control. Los plaguicidas fueron incorporados en las tierras muestreadas, comparando su movilidad en columnas de vidrio con un producto de movilidad media como lo es la atrazina. Tanto en los ensayos de movilidad como los de cinética, los plaguicidas se extrajeron del suelo con solvente orgánico y se cuantificaron por cromatografía gaseosa.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

En cuanto a características físico-químicas de las muestras se observó que entre sitios de la misma huerta no hubo diferencias significativas; las que si evidenciaron entre los controles y el suelo productivo, presumiblemente resultado del agregado de enmiendas y el laboreo mecánicos. Entre los valores más sobresalientes que diferencian las muestras de la huerta y los controles, se puede mencionar el fósforo total, que es marcadamente mayor en huerta mientras que el porcentaje de materia orgánica es significativamente mayor en los controles. Las velocidades de degradación de los productos, en todos los casos, fueron mayores en suelos hortícolas que en suelos controles. Se observó que en los suelos provenientes de huerta, los plaguicidas prácticamente desaparecían luego de 25 días aproximadamente, mientras que en los suelos controles los productos todavía estaban presentes inclusive a los 25 días luego de la aplicación en cantidades significativas. Esto se encuentra estrechamente vinculado con los aislamientos microbianos, donde se pudieron diferenciar siete cepas bacterianas provenientes del suelo de huerta y dos de los controles con importante actividad degradativa. Probablemente la cinética de degradación de los plaguicidas en suelo de huerta responda a la adaptación de la población microbiana a las condiciones de este suelo. Con respecto a la movilidad de los productos, los resultados preliminares indican que es mayor la movilidad en los suelos hortícolas que en los suelos controles.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Capítulo 1:
Introducción

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

1.1-Introducción

Actualmente, la producción hortícola es una de las actividades más importantes en el periurbano del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA). En esta zona, la horticultura es llevada a cabo en forma manual y generalmente por familias pertenecientes a la comunidad boliviana que tiene años realizando esa labor. Para la producción de hortalizas, los trabajadores utilizan algunos productos fitosanitarios (insecticidas, herbicidas, fungicidas, etc.) que al incorporarse al suelo pueden producir modificaciones tanto sobre el ecosistema como sobre el propio suelo. Además de los productos fitosanitarios, también suelen utilizar otro tipo de agregados tales como los abonos que pueden alterar la composición del suelo.

En este trabajo se pretende estudiar el efecto de la aplicación de plaguicidas sobre un suelo hortícola, en el cual las alteraciones mencionadas anteriormente se podrían traducir en deficiencias en el funcionamiento productivo del suelo y en su posible agotamiento para usos con fines agrícolas, poniendo en juego la sustentabilidad de la actividad.

Por otra parte, en los sistemas agrícolas la actividad microbiana es muy importante. Entre otras funciones estos organismos se encargan de reciclar elementos esenciales para las plantas convirtiéndolos en sustancias fácilmente asimilables; también, las poblaciones microbianas pueden degradar productos xenobióticos reduciendo muchas veces su toxicidad. Estos microorganismos podrían ser utilizados como indicadores de estado de ese medio, y también como agentes de biorremediación. Es por esto que sería interesante saber cómo responde la microbiota de estos suelos a la presencia de plaguicidas.

Sabiendo entonces la complejidad que presenta el suelo hortícola y, para la mejor comprensión de los procesos que ocurren allí, se tiene la intención de caracterizarlo fisicoquímicamente, junto con un suelo de la misma zona pero no explotado con fines productivos, de forma que pueda ser usado como control. Por otro lado, se pretende comprender ciertos procesos que ocurren en estos suelos como movilidad, degradación y adaptación de microorganismos a la actividad que presiona

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

sobre ese sistema.

En relación con el estudio de la degradación de los productos fitosanitarios en suelos hortícolas, se utilizaron en microcosmos de suelo un insecticida comercialmente conocido como Lorsban y cuyo principio activo es el Clorpirifós, un fungicida cuyo principio activo es el Procimidone y se comercializa bajo el nombre de Sumilex y por último un herbicida comercialmente llamado Trigermin del cual la Trifluralina es el principio activo.

Si bien existen antecedentes sobre el impacto de estos productos sobre la criptofauna (Rionda, M et al, 2008) o acerca de la distribución de estos productos en distintos cultivos (Ramos et al, 2010), no se han encontrado otros estudios que vinculen actividad microbiana con estos productos en ambientes y condiciones locales argentinas. No se encontraron estudios sobre la capacidad degradadora de estos plaguicidas en los suelos hortícolas generando la pregunta: *¿qué efectos producen los plaguicidas sobre los suelos hortícolas en relación a su degradación y movilidad?*

1.2- Objetivos

1.2.1- Objetivo general

Estudiar el efecto de los productos fitosanitarios en los suelos de los sistemas productivos hortícolas, particularmente de la zona de Moreno (Pcia. de Buenos Aires), de forma de poder estimar el potencial riesgo de contaminación de los mismos y evaluar los fenómenos de movilidad en esta matriz.

1.2.2- Objetivos específicos

- Caracterizar biológica, física y químicamente los suelos de la huerta frente a un suelo no-productivo (control), y evaluar la heterogeneidad de los mismos, en función de variación posicional y estacional de sus propiedades.
- Realizar un estudio comparativo de la velocidad de degradación de los plaguicidas en los suelos productivos versus suelos control.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Higher Education (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

- Aislar y caracterizar las cepas bacterianas degradadoras de plaguicidas de los suelos.
- Evaluar la movilidad de los plaguicidas en suelos productivos y en suelos control.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

1.3- Zona de estudio

Si bien el trabajo experimental se realizó a escala de laboratorio, las muestras de suelo provinieron de una zona de huertas ubicada en Cuartel V, Partido de Moreno, Pcia. de Buenos Aires (Fig. 1.1). Dicha zona pertenece al segundo cordón periurbano cuyas actividades son muy diferentes entre sí. En terrenos colindantes se pueden observar urbanizaciones cerradas, centros de actividad industrial, campos hortícolas, producciones florícolas, así como urbanizaciones precarias. Las producciones hortícolas son llevadas a cabo en campos desde 1 ha. hasta terrenos de no más de 10 hectáreas.

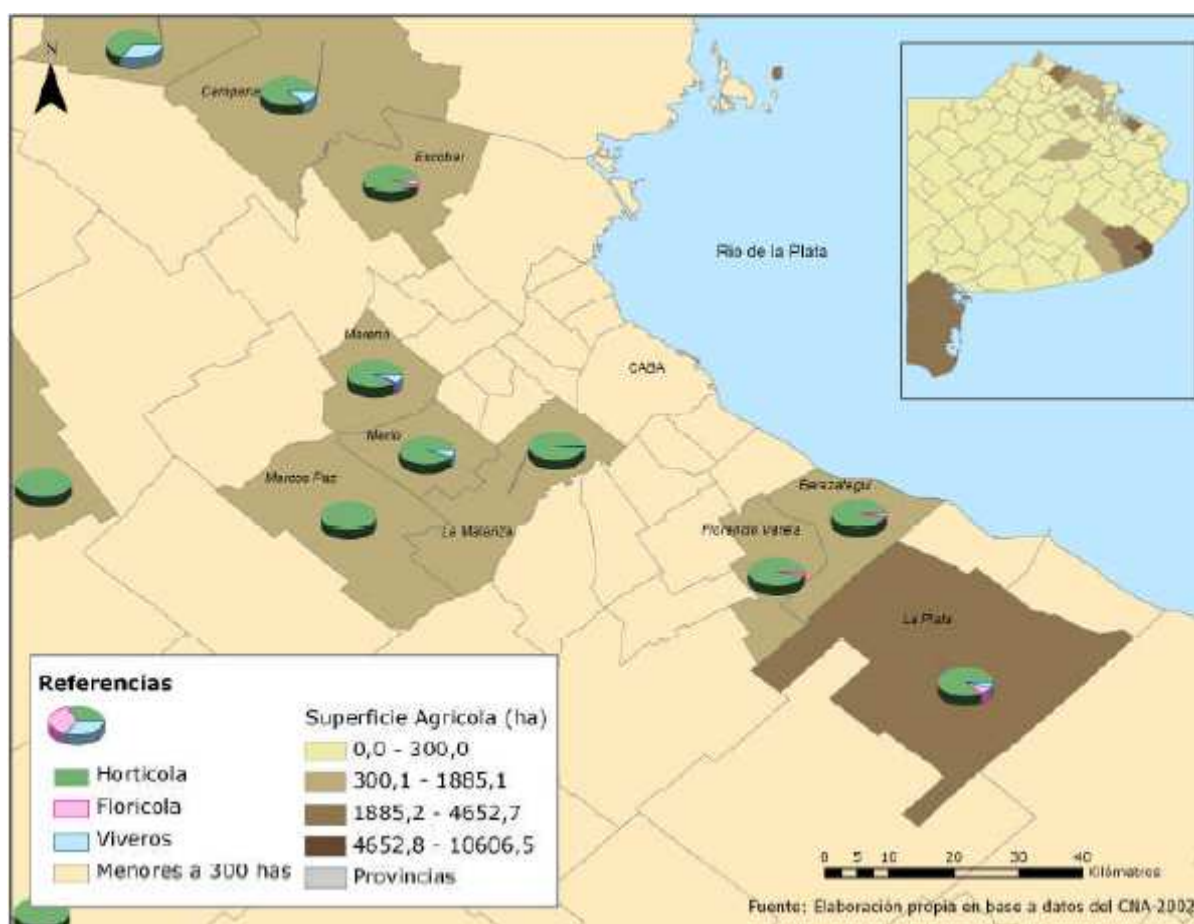


Fig. 1.1: Ubicación del área de estudio con porcentaje de actividades florícolas y hortícolas.

Fuente: Flores P, 2014. Elaboración en base a datos del CNA 2002

El Partido de Moreno fue creado en 1864 y se encuentra en el extremo oeste del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) en lo que se denomina segunda corona del AMBA. Limita

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

con los Partidos de San Miguel, José C. Paz, Gral. Rodríguez, Merlo e Ituzaingó.

En cuanto a los aspectos físicos de la región, desde el punto de vista geomorfológico, el Partido de Moreno está inserto en lo que se denomina Llanura Pampeana. Es una llanura de poca pendiente y un desnivel de aproximadamente 120 m con suelos ricos en materia orgánica, de gran fertilidad y aptitud para la agricultura. Dentro de esta llanura, Moreno se encuentra en la Pampa Ondulada que se caracteriza por las lomadas y desniveles en los terrenos a causa de la erosión fluvial. El clima en Moreno es templado húmedo con fenómenos meteorológicos localizados, como las precipitaciones (Alsina, G. et al, 1998).

1.3.1- Aspectos productivos

Los productos que más se cultivan en estas huertas son verduras de hoja (acelga, lechuga, brócoli) seguidos por la producción de tomate y frutilla. Según datos del Instituto Municipal de Desarrollo Económico Local (IMDEL) del total de la superficie en producción, el 56 % se destina a la producción de verduras de hoja (en orden decreciente: lechuga, acelga, cebolla de verdeo, perejil y espinaca) y el 32% a la hortaliza de fruto (tomate, zapallito, berenjena, chaucha, choclo, frutilla), el 5,7% a crucíferas (repollos, brócoli), el 4,8% a cultivos de raíz (remolacha) y el 1,5% restante se destina al cultivo bajo cubierta (tomate y pimiento) (IMDEL, 2008). La comercialización de estos productos se realiza generalmente en mercados locales o de partidos vecinos.

Cada uno de esos cultivos requiere condiciones de crecimiento y cuidados diferentes. A modo de ejemplo, se señalan algunas características del cultivo de brócoli (como ejemplo de verduras de hoja) y de frutilla.

En relación con los cultivos de brócoli corresponden a extensiones moderadas, el riego debe ser abundante y regular en la fase de crecimiento y, en la fase de inducción floral, conviene que el suelo esté sin excesiva humedad. Es un cultivo que requiere un alto nivel de materia orgánica, que se incorpora un mes o dos antes de la plantación. Por otro lado, el cultivo de frutillas requiere más preparación para su producción, se realiza exclusivamente con "acolchonado" (también llamado mulching) de polietileno negro (de 30 micrones de espesor) ya que esta técnica otorga importantes ventajas: controla las malezas, conserva más tiempo la humedad del suelo y permite la obtención de fruta de mejor calidad en tamaño, sanidad y aspecto. El mulching es una práctica que se lleva a cabo con muchos cultivos, y consiste en una capa de material aplicada sobre

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

la superficie del suelo, con pequeños agujeros en donde se siembran los plantines. Como ya se mencionó, provee de muchas ventajas tales como la conservación de la estructura y fertilidad del suelo y la reducción del crecimiento de las malas hierbas. Este material puede quedar en el suelo en forma permanente o temporal.

Respecto a la recolección de frutilla, ésta se realiza cuando presentan alrededor del 75% del fruto con color rojo. El sistema de raíces se desarrolla principalmente en los primeros 30 centímetros del suelo, por lo que hay que cuidar la humedad del mismo. Los mayores requerimientos de humedad de este cultivo son: inmediatamente después del transplante; en la formación de botones florales; y durante la floración y fructificación y durante la cosecha. El sistema de riego más aconsejable es el sistema por goteo, debido a que aumenta los rendimientos y se logra un ahorro de agua. Entre las enfermedades de este tipo de cultivo se encuentran: Moho gris (hongo botrytis cinérea), Podredumbre por Antracnosis y Pulgones (Aphididae) (Guía del emprendedor, 2004).

1.4- El suelo

El suelo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, resultado de la combinación de la roca madre, la topografía, el clima, el tiempo y la actividad biológica (Grant y Long, 1989). En función de esta definición, se puede decir que el suelo es una sucesión de capas fragmentadas en la superficie terrestre, formada inicialmente a partir de la desintegración, descomposición y recomposición del material mineral contenido en las rocas expuestas a procesos físicos, químicos y biológicos.

La propiedad más importante del suelo es su textura, ya que influye sobre los demás rasgos del mismo (Plaster, 1997) lo que afecta cuestiones tales como la capacidad de retención de agua y aireación del suelo. El término textura del suelo refiere al rango de tamaños de las partículas que lo componen, denota la distribución precisa de los tamaños de las partículas y la proporción en la que se encuentran. La textura del suelo es un atributo intrínseco y el más usado para caracterizar el estado físico: como consecuencia de la textura, la superficie puede ser lisa o con pozos, granular o agrietada, tapada o expuesta, con cobertura vegetal o desértica. Estas condiciones afectan los procesos de radiación e intercambio de calor, de movilidad de agua y otras soluciones y la difusión de gases.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

De acuerdo al tamaño de partícula, se puede tener arcilla, limo o arena. Muchos suelos contienen rocas grandes que obviamente no se comportan como suelo pero pueden afectar la densidad. La definición convencional de material del suelo incluye todas las partículas menores a 2 mm de diámetro. Las partículas más grandes generalmente reconocidas como material del suelo se denominan arena. La siguiente fracción es limo, el cual consiste en partículas de tamaño intermedio entre la arena y la arcilla, es decir entre 2 μm y 20 μm , es la fracción coloidal (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: tamaños de las diferentes fracciones texturales del suelo según diferentes organizaciones

<i>Dimensión de la partícula elemental (mm)</i>	<i>Clasificación según Sistema Internacional</i>	<i>Clasificación según Dep. de Agricultura E.U.</i>
<0,001	Arcilla	Arcilla
<0,002		
0,005	Limo	Limo
0,01		
0,02		
0,05	Arena fina	Arena muy fina
0,1		Arena fina
0,25		
0,2		
0,5	Arena gruesa	Arena gruesa
1,0		Arena muy gruesa
2,0		
3,0	Grava fina	Grava fina
5,0		
10,0	Grava	Grava
20,0	Grava gruesa y piedras	Grava gruesa y piedras
>20,0		

Por último, la arcilla es la fracción con mayor influencia en el comportamiento del suelo, sus partículas tienen una forma característica de plato y generalmente están compuestas por aluminosilicatos. Estas partículas absorben agua causando el humedecimiento del suelo. Típicamente llevan carga electrostática negativa y, al ser hidratadas, forman una doble capa electrostática permitiendo intercambio iónico con la solución que la rodea.

Las tres fracciones juntas constituyen la fase sólida del suelo, y se pueden combinar en varias configuraciones formando la matriz del suelo (Fig. 1.2).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

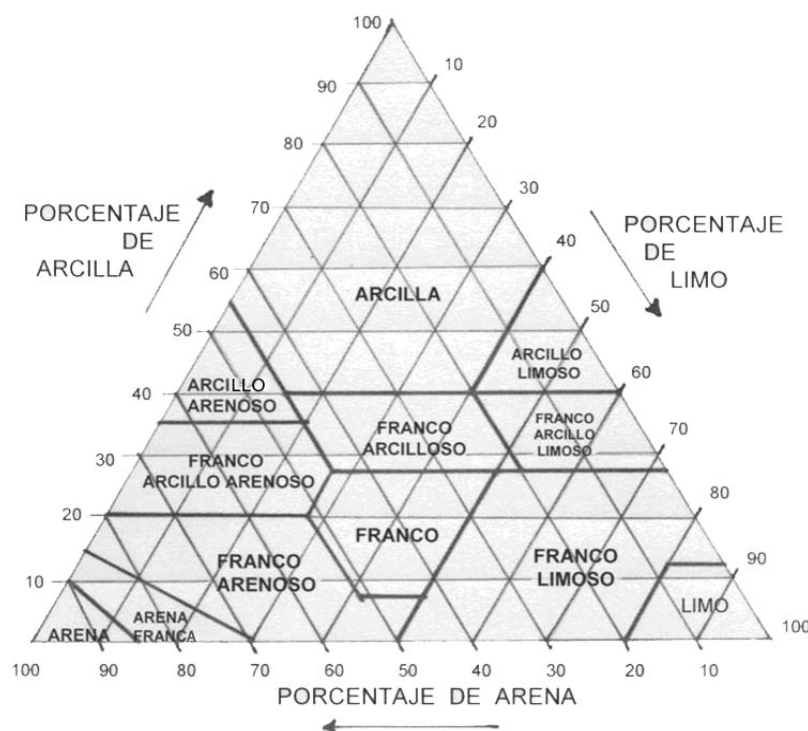


Fig 1.2: Triángulo textural según clasificación USDA

Fuente: http://soils.usda.gov/technical/handbook/images/Part618Exhibit8_hi.jpg

La organización de las partículas en el suelo es llamada estructura del suelo. La estructura afecta la retención y transmisión de fluidos en el suelo, incluyendo la infiltración y aireación. En función de esto, se pueden reconocer tres categorías de estructura de suelo: granular, masiva y agregada (Baird, 2000). Cuando las partículas están desprendidas totalmente las unas de las otras, o sea que la estructura está completamente perdida, es el caso de un suelo granular o un depósito no consolidado de polvo desértico. Así se conoce a los suelos desestructurados o una estructura solo granular. Cuando el suelo está fuertemente empaquetado en bloques cohesivos la estructura puede ser masiva. La condición intermedia en la cual las partículas de suelo están asociadas en terrones pequeños cuasi estables es llamada agregados. Esta última es la condición más deseable para el crecimiento de las plantas (Baird, 2000)

Los agregados visibles, los cuales están generalmente en el orden de milímetros a algunos centímetros de diámetro, son llamados macroagregados. Los más pequeños, que ensamblados forman los macroagregados, son llamados microagregados.

Un prerequisite para la agregación es que la arcilla pueda ser floculante, es decir que

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

permita la aglutinación de sus partículas coloidales en agua. La agregación se relaciona con la cementación, la precipitación de estas partículas que quedan unidas entre sí.

La compleja interrelación entre las propiedades físicas, biológicas y químicas está involucrada en la formación y degradación de los agregados del suelo. Los exudados de las raíces y su continua mortandad promueven la actividad microbiana, en particular los pelos de las raíces, la cual resulta en producción de cementantes húmicos (Baird, 2000).

1.4.1- Perfil del suelo

Se llaman horizontes del suelo a una serie de niveles horizontales que se desarrollan en el interior del mismo y que presentan diferentes caracteres de composición, textura, adherencia, etc. El perfil del suelo (Fig. 1.3) es la organización vertical de todos estos horizontes (Buol et al, 1973).

El carácter del perfil depende primeramente del clima que prevalece durante el proceso de formación. También depende del material parental, la vegetación, topografía y tiempo. Estas cinco variables se conocen como los factores de formación del suelo (Hans, 1994).

El desarrollo típico del suelo y su perfil es llamado pedogénesis, comienza con una desintegración física de la roca madre más expuesta, la cual provee al suelo el material parental que gradualmente es colonizado por organismos vivos, ocasionando la acumulación de residuos orgánicos sobre y debajo de la superficie terrestre. El perfil típico del suelo consiste en una sucesión de estratos más o menos diferentes. El estrato que toma lugar debido a la formación interna del suelo es llamado horizonte.

El horizonte A es donde se encuentran las plantas y animales, y sus residuos interactúan con la enorme y diversa multitud de microorganismos, como bacterias protozoos y hongos. El horizonte A es en general el más fértil pero también es el más vulnerable a la erosión por agua y el viento.

El horizonte B es más grueso que el A. La presión de la capa superior hace que se reduzca la porosidad en las capas más profundas, lo que puede inhibir el intercambio gaseoso, el drenaje de agua y la penetración de las raíces. Debajo de este horizonte está el C el cual es material de la roca madre, en otros casos este horizonte puede consistir en depósitos aluviales, eólicos o glaciales.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

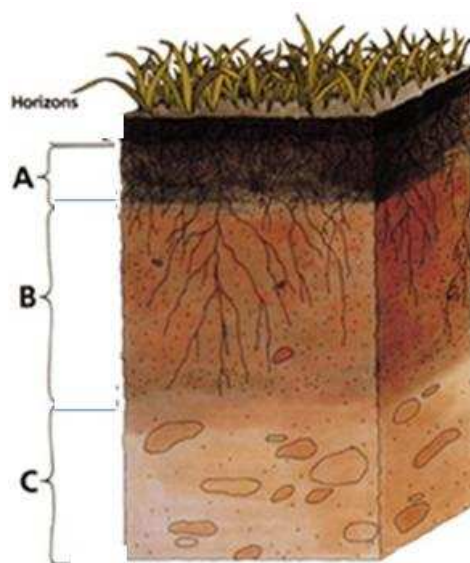


Fig. 1.3: Perfil del suelo

Fuente: <http://soils.usda.gov/education/resources/lessons/profile/profile.jpg>

1.4.2- Aire, agua y matriz del suelo

Las tres fases que caracterizan al suelo son: la sólida, que constituye la matriz del suelo, la líquida que refiere al agua del suelo, la cual contiene siempre sustancias disueltas por lo cual se llama solución del suelo, y una gaseosa que es denominada la atmósfera del suelo .

La matriz sólida consiste en partículas que varían en composición química y mineralógica así como también en tamaño, forma y orientación en el espacio. También contiene sustancias amorfas, y materia orgánica particulada que es anexada a los granos minerales y puede unirlos en ensamblajes llamados agregados. Tal como se señaló previamente, la organización de los componentes sólidos del suelo determina las características geométricas de los espacios porales, en los cuales el agua y el aire tanto difunden como son retenidos (Hans, 1994).

En lo que respecta a la solución del suelo, se diferencian tres formas: una llamada “higroscópica”, que corresponde a aquella agua que es absorbida directamente desde la humedad del aire y no está sometida a movimiento ni es asimilable por las plantas. Otra clase denominada “capilar”, lo cual se refiere al agua retenida en microporos por fenómenos de capilaridad y tensión superficial, que es la aprovechable por las plantas. Por último, está la “gravitacional” que se desplaza libremente por el suelo bajo efecto de la gravedad, generando infiltración efectiva (Herrera A. et al, 2008).

En relación con la fase gaseosa, el suelo posee una atmósfera que se ubica en los poros

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

libres de agua, la composición de la misma está marcada por altas concentraciones de CO₂ debido a la respiración de los microorganismos y de las raíces vegetales. Esta atmósfera contiene, además, otros gases biológicamente activos tales como amoníaco, etileno y metabolitos volátiles (Hans, 1994).

Para el crecimiento adecuado de las raíces, se requiere que el suelo esté aireado, es decir, que el intercambio gaseoso tome lugar entre el aire en el suelo y en la atmósfera en una magnitud tal que prevenga la deficiencia de oxígeno y el exceso del dióxido de carbono, para desarrollar adecuadamente la zona radicular (Chessworth, 2008). A su vez, los microorganismos también respiran, y pueden competir con las raíces de las plantas más grandes por el oxígeno.

Dependiendo de factores como la estación del año, temperatura, estructura del suelo, profundidad, crecimiento radicular, actividad microbiana, pH y sobre todo la velocidad de intercambio gaseoso a través de la superficie del suelo, el aire puede difundir mejor o peor desde la atmósfera externa. La concentración de dióxido de carbono en la atmósfera es alrededor de 0,036%; en el suelo, sin embargo, puede ser hasta diez veces superior, debido a que el CO₂ es producido en el suelo por oxidación de C. Este incremento en el CO₂ está generalmente asociado a la disminución de oxígeno. Respecto de las concentraciones variables de gases en el suelo, muchas plantas pueden tolerar e incluso utilizar para su metabolismo altas concentraciones de dióxido de carbono y de otros gases, tanto en la fase gaseosa como en la acuosa.

1.4.3- Arcilla en el suelo

En secciones anteriores se mencionó que texturalmente el suelo tiene diferentes porciones: arena, limo, arcilla. Las dos primeras difieren notablemente de la última principalmente porque consisten en minerales primarios más resistentes, esto es, minerales presentes en la roca madre de la cual fueron formados. La arcilla, sin embargo, está incluida en los minerales secundarios formados en el suelo mismo por descomposición de minerales primarios y su recomposición en nuevos minerales.

El término arcilla sugiere un suelo que tiende a retener agua y volverse suave y pegajoso cuando se humedece. Los minerales prevalecientes en la fracción arcillosa en los suelos de región templada son silicatos, entre ellos los aluminosilicatos (Baird, 2000). Las partículas de arcilla casi nunca están completamente secas, incluso luego de calentarlas a 105 °C durante 24 horas. Esta

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

afinidad de la superficie de las arcillas por el agua se evidencia en la naturaleza higroscópica de los suelos arcillosos, esto es, su habilidad por sorber y condensar el vapor de agua del aire.

Los aluminosilicatos son estructuras cristalinas inorgánicas de un tamaño menor a 0,2 mm, comúnmente se encuentran clasificados dentro de los minerales de arcilla. Estas partículas contienen uniones Si-O tetraédricas en la cual el átomo de silicio se encuentra centrado entre cuatro átomos de oxígeno. También hay uniones Al-O octaédricas, siendo el aluminio el átomo central rodeado de los oxígenos. Ambas estructuras forman capas al compartir los átomos de oxígeno. Tanto el Si como el Al pueden ser sustituidos en cada estructura (tetraédrica y octaédrica) entre sí, o por cationes divalentes en el caso de la estructura octaédrica. De acuerdo a las sustituciones que se realicen en las capas, y el radio del átomo central, se diferenciarán las propiedades de los diferentes minerales de arcilla.

La sustitución de los cationes de Si y Al por otros de menor carga le proporciona a la estructura una carga negativa permanente, es decir una capacidad de intercambio catiónico. Este fenómeno de intercambio catiónico es de gran importancia en el suelo, afecta la retención y liberación de nutrientes y otras sales así como también la floculación/dispersión de los coloides del suelo.

1.4.4- Materia orgánica

La materia orgánica, generalmente de color oscuro, se puede encontrar principalmente en la superficie del suelo. El Glossary of Soil Science Terms de la Soil Science Society of America en 1996 definió a esta fracción del suelo como "la fracción medianamente estable del suelo, remanente de una porción mayor de residuos de plantas y animales que están en descomposición"; es decir que el humus es resultante de la descomposición de los residuos vegetales y animales.

El humus no es un único compuesto ni tampoco tiene la misma composición en diferentes ubicaciones, más aún, su composición química exacta no se puede describir en su totalidad, pero es caracterizada como una mezcla compleja de productos de condensación de unidades fenólicas, polisacáridos y proteínas. Durante la hidratación, cada partícula de humus forma un micelio que actúa para componer un conjunto que es capaz de adsorber varios constituyentes orgánicos e inorgánicos incluyendo cationes. Por ello es que la materia orgánica del suelo es generalmente

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

descrita una estructura tridimensional que abriga partículas minerales y puede estar electrostáticamente unida a las arcillas y óxidos metálicos en el suelo (Baird, 2000).

Los coloides orgánicos del humus son vulnerables a la acción bacteriana, particularmente si la temperatura, estructura o regímenes de aireación del suelo son modificados, estimulando así el metabolismo bacteriano (Hans, 1994).

1.4.4.1- Materia orgánica y actividad microbiana

La estructura del suelo es afectada por la actividad de los microorganismos, especialmente por las bacterias de la rizósfera, asociadas a las raíces de plantas específicas. La composición de la microbiota del suelo depende de los regímenes termales y estructurales, del pH del suelo y el potencial redox, el estado nutritivo del sustrato y el tipo y cantidad de materia orgánica presente (Grant, 1989).

En suelos lejos de la rizósfera, el ambiente para las bacterias es estresante. La mayoría de las bacterias existen en estas condiciones de bajos nutrientes y pueden necesitar más para su metabolismo. La distribución y abundancia de estos microorganismos en el suelo es irregular, por lo cual es muy difícil determinar sus abundancias sin tener un rango de incertidumbre muy alto, viéndolo a escala macro. Esta variación se debe al encuentro de la materia orgánica –también dispersa- por los microorganismos. Hay agregados de microorganismos alrededor de las raíces, muchas veces provenientes de enmiendas como cama de pollo y otras fuentes de materia orgánica (Sparling, 1997).

La respiración del suelo representa la descomposición de los residuos vegetales y animales, la respiración de las raíces y el decaimiento lento de la materia orgánica del suelo. En un ecosistema agrícola, los residuos de los cultivos constituyen la fuente de carbono primaria que forman el sustrato para la biota del suelo y da lugar a la liberación de CO₂ por medio de la respiración. Es decir que los microorganismos heterótrofos del suelo utilizan la energía del carbono, derivada de la fotosíntesis de las plantas verdes.

Los microorganismos del suelo usan los componentes de esos residuos no sólo como sustratos para energía, sino también como fuente de carbono en la síntesis de nuevas células. Estos microorganismos son generalmente de vida corta y pueden ser descompuestos y consumidos por las sucesivas poblaciones que encuentran las células muertas. Una de las transformaciones más

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

estables en el curso del decaimiento de los residuos es la formación de la materia orgánica del suelo, a partir de la descomposición de la lignina (Slonczewski et al, 2011). Esta ha sido reconocida como un constituyente valioso porque imparte propiedades biológicas, químicas y físicas al suelo. La naturaleza de los residuos orgánicos y la subsecuente descomposición microbiana de sus componentes definen la materia orgánica del suelo, que usualmente es relacionada con la calidad del suelo.

La materia orgánica en el suelo proporciona una serie de propiedades benéficas que pueden ser agrupadas de la siguiente manera:

- **Biológicas:** Provee carbono lentamente disponible y una fuente de energía para abastecer una población microbiana grande, diversa y activamente metabólica. Es, también, fuente de compuestos que pueden ejercer efectos promotores de crecimiento en las plantas.
- **Químicas:** Incrementa la capacidad de intercambio catiónico en el suelo. Contribuye a la regulación de pH. Provee una fuente de liberación lenta de nutrientes como N, P y S. Tiene una alta capacidad adsorptiva de compuestos orgánicos y reduce la biodisponibilidad de xenobióticos tóxicos.
- **Físicas:** Contribuye a mejorar la agregación y estructura del suelo. Disminuye la densidad aparente e incrementa el espacio poral. Aumenta la capacidad de retener agua (Chesworth, 2008).

El contenido orgánico es tenido en cuenta con respecto a la distribución y número de los microorganismos en el suelo, los otros factores que influyen son la humedad, el pH y la temperatura; estos factores son determinantes para la proliferación de las especies microbianas. La mayor proporción de éstas se ubica en la parte superior del suelo (horizonte A) y en segundo lugar en el horizonte B. Es por ello que los microorganismos se ubican rápidamente en las superficies erosionadas de suelo, si se realiza un recuento seguramente se observará que en su mayoría se encuentran en el límite superior, el cual es rico en humus (Grant y Long, 1989).

Hay muchas categorías de microorganismos en el suelo, entre ellas las bacterias. Las que habitan en el suelo generalmente tienen forma de barras, de aproximadamente 1 μm de ancho y

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

son ligeramente alargadas, si bien la mayoría son aerobias, muchas crecen en suelos anaerobios. En general son bacterias saprofitas y algunas son parásitos que causan la muerte de las plantas. Además de bacterias, en el suelo se pueden encontrar a nivel microscópico: hongos, actinomicetos (también llamadas bacterias del moho), levaduras y algas (Plaster, 1997); y, también, a nivel de mesofauna pueden hallarse especies de la familia de los microartrópodos y colémbolos, entre otros (Coleman, et al, 2004).

1.4.5- Microorganismos del suelo y la práctica agrícola

En la práctica agrícola, se realizan agregados de diferentes productos cuya estabilidad está determinada, entre otros factores, por la acción de microorganismos propios del suelo. Estos agregados funcionan como fuente de nutrientes, en el caso de fertilizantes y la cama de pollo, o como control de plagas en el caso de los insecticidas o fungicidas. Los agregados de origen biológico proveen un gran número de microorganismos de todo tipo, además incluyen nutrientes vegetales, nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio, azufre y micronutrientes (Grant et al, 1989).

En el caso de la cama de pollo, se trata de excretas animales que se combinan con restos vegetales (paja, pastos, cáscaras, etc.) que absorben los líquidos. Este abono tiene una elevada carga de contaminación microbiológica, extremadamente fitotóxico para los suelos y constituye una manera rápida de contaminar los recursos naturales. La combinación de aplicaciones repetidas a lo largo del tiempo y de altas dosis conduce al lavado y la acumulación en profundidad y en las aguas subterráneas de nitrato, fosfato y otras sustancias en cantidades contaminantes. En este sentido hay que destacar que puede producirse una distorsión en la composición de la flora edáfica al entrar al suelo grupos de baja o nula eficacia en los procesos de humificación. Los microorganismos consumen estos agregados externos, y en consecuencia la composición de su población cambia, actuando así como indicador de calidad de suelo. Estos cambios producen alteraciones en funciones esenciales para mantener un suelo sano y dentro de los parámetros normales de la zona (Van Elsas et al, 1997).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

1.4.6- Características generales de los suelos de la zona

Dentro de la clasificación taxonómica de suelos que se ha adoptado en nuestro país, el orden más representado en la provincia de Buenos Aires es el de los Molisoles (Puentes M, 2009). Los molisoles de la Pampa Ondulada se desarrollaron en un ambiente húmedo denominado "údic" y tienen un horizonte subsuperficial enriquecido en arcilla denominado "argílico". Estos suelos son clasificados como "Argiudoles"; la composición y proporción de arcillas en ellos permite diferenciarlos en Argiudoles típicos y Argiudoles vérticos, con diferentes propiedades físicas. En el oeste del Gran Buenos Aires, los Argiudoles vérticos se encuentran localizados en las zonas más elevadas del relieve, coronando las lomas más altas, en tanto los Argiudoles típicos se presentan en las pendientes y en las lomas de altura intermedia. Particularmente, los suelos de la Pampa Ondulada, donde se encuentra localizado el AMBA, se caracterizan por su fertilidad y la facilidad para el desarrollo de las actividades agrícolas.

1.5- Interacción entre plaguicidas y el medio

Los productos fitosanitarios se definen como sustancias, agentes biológicos o mezclas de ambos cuyo fin es prevenir, controlar o destruir cualquier organismo nocivo que cause un perjuicio o interferencia negativa en la producción, elaboración o almacenamiento de los vegetales y sus productos (Hughes E, 2005). Estos productos están destinados, por lo tanto, a influir en el proceso vital de los vegetales, mejorar su conservación y destruir, controlar o evitar un crecimiento inadecuado de vegetales inconvenientes (Flores A, 2005)

Cuando un producto fitosanitario es aplicado, existen procesos de transferencia tales como volatilización, disolución, arrastre por escorrentía, etc. que desvían los productos del objetivo inicial (Fig. 1.4). Sin embargo, estos son básicamente procesos de transferencia donde el plaguicida es movido del sitio objetivo sin ninguna alteración en su estructura química. Por otra parte, existen procesos de degradación o rotura donde la estructura química del plaguicida es profundamente alterada o incluso completamente mineralizada a compuestos más simples y no tóxicos.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

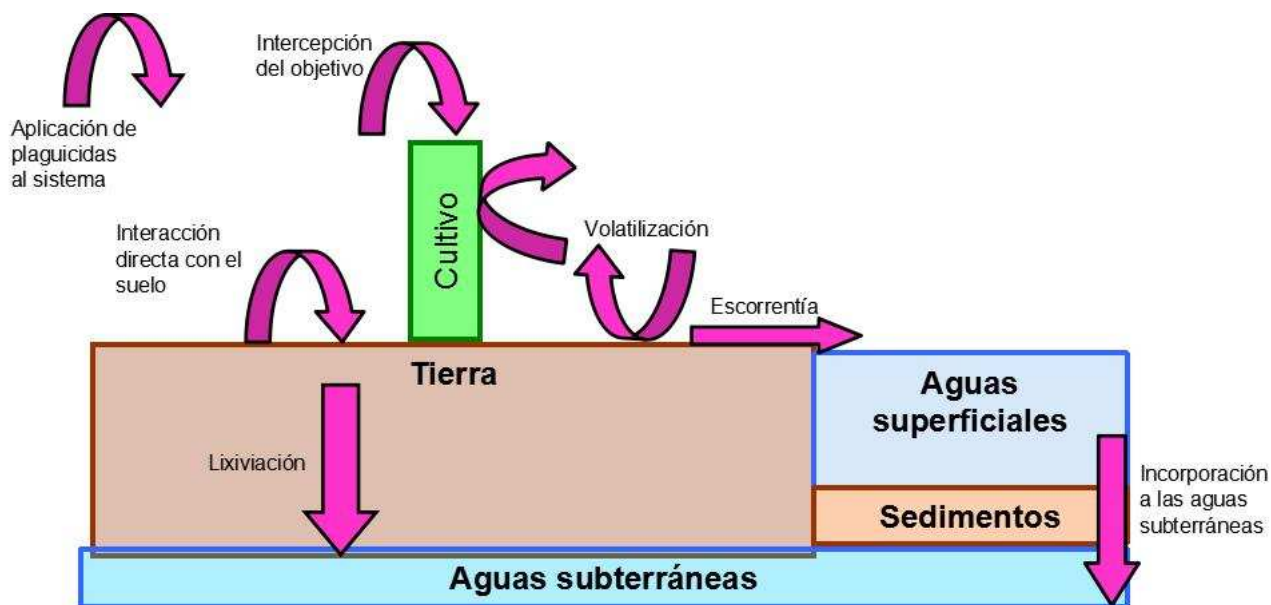


Fig 1.4: Esquema de posibles interacciones y destinos de los plaguicidas al ingresar al medio

Los mecanismos por los cuales estos productos son transformados incluyen los siguientes (Bailey R. et al, 2002):

- Hidrólisis con agua: el agua reacciona con algunos grupos funcionales, por ejemplo los ésteres. En general, la hidrólisis de estos grupos vuelve la parte orgánica más soluble en agua, y más asimilable a la degradación microbiana.

- Reacción en superficies minerales: algunos minerales catalizan la descomposición de estas sustancias, ya sea mediante hidrólisis, reducciones u oxidaciones.

- Fotólisis: las reacciones fotoquímicas ocurren principalmente con los compuestos orgánicos volátiles, pero es importante también para los demás, ya que al rociarse sobre tierra y plantas pueden quedar expuestos a la radiación solar; por su acción pueden oxidarse, isomerizarse, o sufrir otras reacciones de degradación. También existe la degradación fotocatalítica, término utilizado para referirse a los procesos cíclicos de fotodegradación regenerándose de forma espontánea el catalizador que permite que la secuencia continúe indefinidamente hasta que todo el sustrato sea destruido (Burrows et al, 2002).

- Degradación microbiana: el metabolismo de los microorganismos es la fuerza ambiental más poderosa de degradación de compuestos orgánicos. Los microorganismos muchas veces son capaces de destruir compuestos que normalmente no están en el ambiente.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

- Biotransformación: el metabolismo de estos productos ocurre a través de procesos enzimáticos de plantas, debido a que las enzimas son catalizadores que pueden alterar las estructuras de las moléculas una vez incorporadas al organismo vegetal (Juraske R. et al, 2008).

El término disipación se refiere a la reducción de la cantidad de plaguicida que se encuentra en el ambiente, luego de su aplicación; se considera un proceso mediado por factores ambientales abióticos, metabólicos y de translocación. La disipación de sustancias como estas es principalmente controlada por sus propiedades físico-químicas (Ying et al, 2000). La velocidad de disipación de un plaguicida depende de muchos factores como la habilidad del producto para adsorberse a las superficies, sus propiedades físico-químicas, la textura de la superficie y las condiciones climáticas (Ying et al, 2000). Los factores climáticos proporcionan el medio para que las diferentes reacciones se encuentren favorecidas: la temperatura, el viento, la humedad relativa ambiente, régimen de lluvias, entre otros, influyen en la volatilización, el arrastre sobre partículas de polvo y la escorrentía.

1.5.1- Degradación microbiana

Una habilidad intrínseca de los microorganismos es la de degradar gran variedad de compuestos orgánicos. Algunos microorganismos no fotosintéticos dentro de los cuales se encuentra grupo de las *Pseudomonas* pueden consumir distintos compuestos orgánicos. En el ambiente, los microorganismos se hallan en poblaciones donde se puede encontrar mucha variabilidad morfológica y funcional, la acción conjunta de éstos se denomina consorcio. La versatilidad metabólica de los microorganismos en consorcio es más eficiente y difiere mucho de la individual (Stainer et al, 1987)

La degradación microbiana es el resultado del metabolismo de los plaguicidas, que se da cuando estos productos xenobióticos son usados por los microorganismos como fuente de carbono y energía, exclusivamente o junto con otros recursos del suelo (Juraske et al, 2008). Estas reacciones de biotransformación resultan en cambios en las estructuras químicas que son transformadas finalmente en sus constituyentes inorgánicos, es decir, son mineralizados. Durante el proceso, esta biotransformación puede generar, en la mayoría de los casos, moléculas de menores masas moleculares, como por ejemplo en la hidrólisis de grupos éster. La biodegradación es frecuentemente iniciada por una de estas tres estrategias:

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

- 1- Oxidación por una forma electrofílica del oxígeno,
- 2- Reducción por una forma nucleofílica del hidrógeno o un metal reducido
- 3- Hidrólisis.

Las dos primeras no ocurren en forma abiótica debido a que la energía bioquímica es necesaria para formar las especies reactivas. La utilización de energía bioquímica es importante porque estas especies, altamente reactivas, modifican los compuestos orgánicos de forma tal que sean menos tóxicos que los compuestos iniciales, mas polares y/o compatibles con rutas metabólicas centrales para los organismos (Mitchell et al, 2010).

Como consecuencia, por ejemplo para los plaguicidas organoclorados, el primer paso en el proceso degradativo es la deshalogenación reductiva. La misma consiste en la remoción de un sustituyente halogenado por otra especie química. Esta sustitución puede ocurrir en hidrogenólisis, es decir que el sustituyente halogenado es reemplazado por un átomo de hidrógeno, o por dihaloeliminación. Esta última consiste en remover dos sustituyentes halógenos de los carbonos adyacentes mientras se inserta un enlace adicional entre los carbonos. Ambos procesos requieren un donador de electrones que, para la deshalogenación de diferentes compuestos clorados puede ser el hidrógeno (Willey et al, 2014).

Las condiciones ambientales pueden afectar las cinéticas microbianas, entre ellas podemos citar al sustrato y los niveles de nutrientes, temperatura, pH y estructura de la molécula (Mitchell et al, 2010). Por ejemplo, un factor importante que influencia la degradación es la estereoisomería del compuesto; los microorganismos a menudo degradan un isómero y no el otro. Al menos un 25% de los herbicidas son compuestos que presentan centros estereoisoméricos.

Otro aspecto interesante de la degradación microbiana es que eventualmente una comunidad puede volverse eficiente a la degradación de ciertos compuestos orgánicos, si los mismos son agregados repetidas veces. Esta situación puede cambiar las tasas de degradación volviéndolas más rápidas, este proceso es lo que se conoce como aclimatación (Willey et al, 2014).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

1.5.2- Formas de acción de los plaguicidas

Todos los plaguicidas comparten una propiedad común, que es la de bloquear algún proceso metabólico vital de los organismos para los cuales son blanco. A nivel de los organismos vegetales, estos se dividen en productos de contacto o sistémicos. En cuanto a los primeros, no penetran en la planta, su uso en general es preventivo, y existe un amplio espectro de mecanismos de acción. Los sistémicos en cambio penetran en la planta y se redistribuyen por todos sus tejidos, además no sólo son preventivos sino que también son curativos y erradicantes (Evangelou, 1998).

Según su forma de acción específica, los plaguicidas se pueden dividir en insecticidas, herbicidas y fungicidas

1.5.2.1- Insecticidas

La motivación para el uso de estos productos es la prevención de la acción de insectos que ataquen los cultivos de alimentos. Puede ocurrir, sin embargo, que los insectos luego de años de recibir la aplicación de un insecticida determinado, generen resistencia a dicho producto. Esta situación lleva a que, con el uso extensivo de algún insecticida, los cultivos sean igualmente destruidos.

1.5.2.1.1- Insecticidas organoclorados

Se denominan así los productos activos cuyas moléculas contienen átomos de cloro unidos a carbono, sin otro grupo funcional de relevancia (Fig. 1.5). Muchos de ellos comparten varias propiedades notables (Baird, 2004):

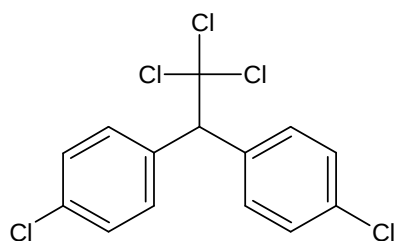
- Estabilidad respecto de la descomposición o degradación en el ambiente
- Muy baja solubilidad en agua, a menos que el oxígeno y el nitrógeno estén también presentes en las moléculas.
- Alta solubilidad en medios hidrófobos, tales como los tejidos grasos de los organismos vivos.
- Relativamente alta toxicidad en los insectos pero baja en los seres humanos

Debido a su estabilidad, toxicidad y afinidad por los entornos hidrófobos, muchos de estos compuestos han sido encontrados en los tejidos de peces, en concentraciones más altas que las de

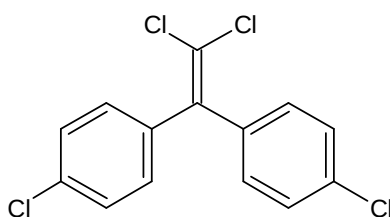
DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

las aguas de las cuales proceden. Hay muchas razones para esta bioacumulación de sustancias hidrofóbicas en los sistemas biológicos. En primer lugar, la mayoría de los organoclorados son inherentemente mucho más solubles en medios hidrocarbonados, como los tejidos grasos de peces, que en agua. Cuando el agua pasa a través de las branquias de los peces, los componentes difunden selectivamente desde ese medio hacia los tejidos grasos del pez donde se acumulan; este proceso es llamado bioconcentración (Baird, 2004).

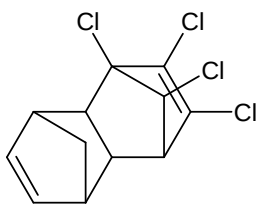


p,p`DDT

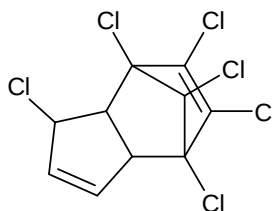


p,p`DDE

Aromáticos

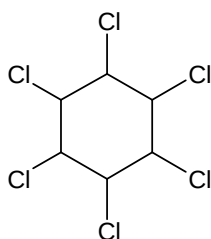


Aldrin



Heptachloro

Clorodienos



Lindano

Cíclico

Fig. 1.5: Ejemplos de insecticidas organoclorados.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

1.5.2.1.2- Insecticidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados constituyen un amplísimo grupo de compuestos de síntesis, en general altamente tóxicos. Éstos son no persistentes por lo cual representan un avance frente a los organoclorados. Estos plaguicidas presentan como característica estructural común un átomo de fósforo pentavalente que se encuentra conectado a (Fig. 1.6):

- 1- Un oxígeno o azufre con enlace doble al átomo de fósforo
- 2- Dos grupos metoxi ($\text{CH}_3\text{-O-}$) o etoxi ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}$) unidos con enlace simple al átomo de fósforo
- 3- Un grupo R más complejo y grande unido por enlace simple al fósforo, usualmente mediante un oxígeno o azufre.

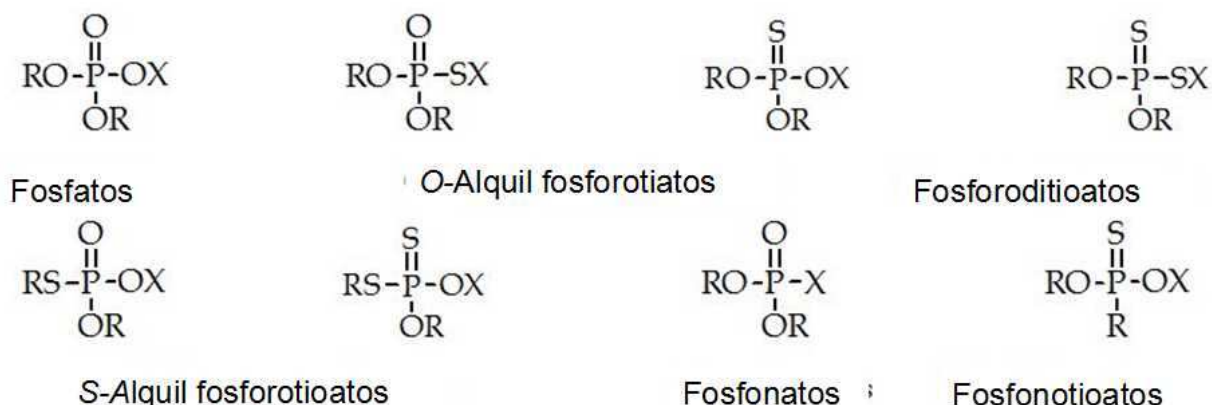


Fig. 1.6: Familia de insecticidas organofosforados

Se trata de compuestos en general marcadamente no polares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en agua, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro, y desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas. Por tal motivo, la piel, donde se encuentra una importante capa de tejido con elevado contenido en lípidos, puede constituirse en una importante vía de entrada de estas sustancias a los organismos animales. La estabilidad de los organofosforados depende del pH del medio; a pH fuertemente alcalino se descomponen, lo que puede ser utilizado para destruirlos.

Los organofosforados son tóxicos para los insectos y animales porque inhiben las enzimas

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

del sistema nervioso. En particular interrumpen la comunicación entre las células mediada por la molécula acetilcolina, provocando que transmisión célula a célula no pueda operar correctamente. En cuanto al modo de acción de este proceso, se sabe que estos plaguicidas se unen selectivamente a las enzimas cuyo trabajo es destruir a la acetilcolina, y por ello bloquean su acción. En consecuencia, se suspende la continua transmisión de impulsos entre las células nerviosas, provocando en el caso extremo la consecuente muerte de los organismos (Stoytcheva, 2011).

1.5.2.2- Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos que afectan a las plantas. Generalmente se utilizan para destruir malezas sin causar daños al cultivo principal.

No existe un solo sistema de clasificación de los herbicidas. Éstos se basan en criterios muy dispares, como su naturaleza química, su mecanismo de acción o su toxicidad. Sin embargo, se puede hacer la siguiente distinción:

Según su persistencia

- Residuales: Se aplican al suelo, sobre la tierra desnuda y forman una película tóxica que controla la proliferación de malezas al atravesarla durante su germinación (Ej.: Terbutilazina).
- No residuales: Se degradan normalmente en poco tiempo, solo actúan sobre las plantas en las que fueron aplicados.

Según su movilidad dentro de la planta

- Sistémicos: Se aplican sobre la planta, se absorbe y al ser traslocado a otras zonas de la planta a través del floema puede afectar a zonas de ella sobre las que el producto no llegó al tratarla. (Ej.: Glifosato).
- De contacto: No se traslocan por el floema por lo que solo afecta a las zonas de las plantas sobre las que caen. (Ej.: Paraquat).

Según la acción sobre las plantas

- Selectivos: Son aquellos herbicidas que respetando el cultivo indicado eliminan las hierbas indeseadas, o al menos, un tipo de ellas. (Ej. metribuzina)
- No selectivos: eliminan una gran gama de familias de plantas (Ej. glifosato).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Según el momento en que debe aplicarse

- De preemergencia: Se aplican antes de la emergencia o germinación del cultivo. (Ej. Terbutilazina)
- De postemergencia: Se aplican después de la emergencia o germinación del cultivo.

Según su naturaleza química, los herbicidas se pueden dividir en (Fig. 1.7) fenoxiacéticos (2,4,5 triclofenoxiacético), carbamatos (Clorprofam), trazinas (atrazina), dinitroanilinas (trifluralina), difeniléteres (bifenox) y sulfoniureas (clorsulfuron).

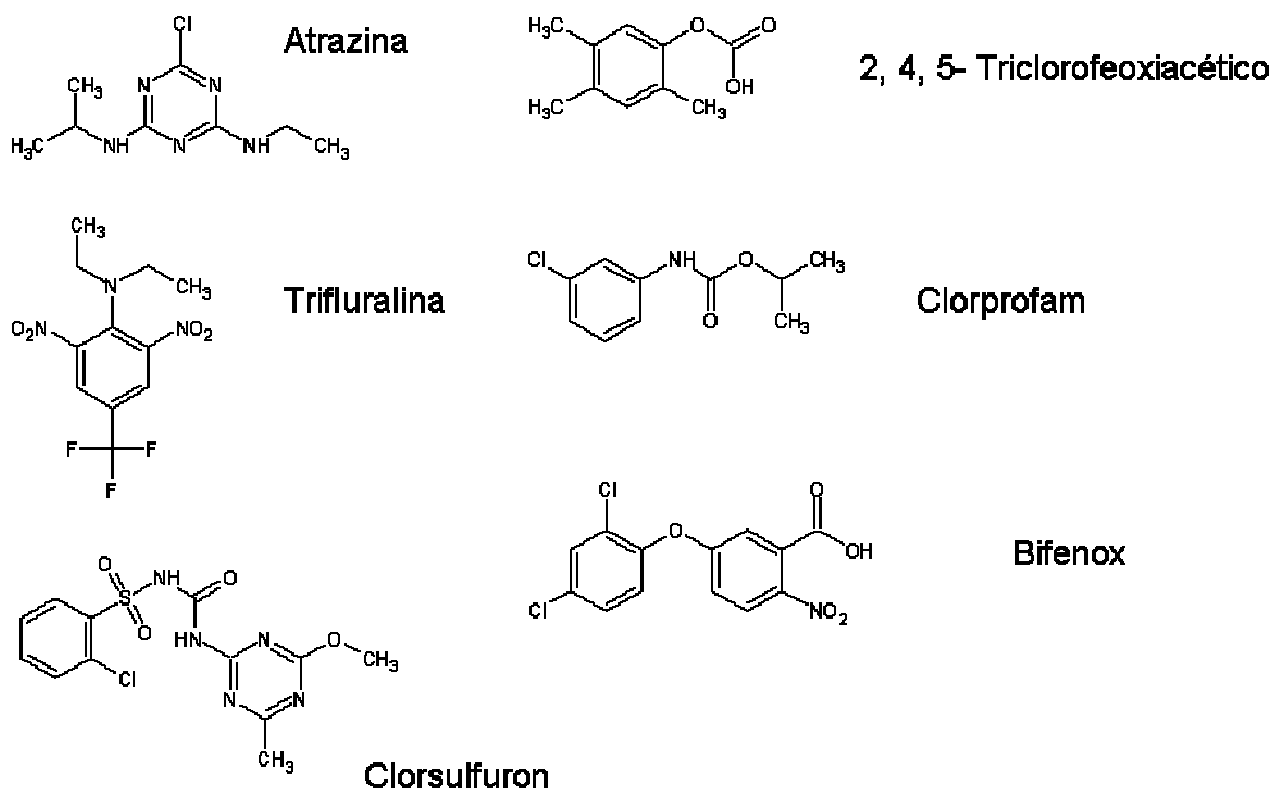


Fig. 1.7: Ejemplos de algunas estructuras de herbicidas según clasificación química

Una familia muy importante de herbicidas es la de las triazinas: su estructura molecular central consiste en una unidad aromática de seis miembros en la cual se alternan carbonos y nitrógenos. Un átomo de carbono del anillo se une a un cloro, y los otros dos a grupos amino (Fig. 1.6). El ejemplo más conocido de este tipo de herbicidas es la atrazina.

Bioquímicamente, la atrazina actúa bloqueando la fotosíntesis en la etapa fotoquímica que inicia la reducción del dióxido de carbono de la atmósfera a carbohidrato. Las plantas más grandes

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

toleran la triazinas mejor que las malezas porque la degradan rápidamente a metabolitos no tóxicos. Sin embargo, si la concentración de triazina aumenta en el suelo se puede llegar a una situación en que las plantas no puedan crecer.

Se sabe que la atrazina puede ser degradada por microorganismos, comenzando con la hidrólisis del cloro. Otra ruta microbiológica conocida involucra la pérdida de un grupo etilo o un isopropilo del amino, reemplazado por un hidrógeno, generando un metabolito que es tóxico para las plantas (Caseley 1996).

1.6- Sorción de productos orgánicos al suelo

Como ya se mencionó, la aplicación de plaguicidas involucra la incorporación de estos productos tanto en la tierra como en los cultivos (Fig 1.3). La interacción con estos objetivos, a su vez, produce el pasaje a otros ámbitos como aguas superficiales, subterráneas y sedimentos. Por otro lado, el producto no incorporado a las plantas o el suelo puede ser volatilizado y de esta forma salir del sistema suelo-planta.

Cuando los plaguicidas se encuentran dentro de la matriz suelo, pueden sufrir dos procesos producto de la complejidad de esta matriz. Por un lado, pueden degradarse mediante la acción de los microorganismos los cuales utilizan estos productos orgánicos como sustrato para su metabolismo (Arias Estevez et al, 2008). Este mecanismo fue mencionado en la sección 1.5.1.

Por otro lado, los plaguicidas pueden interactuar con las partículas de suelo de modo que queden retenidas en la matriz mediante procesos de sorción. Los términos adsorción y absorción denotan la remoción de una especie química desde una solución a una superficie. La distinción entre los dos términos está basada en los mecanismos responsables de esa remoción. Cuando una molécula de gas o líquido se encuentra con una superficie sólida, puede quedar fijada sobre ella, es decir, sufrir adsorción (Gao et al, 1997). Por otro lado, la molécula adsorbida puede difundirse (moverse) sobre la superficie, quedarse fija, sufrir una reacción química o disolverse en el interior del sólido (proceso conocido como absorción y del que es un conocido ejemplo el empleo de CaCl_2 anhidro como desecador: el agua de la atmósfera es primero adsorbida y a continuación absorbida para formar un hidrato). Sabiendo esto, se define como adsorción al proceso de unión de una molécula procedente de otra fase sobre la superficie de un sólido; y desorción al proceso inverso a la adsorción. También se utiliza el término sorción, para nombrar aquellas situaciones en las que

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

no se conoce (o no interesa) el mecanismo preciso involucrado en la retención de la molécula en el sólido.

Los procesos de sorción y desorción tienen una profunda influencia en la persistencia de los plaguicidas, a través del control de la velocidad de los procesos de disipación específicos como la volatilización, biodegradación, fotólisis e hidrólisis. Se ha reportado que la adsorción impide la degradación de varios productos químicos, aparentemente porque reduce el acceso de los microorganismos a los productos sorbidos (Arias Estevez et al, 2008)

La adsorción es uno de los procesos clave que afectan el destino final de los plaguicidas en el suelo. Es un proceso que da cuenta de cómo el suelo retiene dicha sustancia, y es interpretado como la acumulación del plaguicida en la superficie de las partículas de suelo. En particular, depende de las interacciones en la interface entre los coloides orgánicos e inorgánicos del suelo y los plaguicidas, afectando su disponibilidad para las plantas o el aprovechamiento por los microorganismos, así como la posibilidad de que sean transformados por agentes bióticos o abióticos. Para muchos plaguicidas, el contenido de materia orgánica del suelo es la propiedad más importante para controlar el grado de adsorción (Gao et al, 1997).

Los procesos de sorción están vinculados con los de degradación. La degradación reduce la presencia de los productos tal y como fueron aplicados dado que los microorganismos transforman estos compuestos. Por otro lado la sorción hace que los plaguicidas puedan quedar unidos covalentemente al material húmico del suelo, y sean por lo tanto menos accesibles a los microorganismos (Arias Estévez, 2008), aumentando entonces la persistencia de los mismos en el medio

1.7 Plaguicidas utilizados en los ensayos

1.7.1- Clorpirifós

Clorpirifós (nombre IUPAC: *O,O*-dietil-*O*-3,5,6-tricloropiridin-2-il-fosforotioato) (Fig. 1.8) es un insecticida organofosforado que inhibe la acetilcolinesterasa. Se lo comercializa bajo muchas formulaciones diferentes, con distintos nombre comerciales, por ejemplo Lorsban. El clorpirifós es moderadamente tóxico para los seres humanos y la exposición crónica se ha relacionado con efectos neurológicos, trastornos del desarrollo y trastornos autoinmunes.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

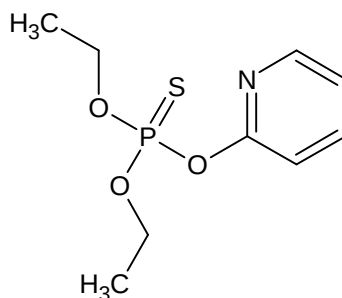


Fig. 1.8: Estructura de la molécula de clorpirifós

No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales. También se puede aplicar en forma de cápsulas. Este insecticida se comercializa normalmente en forma de una emulsión donde el plaguicida se halla en una concentración del 23,5% o 50% (p/v). La concentración recomendada en EE.UU. para la aplicación por pulverización directa es de 0,5% y para la aplicación en zona amplia 0,03 – 0,12%. En agricultura se utiliza bajo forma de rocío para el control de plagas de cosechas (cochinillas, moscas blancas, trips de la platanera, numerosas orugas desfoliadoras y minadoras, algunos escarabajos y otros insectos). Los cultivos en los cuales se utiliza son, entre otros, soja, maíz, girasol, alfalfa, algodón, tabaco, ciruelo, durazno, damasco y pelón.

El clorpirifós presenta toxicidad aguda en cantidades mayores a las recomendadas y efectos neurológicos en el feto y los niños, incluso en cantidades muy pequeñas. Para los efectos agudos, la EPA clasifica el clorpirifós como Clase II: moderadamente tóxico. Fue probado que los niños expuestos al clorpirifós en el útero tienen un mayor riesgo de retrasos en el desarrollo mental y motor a los tres años y una mayor incidencia de trastornos generalizados del desarrollo como el TDAH (trastorno por déficit de atención con hiperactividad) (Rauh et al, 2006).

La DL50 oral para el clorpirifós en animales de experimentación es de 32 mg / kg a 1000 mg / kg. La DL50 por vía cutánea en ratas es superior a 2000 mg / kg y de 1000 mg / kg a 2000 mg / kg en conejos. La CL50 por inhalación de 4 horas para el clorpirifós en ratas es superior a 200 mg/m3 (Whyatt et al, 2004).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

1.7.2 Procimidone

El procimidone es un fungicida que pertenece a la familia de las dicarboximidas. Su nombre IUPAC es *N*-(3,5-diclorofenil)-1,2-dimetilciclopropano-1,2-dicarboximida (Fig. 1.9).

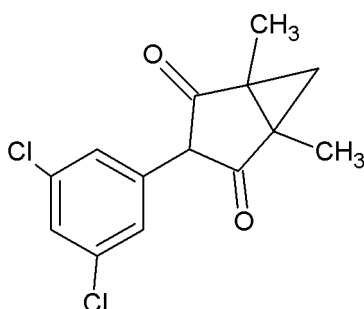


Fig. 1.9: Estructura de la molécula de procimidone

Este fungicida tiene acción específica para el control de las enfermedades provocadas por los géneros de hongos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis*, actuando preventivamente inhibiendo la germinación de las esporas y bloqueando el micelio; y curativamente frenando la propagación del hongo (Guía SATA, 2013).

La *Botrytis cinerea* es una importante plaga, que afecta un gran número de cultivos, como frutilla, cebolla, lechuga, vid y florales, produciendo podredumbres que causan pérdidas tanto en la calidad como en el rendimiento. Por otra parte, la *Sclerotinia sclerotiorum* ataca severamente el cultivo de poroto y prácticamente todas las hortalizas. En girasol, produce serios daños en la producción de semilla y castigos en la comercialización del grano (Tenesaca Campos, 2010).

Uno de los productos comerciales que contiene como principio activo el procimidone es el Sumilex, en formulados tanto líquido como polvo. Este producto ejerce un control de las cepas resistentes a los benzimidazoles y su formulación es muy estable al lavado por lluvias. Entre otros formulados comerciales que contiene procimidone se pueden encontrar Produe 50 SC y Sialex 50 SC.

1.7.3- Trifluralina

La trifluralina es un producto utilizado como herbicida. Su nombre IUPAC es 2,6-Dinitro-*N,N*-dipropil-4-(trifluorometil)anilina (Fig 1.10). Se aplica en un amplio rango de cultivos, como las brassicas, zanahorias, lechuga, frutilla y caña de azúcar.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

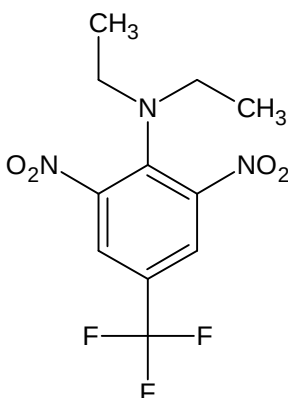


Fig. 1.10: Estructura de la molécula de trifluralina

Se presenta en forma de cristales amarillos anaranjados, fundiéndose a temperatura ambiente. Se evapora con facilidad ya que su presión de vapor (25 °C) es 0,014 Pa. No es soluble en agua, pero se disuelve fácilmente en disolventes orgánicos (PPDB: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/667.htm>).

Esta sustancia puede absorberse por inhalación. Una exposición de corta duración puede producir irritación ocular, y el contacto prolongado o repetido con la misma puede producir sensibilización de la piel. Su toxicidad es baja para mamíferos y aves. Por el contrario, los peces y otros organismos acuáticos son altamente sensibles a la trifluralina, así como las abejas y otros insectos. En la cadena alimentaria referida a los seres humanos tiene lugar bioacumulación, concretamente en peces. Puede persistir en el terreno de seis a ocho meses, aunque se descompone rápidamente en condiciones anaerobias, proceso catalizado por la luz ultravioleta. Este producto podría causar efectos prolongados en el medio ambiente (EPA, 1996).

1.7.4- Atrazina

La atrazina es un herbicida de la familia de las triazinas (Fig 1.11), su nombre IUPAC es 1-Cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina. Este herbicida es utilizado para prevenir las malezas de hoja ancha de pre y post-emergencia en cultivos como el maíz y la caña de azúcar, canola resistente a la triazina, y en el césped, en situaciones como campos de golf y céspedes residenciales.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

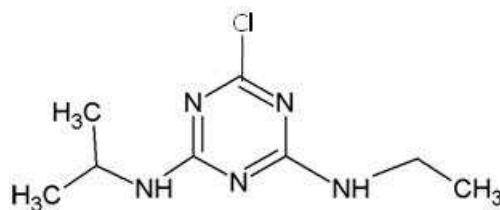


Fig. 1.11: Estructura de la molécula de atrazina

La acción de este herbicida produce la muerte de la planta, como resultante de la interrupción del proceso de transporte de electrones, lo que lleva a falta de nutrición y estrés oxidativo; este efecto se acelera a alta intensidad de luz. Los efectos de la atrazina en seres humanos y animales implican principalmente la afección del sistema endócrino: los estudios sugieren que la atrazina es un disruptor endócrino que puede causar desequilibrios hormonales.

En relación con su efecto en el ambiente, la atrazina permanece en el suelo durante unos meses (aunque en algunos suelos pueden persistir por lo menos 4 años) y puede migrar del suelo al agua subterránea donde se degrada lentamente. Se degrada en el suelo principalmente por acción de los microorganismos (Fig 1.12), con una vida media en el suelo que varía desde 13 hasta 261 días; las vías de biodegradación se pueden dar en dos pasos (Zeng et al, 2004):

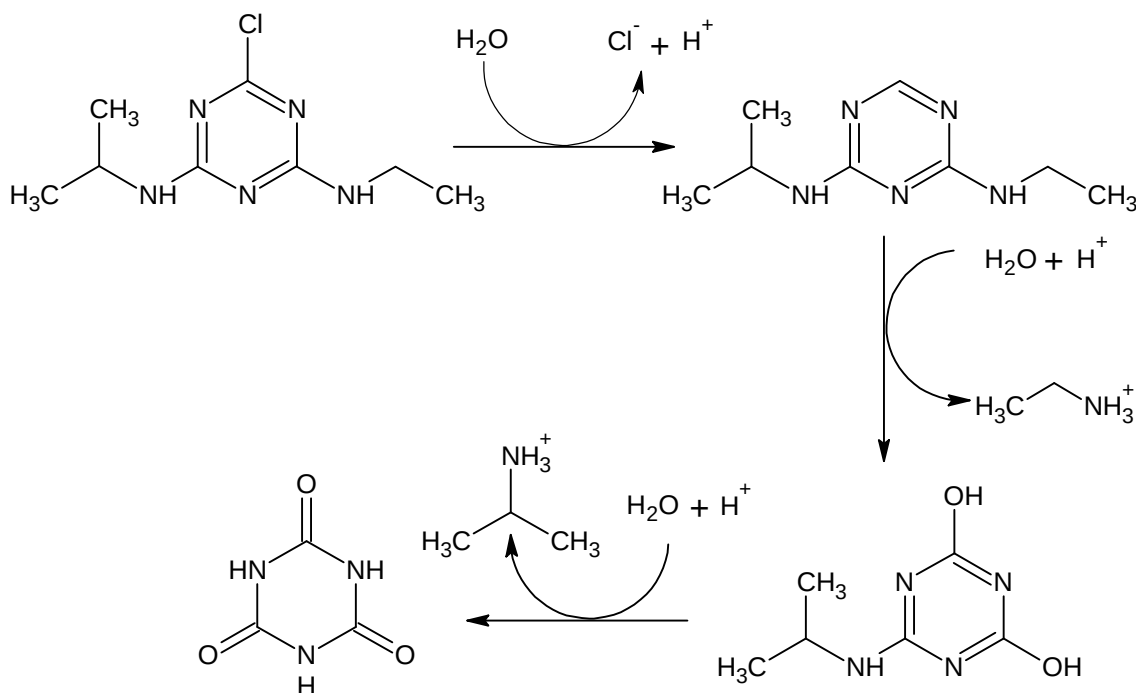


Fig. 1.12: ruta degradativa para la atrazina mediada por microorganismos

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

1. La hidrólisis del enlace C-Cl, seguido por los grupos etilo e isopropilo, catalizadas por las enzimas hidrolasas llamadas AtzA, AtzB, y AtzC. El producto final de este proceso es el ácido cianúrico. Los organismos mejor caracterizados que utilizan esta vía son de *Pseudomonas* sp. colar ADP.

2. La desalquilación de los grupos amino para dar 2-cloro-4-hidroxi-6-amino-1,3,5-triazina, la degradación de los cuales es desconocida. Esta ruta también se produce en especies de *Pseudomonas* y otras bacterias.

Aunque los dos restos alquilo son metabolizados fácilmente por ciertos microorganismos, el anillo de atrazina es una fuente de energía pobre. De hecho, la vía más común para la degradación implica que la atrazina, cuyo intermediario es el ácido cianúrico, se oxida completamente, por lo que el anillo resulta ser principalmente una fuente de nitrógeno para microorganismos aerobios (Crawfor et al, 1998). La atrazina puede ser catabolizada como fuente de carbono y nitrógeno, y algunos microorganismos aeróbicos degradadores de atrazina pueden utilizar el compuesto para el crecimiento bajo anoxia en presencia de nitrato como aceptor de electrones, un proceso referido como desnitrificación. Cuando se utiliza atrazina como fuente de nitrógeno para el crecimiento bacteriano, la degradación puede ser regulada por la presencia de fuentes alternativas de nitrógeno. En cultivos puros de bacterias, así como también poblaciones activas en el suelo que degradan atrazina, se asimila el nitrógeno del anillo de la molécula, pero no el carbono. Las bajas concentraciones de glucosa pueden disminuir la biodisponibilidad, mientras que las concentraciones más altas promueven el catabolismo de la atrazina (Wackett et al, 2002).

1.7.5- Endosulfán

El endosulfán es un insecticida y acaricida organoclorado. El nombre IUPAC del endosulfán es 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-oxido. Es un insecticida ciclodieno (Fig. 1.13), químicamente similar a aldrin, clordano, y heptacloro. Este plaguicida es una mezcla de estereoisómeros, designados " α " y " β ," en una relación 7:3. Los isómeros α - y β -endosulfán son conformacionales, y pueden ser interconvertidos sin romper los enlaces. El α -Endosulfán es termodinámicamente más estable, y β -endosulfán se convierte lenta e irreversiblemente a la forma α a lo largo del tiempo. (Schmit et al, 1997)

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

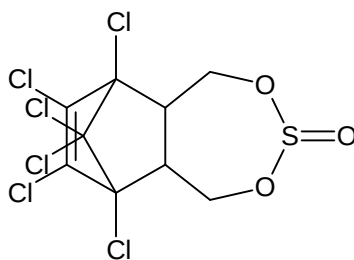


Fig. 1.13: Estructura de la molécula de endosulfán

El endosulfán se descompone por acción microbiana en endosulfán sulfato y endosulfán diol (Fig 1.13), ambos, según la EPA, tienen "estructuras similares al compuesto parental y también tienen interés toxicológico. La vida media estimada para los residuos tóxicos combinados (endosulfán más endosulfán sulfato) varía desde 9 meses a 6 años (EPA, 2002).

El endosulfán se ha usado en agricultura alrededor del mundo para controlar plagas de insectos incluyendo moscas blancas, áfidos, langostas, escarabajo de la papa, gusano de la col. También se ha usado en la preservación de maderas, jardinería, y control de la mosca Tse-Tse, aunque no es corrientemente usado con propósitos de salud pública (World Health Organization, 1984)

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Este insecticida es un neurotóxico agudo para insectos y mamíferos, incluyendo a los humanos. La clasificación de la EPA es de Categoría I: "Alta toxicidad aguda" basada en un valor de DL_{50} media de 30 mg/kg para ratas hembras, mientras que la Organización Mundial de la Salud lo clasifica como Clase II "Moderadamente riesgoso" basado en un valor de DL_{50} de 80 mg/kg en ratas (EPA, 2002). La dosis de referencia aguda de la EPA para exposición al endosulfán es 0,015 mg/kg para adultos y 0,0015 mg/kg para niños. Para exposición crónica, las dosis de referencia de la EPA son 0,006 mg/(kg·día) y 0,0006 mg/(kg·día) para adultos y niños, respectivamente.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Capítulo 2: **Materiales y métodos**

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

2.1- Materiales

2.1.1- Plaguicidas

Se utilizaron los siguientes productos comerciales:

- Procimidone: (3-(3,5-diclorofenil)-1,5-dimetil-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-2,4-diona, CASRN [32809-16-8]), Sumilex[®] (CS, 50% p/v, Summit Agro Argentina)
- Clorpirifós: (0,0- dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato, CASRN [2921-88-2]), Lorsban[®] (EC, 48% p/v, Dow AgroSciences)
- Trifluralina (α,α,α trifluoro-2,6-dinitro-*N*, *N*-dipropil-p-toluidina), trifluralina: CASRN [1582-09-8], Trigermin[®] (CS, 48% p/v, Cheminova)
- Endosulfán: (hexacloro-endometileno-biciclohepteno-bis(oximetileno)sulfito, CASRN [115-29-7]), Thionex[®] (EC, 35%p/v, Makhteshim).
- Atrazina: (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina, CASRN [1912-24-9]), muestra Agrofina S.A. (polvo mojable 95% pureza)

Los patrones de cada plaguicida fueron preparados a partir de los productos comerciales, extraídos y recristalizados en el laboratorio. Su identidad fue confirmada por RMN-¹H y -¹³C. Se prepararon soluciones madre de cada producto en ciclohexano, de concentraciones entre 1500 mg/L – 2900 mg/L. Los solventes utilizados fueron ciclohexano (Aberkon grado p.a.) y acetona (Aberkon grado p.a.) destilados, su pureza fue confirmada mediante la inyección de los solventes en el cromatógrafo gaseoso en las condiciones de análisis de los plaguicidas estudiados, y la observación del perfil cromatográfico resultante.

A modo de ejemplo se incluye el protocolo para la extracción de trifluralina, realizado para este trabajo:

Para extraer el principio activo se utilizó el producto comercial Trigermin y se realizó una columna de cromatografía utilizando aproximadamente 200 g de sílica gel. Se sembraron en la columna 10 mL de Trigermin y se utilizó como solvente de corrida ciclohexano: acetato de etilo 99:1. Se colectó el producto corrido en tubos de ensayo que fueron desarrollados en ccd utilizando un patrón de trifluralina con ciclohexano: acetato de etilo 1% y revelado por lámpara UV. Los tubos que coincidieron con el revelado del patrón se mezclaron y el contenido se rotaevaporó con bomba

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

de agua y luego la mezcla se purificó por recristalización con etanol. La identidad del producto obtenido se comparó con un patrón cuya identidad estaba confirmada como trifluralina, a partir de cromatografía en capa delgada.

2.1.2- Medios de cultivo para microbiología

Medio mínimo (M9)

K_2HPO_4 7,3 g/L

KH_2PO_4 3,0 g/L

NH_4Cl 1,0 g/L

$MgSO_4$ 0,1202 g/L

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01M

PyG

Peptona 2,5 g/L

Extracto de Levadura 1,25 g/L

Glucosa $\cdot 1H_2O$ 0,55 g/L

Agar para Recuento (PCA)

Peptona de caseína 5,0 g/L

Extracto de Levadura 2,5 g/L

D(+)-glucosa 1,0 g/L

Agar-agar 14,0 g/L

2.1.3- Equipos e instrumentos

Los equipos utilizados en los diferentes ensayos fueron:

- Lavador ultrasónico TB04. Testlab S.R.L.
- Balanza analítica Adventurer Ohaus capacidad 110g +/- 0,0001
- Balanza granataria AND 1200g +/- 0,1g

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

- Agitador orbital Ferca con campana de acero inoxidable y vidrio con temperatura termostatzada mediante caloventor controlado
- Shaker orbital con temperatura controlada Scientifica S.A.
- Cromatógrafo gaseoso Perkin-Elmer (Norwalk CT, USA) AutoSystem.
- Sonda multiparamétrica Horiba, Water Quality Checker U10
- pHímetro portátil Hanna HI8424, calibrado con soluciones buffer: "BX 1628-1 solution tampon rouge pH 4,00 EM Science" y "BX 1633-1 buffer solution blue pH 10,00 EM Science"
- Espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20. Lectura directa, no se utilizó el software asociado.
- Sistema de posición geográfica (GPS) eTrex vista C, Garmin
- Jeringas Hamilton de 250 y 500 µL y Perkin Elmer de 50 µL
- Pipetas automáticas Eppendorf de 1000 µL y 100 µL y Oxford Labware de 5mL
- Mufla ORL hornos eléctricos

2.1.4- Valoración de reactivos: ensayo de biomasa microbiana

Para valorar el NaOH y el HCl se siguió el siguiente protocolo (Vogel, 1960):

Valoración NaOH con ftalato ácido de potasio

El ftalato de potasio debe secarse a 120 °C durante por lo menos 2 horas y dejarlo enfriar en un desecador.

Se pesa por triplicado el ftalato en un erlenmeyer y se agregan 10 mL de agua destilada con 2 gotas de indicador ácido base (para este caso se utilizó fenolftaleína). Luego, se titula la solución con NaOH. Se realiza el siguiente cálculo:

$$(\text{Vol NaOH} \times \text{Conc NaOH})_{(g)} / 1000\text{ml/L} = m \text{ ftalato} / |M_R \text{ ftalato}|$$

$$\text{Conc NaOH} = m \text{ ftalato} / |M_R \text{ ftalato}| \times (1000\text{ml/L}) / \text{Vol NaOH}$$

Se promedian los resultados de las concentraciones obtenidas para las tres réplicas.

Valoración del HCl con NaOH

Una vez valorada la base, se procede a valorar el ácido:

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Se vierten 10,00 mL de NaOH en un erlenmeyer junto con 2 gotas de fenolftaleína; este procedimiento se realiza por triplicado. Luego, se titula el NaOH con HCl :

$$\text{Conc HCl} = (\text{Vol NaOH} \times \text{Conc NaOH}) / \text{Vol HCl}$$

Se promedian los valores obtenidos en las tres réplicas.

2.2 Metodología

Las muestras de suelo fueron extraídas de una huerta de producción de frutas y verduras ubicada en Cuartel V, Partido de Moreno, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Para llevar a cabo los muestreos, se realizó un relevamiento de la huerta mediante la toma de coordenadas geográficas "*in-situ*" con un sistema de posicionamiento global (GPS) y se elaboró un plano de la huerta (Fig 2.1). Los polígonos se delimitaron de acuerdo a las separaciones más importantes entre los campos. Es decir, como se ve en el Fig. 2.1, dado que la huerta no era un terreno continuo, se consideraron como polígonos las porciones más grandes en extensión de tierra separadas por las calles más anchas de acceso a los campos; entre el polígono 1 y el 3 la separación fue un campo cuyo arrendatario era diferente al productor con el que se trabajó para este trabajo. Se consideraron como secciones a los sectores dentro de cada polígono que fueron delimitados de acuerdo a las calles internas y senderos utilizados por los mismos productores para recorrer el campo. Los puntos de muestreo dentro de cada sección fueron elegidos al azar, en total se fijaron 20 puntos constituyendo el esquema de muestreo espacial.

Las muestras de suelo tomadas como referencia se encontraron en un campo aledaño, al sudeste de los polígonos correspondientes a campo hortícola. Este campo aledaño, no era utilizado para la producción sino que presentaba características de no haber recibido ningún tipo de perturbación. Según lo dicho por el productor del campo hortícola con el que se trabajó, este terreno de "referencia" llevaba al menos 20 años sin perturbación por producción. Dentro de ese campo se recogieron dos tipos de referencias, dado que ese terreno poseía una aglomeración de árboles de eucalipto importante, se tomaron muestras provenientes de debajo de esa aglomeración que se llamó "eucalipto" o Rf2. Por otro lado, las muestras definidas como "referencia" o Rf1, fueron extraídas del límite más alejado de la huerta estudiada y fuera de la aglomeración de eucaliptos.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

En todas las campañas de muestreo, la tierra fue extraída hasta una profundidad de 10 cm y colocadas en bolsas individuales de polietileno, para su traslado al laboratorio. Cada bolsa individual fue rotulada según el lugar de extracción de la muestra utilizando la nomenclatura del mapa. La cantidad de tierra colectada por campaña fue entre 0,5 kg y 1 kg por punto.

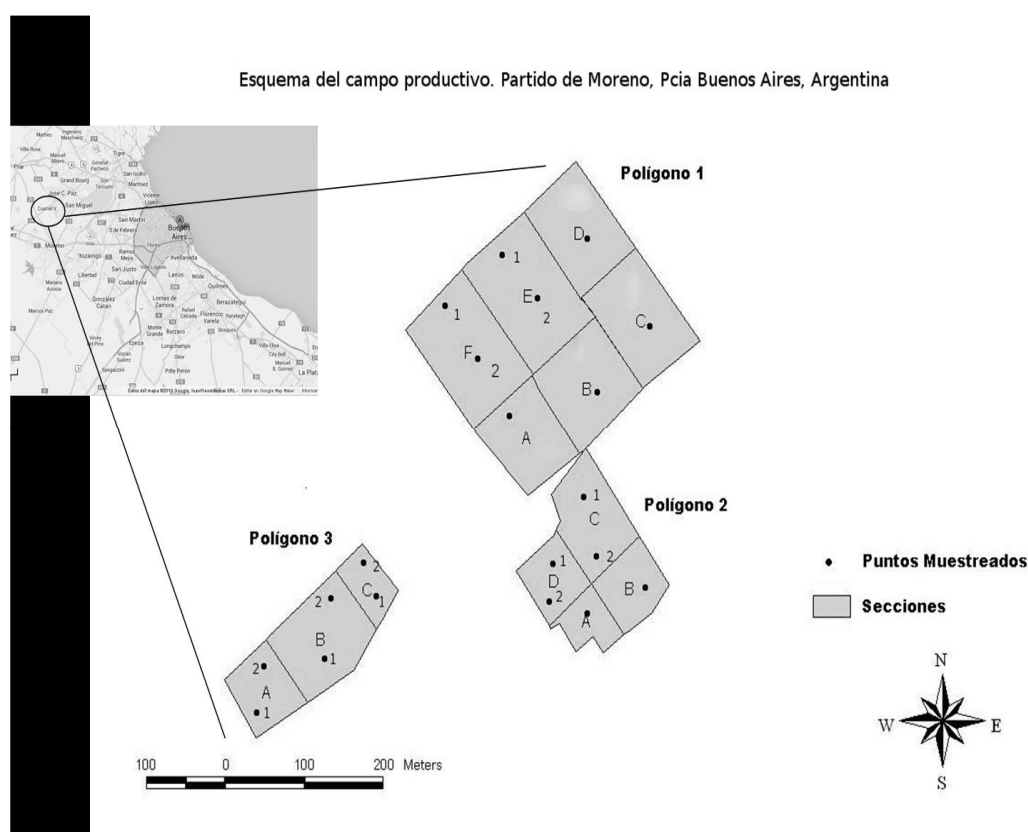


Fig 2. 1 plano de la huerta muestreada

2.2.1- Acondicionamiento de muestras

Luego de tomar las muestras e identificarlas de acuerdo a su ubicación en el mapa, la tierra fue secada al aire en el laboratorio, de 24 h a 48 h. dependiendo de la humedad ambiente, y luego tamizada (malla: 2,8 mm); se consideraron listas para realizar los estudios al llegar a una humedad de aproximadamente 20%. Todos los ensayos realizados fueron hechos con las muestras tamizadas. A excepción del estudio de densidad aparente para el que se utilizó un sacabocado para la toma de muestras.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

2.3-Determinación propiedades biológicas, químicas y físicas de las muestras

Para caracterizar el suelo de la huerta, se realizaron muestreos en las diferentes secciones (Fig. 2.1) para clasificar las parcelas según sus propiedades físicas, químicas y biológicas, en función de su ubicación dentro del lote productivo, y de la época del año.

Se realizó un muestreo espacial para el cual se trabajó con veinte puntos, los cuales fueron caracterizados e identificados, además de los suelos usados como referencias o controles. La hipótesis de esta parte del trabajo era que podrían existir diferencias entre las secciones de la huerta producto del tratamiento que los diferentes cultivos deben recibir para su producción así como también por la rotación de los cultivos.

Por otro lado, el muestreo temporal se realizó con nueve puntos localizados según la Fig.2.2. El motivo de esta etapa consistía en observar si las propiedades biológicas, físicas y químicas en cada punto se alteraban considerablemente de acuerdo a la estación del año, en particular, al variar el clima y los estadios de los cultivos.

2.3.1- Muestreo espacial

Considerando el mapa de muestreo realizado (Fig. 2.1) y la distribución de los polígonos descrita previamente, se tomaron alrededor de 500 g de tierra de cada punto.

Una vez en el laboratorio, el acondicionamiento de las muestras fue como se describió en la sección 2.2.1 de este capítulo. Este acondicionamiento fue utilizado para todos los ensayos a excepción de densidad aparente; en este caso las muestras no fueron tamizadas porque el objetivo era mantener la estructura del suelo. Luego de estar en condiciones apropiadas, se le realizó a cada muestra los ensayos de caracterización que se describirán en la sección 2.3.3.

2.3.2- Muestreo temporal

Para poder estimar las variaciones en el tiempo de las propiedades biológicas, físicas y químicas, se elaboró un segundo esquema de puntos de muestreo (Fig. 2.2). Esta nueva distribución redujo la cantidad de sitios de muestreo, de veinte puntos a nueve más los correspondientes a los suelos de referencia. Se realizaron mediciones en forma estacional: t_1 :

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

primavera, octubre de 2010; t_2 : otoño, mayo de 2011; t_3 : invierno, agosto de 2011.

Los suelos fueron tratados como se mencionó en la sección 2.2.1, tras lo cual se realizaron los ensayos para caracterizarlas.

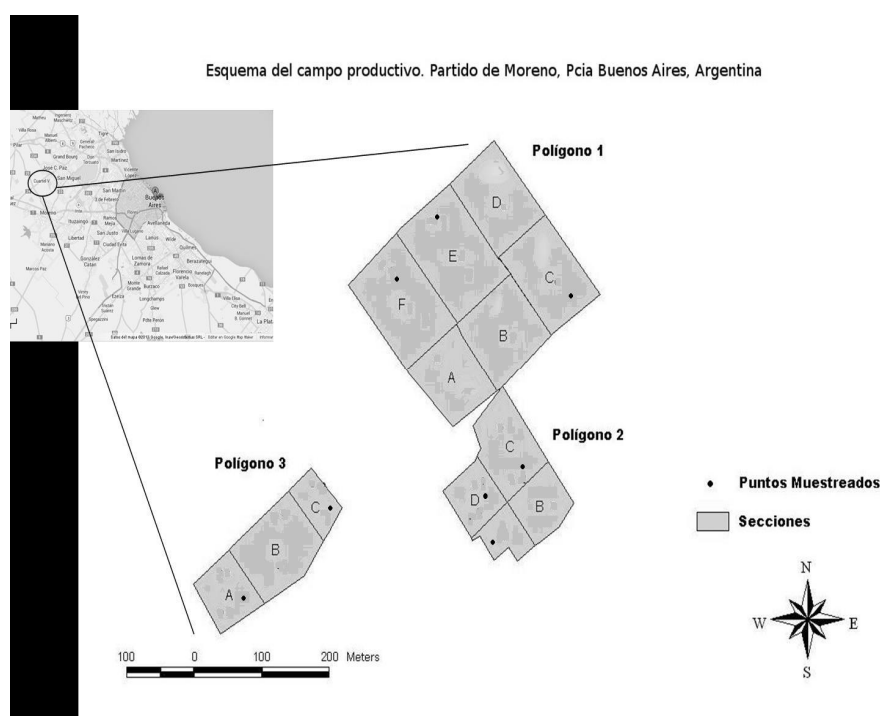


Fig 2. 2 Plano de la huerta, sitios utilizados para el muestreo temporal

2.3.3- Caracterización física química y biológica de las tierras

2.3.3.1- Densidad Aparente

Para su determinación, se extrajo un cilindro de suelo utilizando un sacabocado de 2,5 cm de diámetro interno por 6 cm de alto. La altura del cilindro resultante de suelo variaba entre 1,5 cm y 6 cm dependiendo de la humedad del suelo. Una vez en el laboratorio, se pesó el cilindro con balanza analítica y se midió su altura. Con estos datos se determinó la densidad aparente según la ecuación 1.1.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Ecuación 1.1

$$\delta = \frac{\text{masa}}{\pi h r^2}$$

Donde

δ : densidad aparente

h : altura del cilindro

r : radio del cilindro

Esta determinación se realizó en el muestreo espacial.

2.3.3.2- *Humedad*

El porcentaje de humedad, una vez que las muestras fueron secadas al aire, fue medido referido al peso seco. Se pesó una cantidad de tierra entre 5 g y 7 g aproximadamente y se llevó a 105°C en estufa durante una noche. Luego de sacar las muestras de la estufa y enfriarlas en un desecador, fueron pesadas nuevamente a temperatura ambiente. La diferencia entre el peso inicial y el de las tierras luego de sacarlas de la estufa corresponde a la cantidad de agua presente en la muestra, a partir de la cual se calculó el porcentaje de humedad. Este porcentaje es el que se utilizó en el resto de los ensayos para normalizar los valores.

2.3.3.3- *Porcentaje de Materia Orgánica*

Para determinar el porcentaje de materia orgánica en las tierras de la huerta, se utilizó el método de ignición (Nelson, et al, 1996). Se calentó una muestra de suelo de peso conocido, secada previamente a 105°C en estufa, durante 12 h a 400°C en una mufla, tras lo cual fue enfriada en un desecador y vuelta a pesar. La diferencia de esos pesos corresponde al contenido de materia orgánica perdido. El porcentaje de materia orgánica se calculó referido a tierra seca a 105°C.

2.3.3.4- *Retención de agua*

Se pesó una cantidad conocida de tierra, entre 35 g y 45 g. La tierra se colocó en un embudo Büchner con papel de filtro previamente cortado y humedecido para fijarlo en posición. A este sistema, dentro del embudo, se le agregaron 50 mL de agua destilada y se dejó escurrir por

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

gravidad, cubierto por un film plástico para evitar pérdidas de humedad durante 24 h. Se recogió el líquido escurrido en una probeta, registrando durante las primeras ocho horas, cada dos horas aproximadamente, el volumen que atravesó la columna de tierra, luego se registró el volumen al cumplir las 24 h. La diferencia de volumen entre el agua tomada al final de la experiencia y la inicialmente incorporada es la cantidad de agua retenida por ese suelo. El resultado se informa como mL de agua retenida/g de suelo seco.

2.3.3.5- Conductividad y pH

Para realizar ambos ensayos, se suspendieron 200 g de cada tierra en 600 mL de agua destilada. De esta forma con una misma suspensión se pudieron realizar las dos mediciones.

En el caso de la medición de conductividad, se utilizó la sonda multiparamétrica Horiba. El instrumento se calibró con soluciones de KCl 0,005 M, 0,05 M y 0,5 M preparadas en el laboratorio para la experiencia.

Para la medición de pH, se utilizó un electrodo de vidrio: $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2, \text{KCl}_{(\text{sat})}$ // solución de prueba/ vidrio/ 0,1 M HCl, AgCl/ Ag. La calibración del equipo se realizó con dos soluciones buffer, una a pH=4 y otra a pH=7 (ver sección de materiales).

2.3.3.6- Determinación de fósforo total

El método utilizado es una adaptación del método de Bray y Kurtz (1945) el cual se basa en la reacción del ión fosfato con molibdato que da lugar a fosfomolibdato. Éste, por reducción, origina un compuesto denominado azul de molibdeno que se puede medir espectrofotométricamente.

Para llevar a cabo la experiencia, se pesaron 5 g de suelo previamente tamizado, se realizó una extracción ácida utilizando 20 mL de una mezcla HCl 0,5 M y H_2SO_4 0,0125 M. La suspensión se agitó 5 min en un agitador orbital, y se filtraron 15 mL del sobrenadante a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro. Al filtrado se lo hizo reaccionar con 5,00 mL de una solución de molibdato de amonio (12% m/v) y 3,00 mL de solución reductora (ac. ascórbico 1% p/v) y se lo llevó a un volumen final de 50,00 mL. La mezcla se homogeneizó y se la

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

dejó reposar 6 minutos. La reacción produce una coloración azul que es medida espectrofotométricamente a 660 nm.

En paralelo se realizó la curva de calibrado utilizando una solución madre de K_2HPO_4 50,8 ppm. En matraces de 50 mL se pipeteó la cantidad adecuada de disolución patrón de fosfato. A continuación se añadieron los 5,00 mL de molibdato y 3,00 mL de la disolución reductora, se siguió el mismo procedimiento detallado anteriormente. En el caso de esta experiencia el rango de calibración fue de 0 a 5 ppm (Fig. 2.3).

Calibrado ensayo de fósforo total

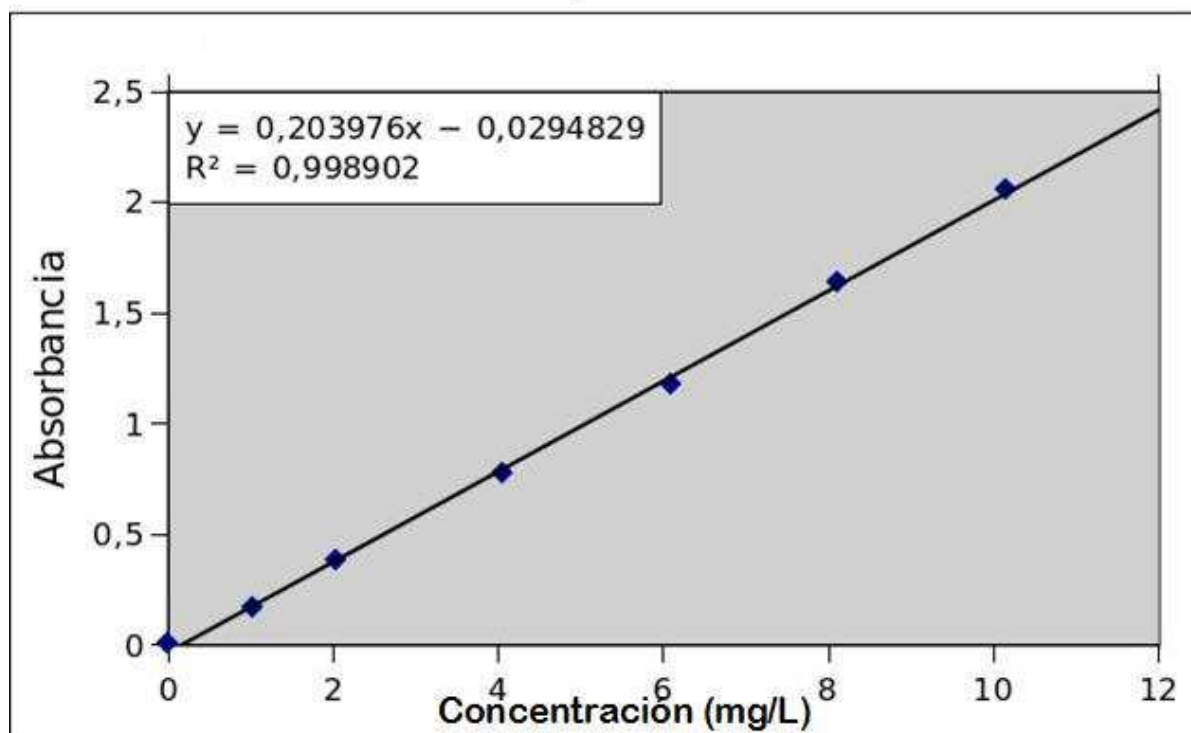


Fig 2. 3: Curva de calibrado para la medición de fósforo total

2.3.3.7- Biomasa microbiana

La biomasa se estimó por medición directa del CO_2 producido por los microorganismos.

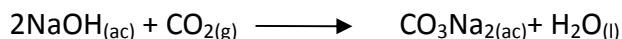
El método utilizado para esta variable se basa en una trampa de CO_2 (con NaOH), donde el NaOH sin reaccionar se titula con HCl (Fig. 2.4). Para ello se pesaron 20,0 g de tierra a humedad ambiente, a la que se le agregó 2 g de glucosa (en solución acuosa) para estimular el metabolismo microbiano. Esta tierra se colocó dentro de la cámara contenedora a la que se le agregó un vaso de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

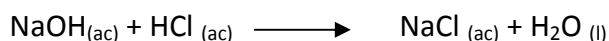
Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

precipitados con 25,00 mL de NaOH valorado (aprox. 0.1 M) y dos gotas de indicador a la fenolftaleína. La cámara se cerró y se dejó incubar a 32°C durante 24 Hs. Transcurrido ese tiempo, se tituló el NaOH con HCl 0,1 M hasta el viraje de la fenolftaleína. Luego, se agregó el indicador naranja de metilo y se continuó titulando hasta el primer viraje de este indicador. La diferencia de volumen entre el viraje de la fenolftaleína y el del naranja de metilo corresponde a la cantidad de CO₂ disuelta en el NaOH (Fig. 2.4). Durante 24 h de incubación el dióxido de carbono generado fue atrapado por el NaOH según ec. 1.2. Luego, se tituló la solución con HCl según la reacción de la ec. 1.3 y 1.4, en este caso se neutraliza el NaOH sin reaccionar y el CO₃²⁻ se transforma hasta HCO₃⁻. Finalmente, se agregó naranja de metilo y se continuó titulando hasta transformar el HCO₃⁻ en CO₂. La diferencia de volumen utilizado en titular hasta viraje de la fenolftaleína y naranja de metilo llevaron al cálculo de la cantidad de dióxido de carbono generado por respiración de los microorganismos (ec. 1.6).

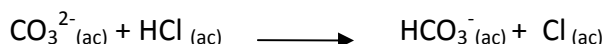
Ecuación 1.2: se atrapa el CO₂



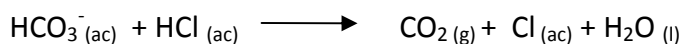
Ecuación 1.3: se titula a la fenolftaleína



Ecuación 1.4:



Ecuación 1.5: se titula al naranja de metilo



Ecuación 1.6: $n\text{CO}_2 = [\text{Vol HCl}_{(\text{naranja de metilo})} - \text{Vol HCl}_{(\text{fenolftaleina})}] \times \text{Conc HCl}$

$$m\text{CO}_2 = n_{\text{CO}_2} \times \text{MR}_{\text{CO}_2} = n_{\text{CO}_2} / 44\text{g/mol}$$

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

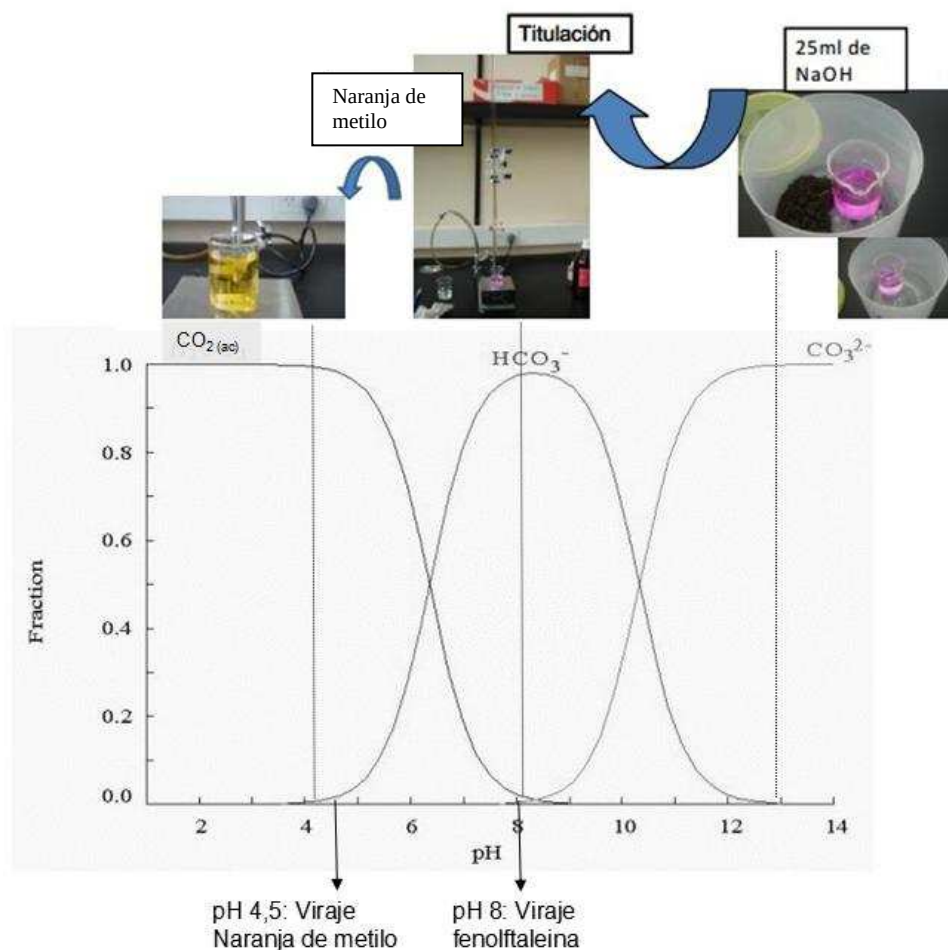


Fig 2. 4: Procedimiento experimental del ensayo de biomasa microbiana y justificación del cambio químico mediante el diagrama de especiación

Fuente del diagrama de especiación: <http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/contenido/capitulo12.html>

2.4- Diseño del ensayo de degradación de los plaguicidas

Para evaluar la velocidad de degradación de plaguicidas se realizaron ensayos, en los cuales las muestras extraídas de las diferentes secciones (Fig. 2.1) fueron combinadas dando origen a una sola muestra consolidada llamada 'huerta', y se comparó con suelos control (referencia y eucalipto). En paralelo a los análisis de velocidad de degradación, se llevaron a cabo ensayos de estimación de biomasa microbiana mediante la determinación de CO_2 . Tanto los ensayos de velocidad de degradación como los de biomasa microbiana fueron realizados con los mismos suelos en las mismas condiciones, de manera de poder saber qué ocurría con los microorganismos

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

durante la degradación de los productos incorporados a las tierras.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar la degradación en función de las diferentes ubicaciones dentro de la huerta, se ensayó otra experiencia diferente en la cual las muestras de suelo provenientes de la huerta no fueron consolidadas para formar una sola sino que se consideraron puntos dentro de las diferentes secciones de la huerta. En consecuencia, los suelos provenientes de la huerta debieron estudiarse por separado, por lo cual resultó necesario diseñar un nuevo esquema de muestreo.

2.4.1- Tratamiento de las muestras en laboratorio para el ensayo de degradación

Una vez que las muestras fueron acondicionadas, se pesaron 50 g $\pm$ 0.1 g en frascos de vidrio individuales; los mismos se taparon con tapas de aluminio perforadas, lo que permitió el intercambio de aire entre la cámara que quedaba en el recipiente y el exterior.

Se realizaron dos experiencias que tomaron un tiempo de duración total entre 24 y 32 días, extrayendo los plaguicidas a tiempos fijos; cada uno de estos tiempos tenía asignados frascos de vidrio que funcionaban como contenedores.

Se prepararon cinco frascos por cada tiempo de extracción, a cuatro se les incorporó el pulso inicial de los productos trifluralina, procimidone y clorpirifós. De estos cuatro, tres se destinaron para la extracción de los productos de manera que se pudiera evaluar la velocidad de degradación, a partir del cambio en la cantidad de plaguicidas en los diferentes tiempos por triplicado. El cuarto frasco se reservó para los ensayos de biomasa microbiana en presencia de plaguicidas tratando de respetar las mismas condiciones de incubación que los frascos para degradación. El quinto frasco no recibió agregados de plaguicidas, el objetivo de éste era tener un control para los ensayos de biomasa microbiana. En paralelo, sólo a los suelos utilizados para los ensayos de biomasa microbiana se les midió el porcentaje de humedad.

Los principios activos utilizados para estas experiencias fueron clorpirifós, procimidone y trifluralina. Las cantidades aplicadas en el primer y en el segundo ensayo se informan en la Tabla 3.2. Como se mencionó, los productos fueron aplicados una única vez al principio de la experiencia. Se preparó por cada ensayo una única solución acuosa contenedora de los tres productos; dicha solución contenía los productos comerciales en sus formulaciones emulsionables: Lorsban, Sumilex

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

y Trigermin (ver sección de materiales) y agua destilada.

Tabla 2.1: Concentraciones de plaguicidas incorporadas en las tierras estudiadas.

ENSAYO 1	ENSAYO 2
CANTIDAD DE PRINCIPIO ACTIVO AGREGADO POR MACETA (mg principio activo/g suelo)	
Trifluralina: 0,015	Trifluralina: 0,200
Clorpirifós : 0,035	Clorpirifós: 0,15
Procimidone: 0,023	Procimidone: 0,200

La elección de las cantidades de plaguicidas que se incorporaron, se realizó en base a las dosis recomendadas en la guía CASAFE 2001 para el caso de los cultivos de la huerta muestreada:

- Trifluralina: 1,2 L/ha a 2,4 L/ha
- Procimidone: 100 mL/hL
- Clorpirifós: 4 L/ha a 6 L/Ha

Una vez distribuido el suelo en las macetas, se agregaron 10 mL de la solución acuosa con estos tres productos y se pesaron las macetas. Al ser una solución acuosa, al mismo tiempo se estaba aumentando el porcentaje de humedad de la muestra, razón por la cual en el caso del control que no recibió agregados de plaguicidas, también se agregaron 10 mL de agua destilada.

En el caso del ensayo de degradación diferenciando las tierras provenientes de los diferentes sitios de la huerta, también se utilizó clorpirifós, procimidone y trifluralina. El diseño fue igual a lo detallado anteriormente, cinco réplicas de las cuales dos se utilizaron para los ensayos de control biológico y tres para los ensayos de velocidad de degradación. Se aplicaron, nuevamente, los productos comerciales en solución acuosa (0.017 mg/g-0.035 mg/g suelo) en un único pulso inicial. Debido a que en los dos ensayos anteriores de degradación, se pudo observar que luego de 15 días de incubación de las muestras los productos ya habían prácticamente desaparecido, en este muestreo sólo se realizaron dos puntos temporales de extracción: T1 (2hs luego de la aplicación) y T15 (15 días luego de la aplicación).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

2.4.2- Extracción de plaguicidas de la matriz suelo

La extracción consistió en tratar, dentro de los frascos de vidrio individuales, los 50 g de suelo con 100 mL de una mezcla de ciclohexano y acetona (50:50), medido con probeta. Además, se agregaron aproximadamente 25 g de sulfato de sodio anhidro. Se agitó la mezcla y esta suspensión fue sonicada durante 20 min, luego de lo cual una porción del extracto (de 10 mL) fue filtrada a través de una columna de vidrio con 1 g de sílica gel. Un mililitro del filtrado resultante se pasó a viales para cromatografía y se determinó la curva de los plaguicidas en el cromatógrafo gaseoso.

2.5- Enriquecimiento, aislamiento y purificación de bacterias

Los suelos utilizados para este ensayo fueron los de "huerta" y "referencia" acondicionados, utilizando el mismo criterio que para los ensayos de degradación (sección 2.4). Se trabajó con tres réplicas de cada uno. Para el enriquecimiento, se suspendió una porción de la muestra de suelo en solución fisiológica estéril (NaCl 150 mM) en una relación 1:10. Un volumen de 2,5 mL de esta suspensión fue transferido a un erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio estéril M9, suplementado con 1% v/v de los plaguicidas en sus presentaciones comerciales Lorsban, Sumilex y Trigermin. Las muestras se incubaron 15 días a con agitación orbital a 32°C y 120 rpm.

Pasado ese tiempo, se realizó el paso de aislamiento tomando un inóculo del cultivo líquido y estriando en placa de Petri con el mismo medio de enriquecimiento agarizado (M9-plaguicidas-15 g/L agar). De acuerdo a los fenotipos vistos en cada placa, se purificaron las colonias obtenidas en las mismas condiciones hasta homogeneidad.

2.5.1- Caracterización morfológica y bioquímica

2.5.1.1- Caracterización morfológica: Tinción de Gram

Se preparó un extendido de microorganismos sobre un portaobjeto, se dejó secar y se fijó a la llama. Se cubrió el extendido con una solución de cristal violeta y se dejó actuar 3 minutos. Transcurrido ese tiempo se volcó el colorante y se cubrió el portaobjetos con una solución de Lugol, durante un minuto. Se volcó el exceso de colorante, se decoloró con alcohol y luego se lavó con agua. Por último, se cubrió el extendido con fucsina básica y se dejó actuar 30 segundos. Ésta

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

se lavó bien con agua y el portaobjeto se dejó secar al aire. Luego de realizar todas estas tinciones, se observaron los extendidos al microscopio con objetivo de inmersión (100x) (Vullo et al, 2000).

Al visualizar los preparados al microscopio se pudo identificar la forma básica de los microorganismos de manera tal que se logró poder completar su caracterización morfológica.

2.5.1.2- Caracterización bioquímica: sistema multipruebas API 20 E-Biomerieux

API 20 E es un sistema por el cual se pueden identificar bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes. El ensayo consiste en inocular con una suspensión bacteriana los 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. La respuesta de la bacteria produce cambios de color con o sin agregados de reactivos específicos y, de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación y el programa informático, se obtienen resultados que permiten informar a nivel género de la bacteria.

Además del sistema API 20 E, se complementó la identificación bioquímica con una evaluación de crecimiento a 43°C, una vez caracterizado el género bacteriano. Se sabe que *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de crecer a dicha temperatura mientras que otras especies no, por lo tanto se podría discriminar entre especies del mismo género.

2.5.2- Crecimiento bacteriano en presencia de endosulfán

Se realizó un enriquecimiento bacteriano en presencia de endosulfán, con una suspensión del mismo suelo de huerta que se utilizó para el ensayo de degradación con este producto. En este caso se suplementó el medio M9 con 1% del producto comercial (Thionex) y se dejó en agitación orbital a 32°C durante 15 días. Luego, utilizando placas con M9-endosulfán-agar, se sembró un inóculo del caldo de enriquecimiento. En este caso, se utilizó endosulfán recristalizado al 1%.

Se ensayó otro protocolo de siembra en placa utilizando M9-agar rociado sobre la superficie con una solución etanólica de endosulfán recristalizado al 5%, que actuó como única fuente de carbono. Una vez preparadas, las placas se dejaron abiertas en el flujo laminar encendido, para evaporar el solvente. Luego, se secaron las placas invertidas en la estufa (32°C aproximadamente) durante dos horas. Se sembró un inóculo del enriquecimiento siguiendo la misma metodología que para preparar las placas, se sembraron las colonias aisladas individualmente para purificarlas.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

2.5.2.1- Toxicidad de los solventes sobre las cepas

Debido a que el endosulfán es insoluble en agua, se evaluaron diferentes solventes para su incorporación en los medios de cultivo.

Este ensayo se realizó para dos de las cepas aisladas - *huen 1* y *huen 3* - por duplicado cada prueba. Para esta experiencia fue utilizado el medio M9 variando las fuentes de C con el objetivo de identificar y evaluar cómo respondían las cepas a los solventes orgánicos seleccionados. Los solventes elegidos para ensayar fueron metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); realizándose de la siguiente manera (%v/v):

Crecimiento con distintas fuentes de carbono

- M9-glucosa (control)
- M9-Metanol (5% y 10%)
- M9-DMSO (5% y 10%)
- M9-DMFA (5% y 10%)

La falta de crecimiento indica que el solvente no fue consumido por la cepa, por lo tanto serían potencialmente útiles como vehículo inerte para aplicar endosulfán, a menos que resultasen tóxicas para las bacterias. Por eso a continuación, para las combinaciones que no registraron crecimiento, se ensayó la toxicidad.

Para evaluar la toxicidad de los solventes orgánicos seleccionados, se realizó, utilizando el medio M9, la evaluación de la máxima tolerancia al solvente incorporándolo al 7, 10, 12 y 15% v/v. Teniendo en cuenta cómo fue el crecimiento anteriormente mencionado, las combinaciones ensayadas fueron:

Toxicidad: máxima tolerancia al solvente

- M9-Glucosa (control)
- Huen 1: M9-Glucosa-DMFA (7-10-12-15%)
- Huen 3: M9-Glucosa-Metanol (7-10-12-15%)

2.5.2.2- Utilización de endosulfán como fuente de carbono y/o azufre

Seguido de esto, se intentó resolver si los microorganismos utilizan el plaguicida como fuente de carbono y/o de azufre, dada la estructura de la molécula de este principio activo. Se prepararon diferentes composiciones (Tabla 2.2) del medio mínimo (M9) sólo en un erlenmeyer y,

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

por otro lado, con endosulfán (100 mg/L) que fue agregado al medio con un co-solvente adecuado para cada cepa (previamente probada su toxicidad).

a) Para evaluar el consumo de carbono: se comparó el crecimiento de una misma cepa en dos medios M9 con la misma composición pero diferente fuente de carbono: glucosa (5 g/L) y endosulfán (100 mg/L).

b) Para evaluar el consumo de azufre: se agregó endosulfán (100 mg/L) en medio mínimo con composiciones diferentes. Un medio con M9 teniendo MgSO_4 y, por otro lado, M9 con MgCl_2 para asegurar la carencia de S.

Controles: se hicieron dos controles, por un lado uno para evaluar el agregado de MgCl_2 y otro con MgSO_4 , endosulfán y bacteria para eliminar cualquier sospecha de contaminación.

Tabla 2.2: combinaciones utilizadas en los medios líquidos

Tubo	Contenido
1	M9 (MgSO_4)
2	M9 (MgCl_2)-Endosulfán
3	M9 (MgCl_2)-Glucosa
4	M9 (MgSO_4)-Glucosa
5	M9 (MgSO_4)-Endosulfán
6	M9 (MgCl_2)-Endosulfán-Glucosa
7	M9 (MgSO_4)-Endosulfán-Glucosa
8	M9 (MgCl_2)
9	M9 (MgSO_4)-Endosulfán-Glucosa (control sin bacterias)

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

A continuación, se realizó una extracción del plaguicida y sus metabolitos del cultivo, con solvente orgánico siguiendo el esquema detallado en la Fig. 2.5.

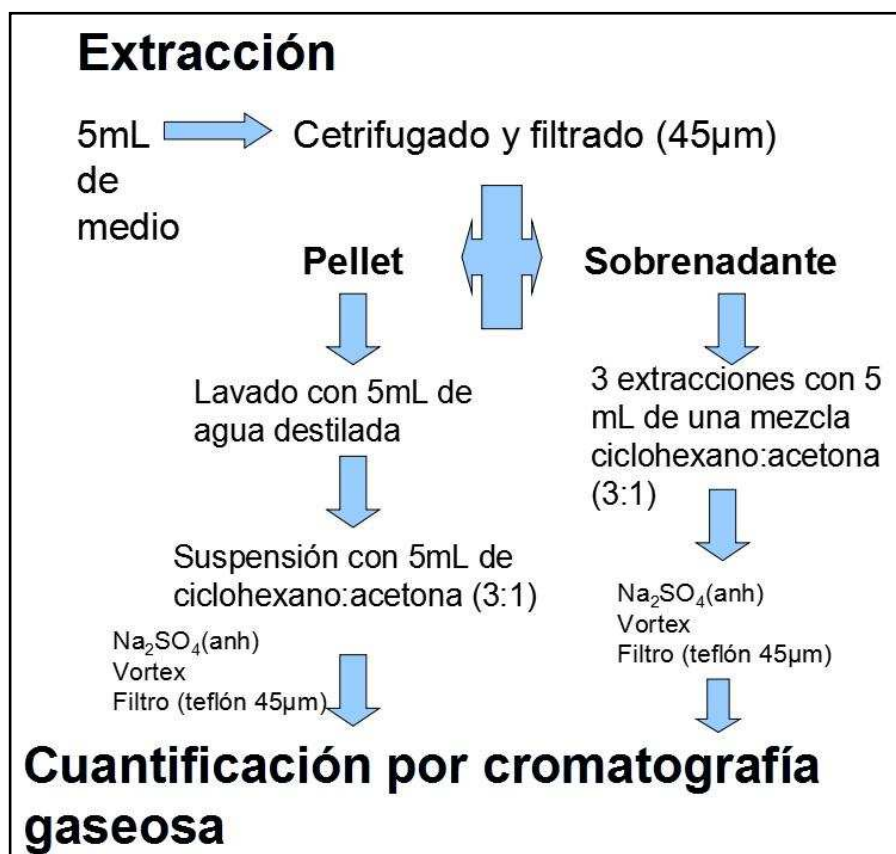


Fig 2. 5: Esquema de extracción del endosulfán y sus productos de degradación de medio de cultivo bacteriano

2.5.3- Evaluación de consorcios

Para comprender cómo interactúan las cepas del suelo provenientes de la huerta, se realizó un ensayo de compatibilidad de cepas en placa de Petri. Aproximadamente 24 horas antes de realizar el ensayo se preparó el precultivo para las cepas aisladas de suelo de huerta mediante el enriquecimiento con clorpirifós, procimidone y trifluralina. Las bacterias fueron inoculadas, por duplicado, desde tubos en pico de flauta de medio PyG (g/L: peptona, 2,5; extracto de levadura, 1,25; glucosa monohidratada, 0,55) e incubadas a 32°C. Una vez crecido el inóculo, por triplicado, se sembró mediante la técnica de hisopado cada cepa en placas de Petri con agar para recuento (PCA). A continuación de esto, se sembraron 10 µL de las cepas restantes en la misma placa de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

modo que una cepa fuese el césped y sobre éste las demás cepas distribuidas sectorialmente por la placa. Las placas fueron vistas a 24 h y 48 h, y se evaluó el comportamiento bacteriano sobre la superficie del medio en cuanto a crecimiento o inhibición de las cepas inoculadas.

2.6- Obtención de la muestra para el ensayo de movilidad

Para realizar los ensayos de movilidad de plaguicidas en suelo hortícola, se utilizaron alrededor de 200 g de suelo de la huerta ya mencionada. La metodología utilizada al igual que los sitios muestreados mantuvo la misma lógica de los demás ensayos. La ubicación de los puntos muestreados coincide con la del muestreo espacial (Fig 2.1), en cada uno se extrajeron los primeros 10 cm de suelo; de igual forma, se extrajo suelo de la zona de referencia alemana al campo. Una vez en el laboratorio, las muestras se acondicionaron como se describe en el apartado 2.2 de este capítulo. Los suelos provenientes de cada punto de la huerta se combinaron y homogeneizaron para conformar una única muestra denominada "huerta".

2.6.1- Procedimiento experimental para la determinación de la movilidad de plaguicidas

Se evaluó la movilidad vertical de tres plaguicidas utilizando los procedimientos estandarizados en la guía OECD 2004. Los plaguicidas evaluados fueron: clorpirifós, trifluralina y procimidone. Para esta experiencia se construyeron unas columnas de 4 cm de diámetro y 45 cm de largo; la técnica consistió en llenar 35 cm de altura de la columna con tierra previamente tamizada, y saturarla de agua mediante inundación desde abajo hacia arriba (Fig. 2.6). Una vez inundada la columna, al extremo superior de la misma se le incorporó en una mezcla acuosa, el producto comercial (esta evaluación se realizó en forma separada para cada plaguicida) de cada uno de los plaguicidas a evaluar y, al mismo tiempo, de igual manera y en la misma columna, un plaguicida de referencia (atrazina). Con una solución de CaCl_2 0,01 M se simuló una lluvia artificial sobre el extremo superior de la columna. Mediante un dispositivo para regular caudal de entrada se controló el flujo de esta solución para poder incorporar 250 mL en 48 h y, por otro lado, se ajustó el caudal de salida en el vástago de la columna para mantenerla siempre saturada de agua. Luego de las 48 h, se recolectó el líquido de lixiviación drenando la columna, y se seccionó la columna de tierra en porciones de 5 cm. Dichas porciones se dejaron secar al aire antes de ser

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

extraídas.



Fig 2. 6: inundación de las columnas de movilidad en sentido de abajo hacia arriba

Las muestras que se utilizaron para este ensayo corresponden al suelo referencia y el mencionado 'huerta' acondicionados tal como se detalla en la sección 2.1.

Tanto al líquido drenado como a las secciones de suelo se les realizó una extracción con solvente orgánico, como la detallada en la sección 2.4.2, para extraer el principio activo de cada plaguicida y cuantificarlo por cromatografía gaseosa.

Con respecto al uso de la atrazina, la OECD en su protocolo aconseja usar una sustancia de referencia. Describe que debería ser aplicada en la parte superior de la columna de la misma manera que la sustancia a evaluar y, aconseja como más eficiente, incorporar esta referencia en el mismo suelo y la misma columna donde va a correr el plaguicida. En cuanto a la naturaleza de la sustancia de referencia, la guía para evaluación de productos químicos de la OECD en su anexo 3 propone una tabla con diferentes plaguicidas con distintas clases de movilidad: de I (inmóvil) a VI (muy móvil). Teniendo en cuenta que la cuantificación se realiza con un detector ECD, es necesario

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

que el plaguicida de referencia tenga al menos un átomo de Cl en su estructura. La atrazina reunía todas estas condiciones: tiene un cloro en su estructura y es de categoría III de movilidad.

Las cantidades a incorporar de cada plaguicida fueron calculadas mediante la ecuación 1.7 estandarizada en el protocolo de la OECD, siendo en este caso 361,73 µg de clorpirifós, 62,8 µg de procimidone y 144,69 µg de trifluralina. En cuanto al plaguicida de referencia, la atrazina, se incorporaron en todos los casos 1,16 mg.

Ecuación 1.7

$$M (\mu g) = \frac{A \left(\frac{kg}{ha} \right) \times 10^9 \mu g / kg \times d^2 (cm^2) \times \pi}{10^8 \left(\frac{cm^2}{ha} \right) \times 4}$$

donde:

M = cantidad aplicada por columna [µg]

A = tasa de aplicación [kg · ha⁻¹]

d = diámetro de la columna de suelo [cm]

2.7- Análisis cromatográfico

Se realizaron corridas cromatográficas utilizando un método que permitió ver todos los plaguicidas en un mismo cromatograma. Se contó con un inyector automático Autosampler, y un detector de captura electrónica (ECD); columna capilar de PE-5, (5% difenilpolisiloxano - 95% dimetilpolisiloxano fase estacionaria) de 30 m de longitud, 0,25 mm diámetro interno y 0,25 µm espesor de película.

Las condiciones de corrida se optimizaron para poder analizar en forma simultánea los plaguicidas utilizados en cada ensayo; éstas fueron: temperatura del inyector: 280 °C; temperatura del ECD: 375 °C; temperatura del horno: 190 °C por 1,5 min, 45 °C·min⁻¹ hasta 300 °C luego 10 °C·min⁻¹ hasta 320°C y mantener 2 min; volumen de inyección 1 µL, splitless; gas fase móvil: N₂, 30 psi; ECD flujo auxiliar 30 mL·min⁻¹. El software utilizado fue TotalChrom Navigator versión 6.3.10504
Copyright © 2006 PerkinElmer, Inc.

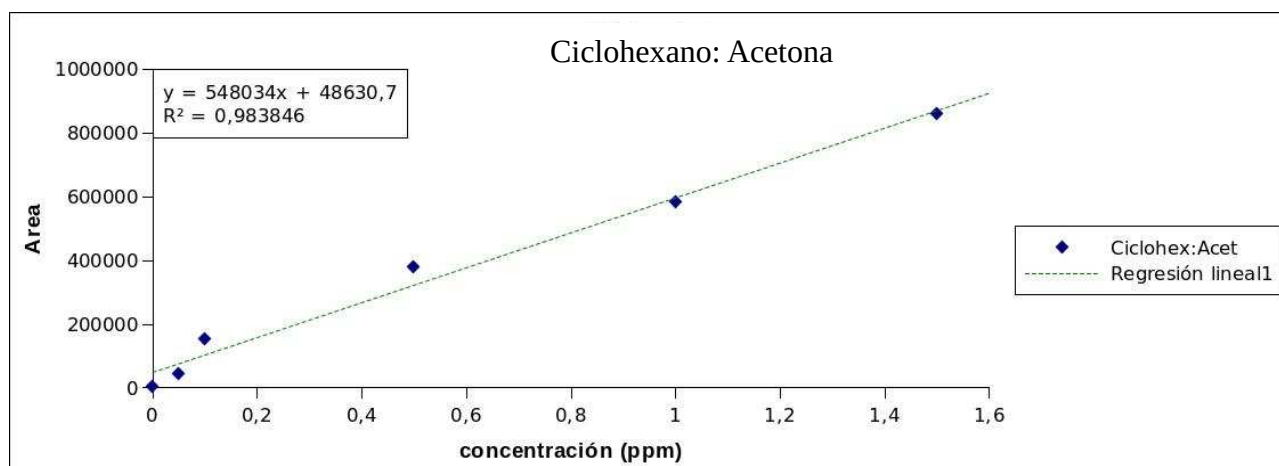
DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

2.7.1- Linealidad

Los ensayos para evaluar la linealidad del método fueron hechos adicionando a los suelos una solución madre que contenía trifluralina, procimidone y clorpirifós. La solución madre fue preparada a partir de los productos recristalizados. La extracción fue realizada con solvente orgánico según fue descripta en la sección 2.4.2, y la cuantificación fue por cromatografía gaseosa. Se realizó el mismo procedimiento de incorporación de plaguicidas utilizando como matriz ciclohexano:acetona en proporción 1:1, y se cuantificó por cromatografía gaseosa en la misma corrida y bajo las mismas condiciones que los ensayos utilizando suelo como matriz. Las figuras 2.7 a 2.9 muestran los gráficos resultantes, con las pendientes y el coeficiente de regresión obtenido para ambas matrices.

a)



b)

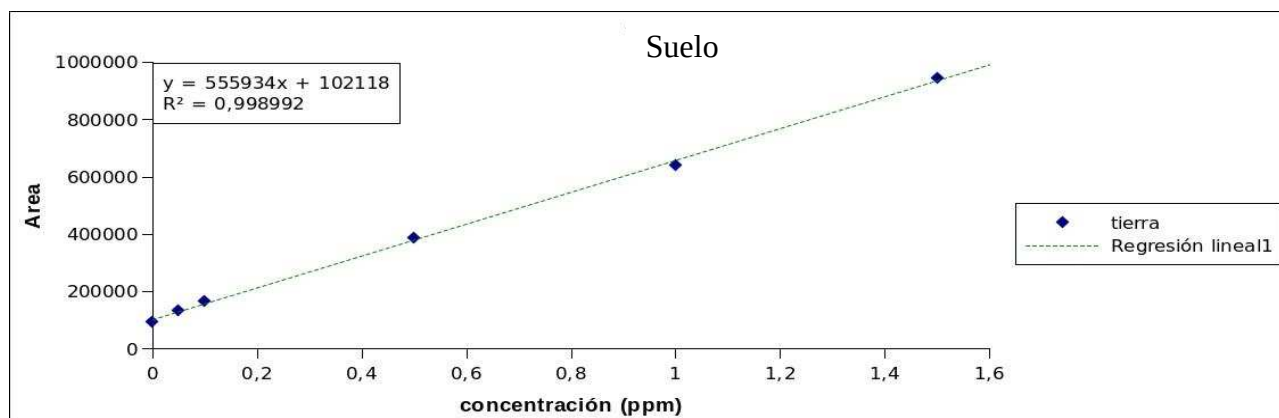
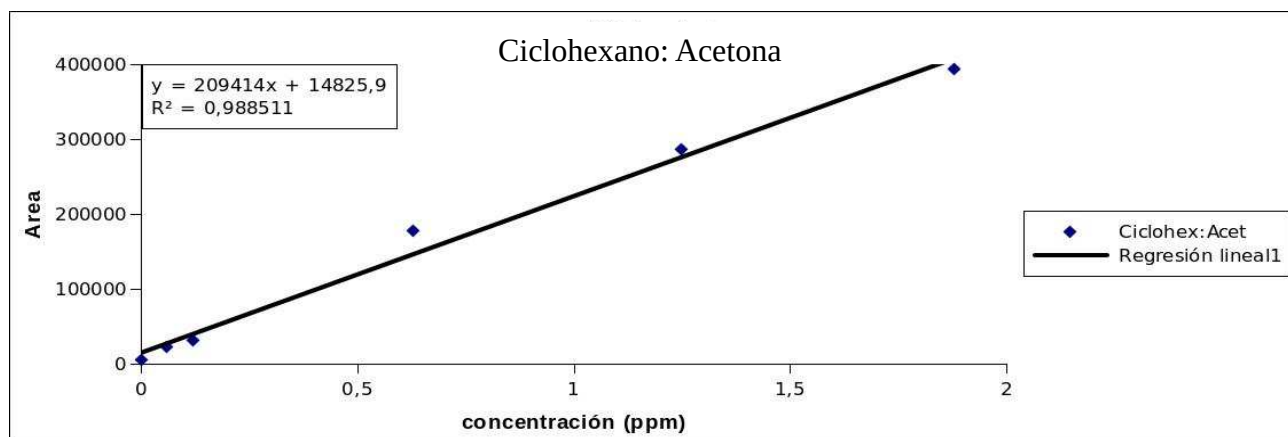


Fig 2. 7: Curvas de calibrado para trifluralina en las diferentes matrices siendo a) solvente y b) suelo

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

a)



b)

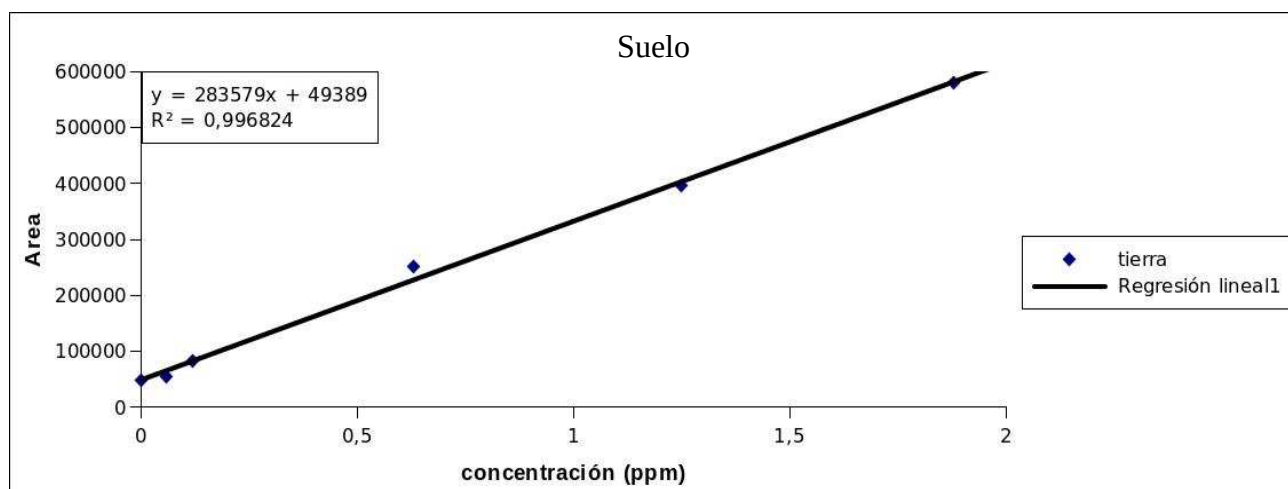
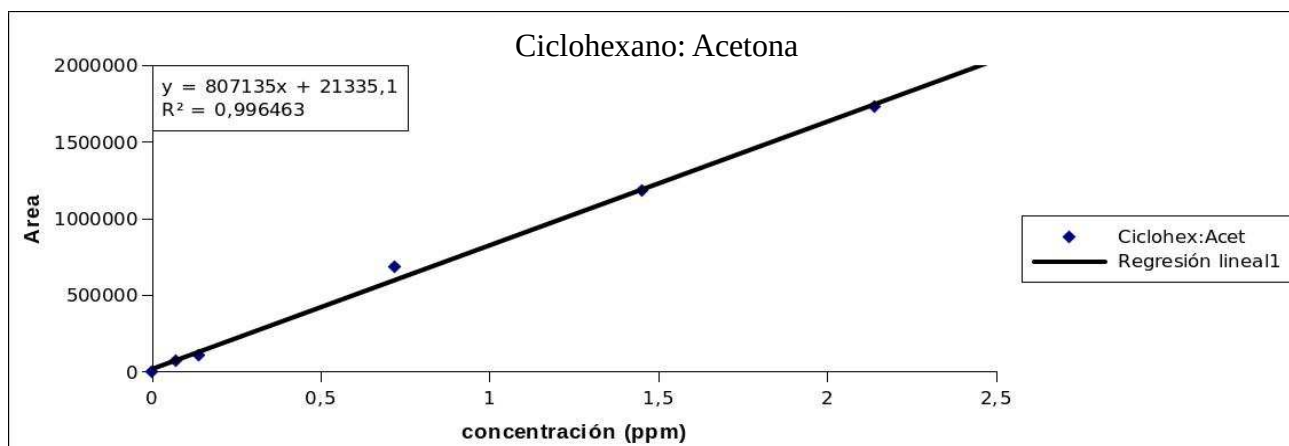


Fig 2. 8 Curvas de calibrado para procimidone en las diferentes matrices, siendo a) solvente y en b) suelo

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

a)



b)

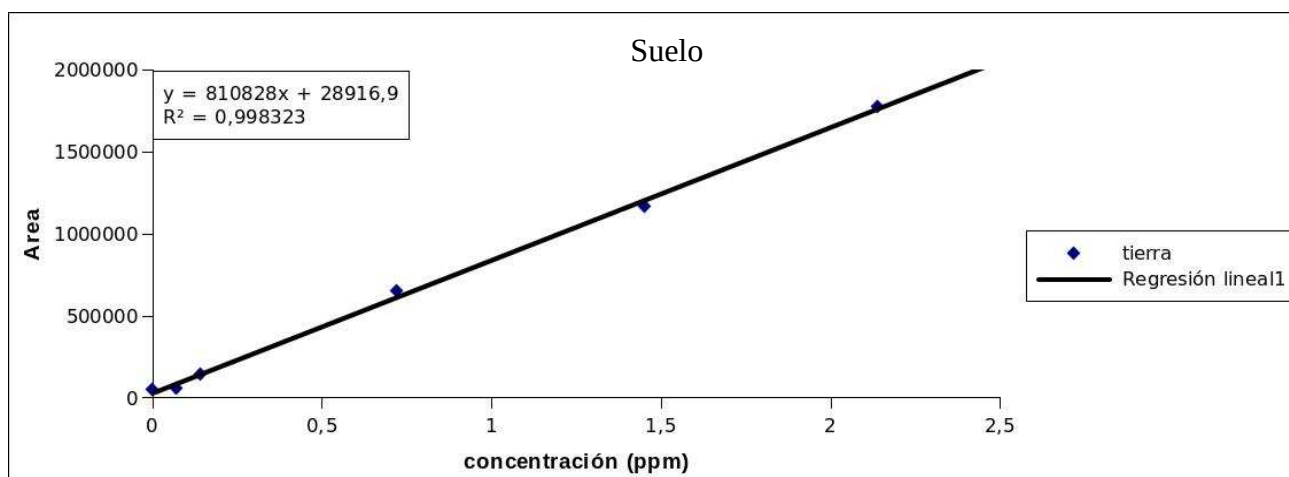


Fig 2. 9: Curvas de calibrado para clorpirifós en las diferentes matrices a) solvente y en b) suelo

No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las curvas en solvente y en suelo, en todos los casos ambas fueron del mismo orden.

2.7.2- Recuperación

En este caso el cálculo se realizó comparando las pendientes de las curvas de calibrado en la matriz suelo y en ciclohexano con plaguicidas; siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ recuperación} = (\text{pendiente en suelo} / \text{pendiente en ciclohexano}) \times 100$$

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

De esta forma podemos decir que los porcentajes de recuperación para los plaguicidas estudiados son:

% recuperación clorpirifós 101,4%

% recuperación procimidone 135,0 %

% recuperación trifluralina 101,1%

2.7.3- Resolución

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas de forma tal de poder separar clorpirifós, trifluralina y procimidone.

2.7.4- Precisión

La precisión intermedia fue calculada a partir de la inyección de una muestra que contenía los tres principios activos juntos, en una concentración de 0,06 ppm cada uno. Este procedimiento se realizó en tres días diferentes donde se hicieron diez inyecciones seguidas en cada día. La precisión intermedia se calculó con la desviación estándar de las áreas obtenidas para cada plaguicida y expresada como porcentaje. De esta forma, los resultados obtenidos son los siguientes:

Clorpirifós (0,06 ppm) precisión 5,9%

Procimidone (0,06 ppm) precisión 9,0%

Trifluralina (0,06 ppm) precisión 6,8%

La desviación de los valores con respecto a la media en el caso de los tres plaguicidas es menor al 10%.

2.7.5- Limite de cuantificación (LC)

El LC se calculó como dos veces la concentración en ppm, correspondiente a la abscisa de las curvas de calibrado en suelo para cada plaguicida. De esta forma, se llegaron a los siguientes resultados:

LC trifluralina: 0,17 ppm (0,00017 mg trifluralina/g suelo seco)

LC procimidone: 0,18 ppm (0,00018 mg procimidone/ g suelo seco)

LC clorpirifós: 0,04 ppm (0,00004 mg clorpirifós / g suelo seco)

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Capítulo 3

Resultados y Discusión

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

3.1- Propiedades biológicas, químicas y físicas del suelo

Dentro de la producción en una huerta, se hallan en sitios contiguos distintos tipos de cultivos que requieren diferentes tratamientos, esto es, agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas y productos fitosanitarios de acuerdo a los problemas propios de cada especie cultivada. Por lo tanto, el suelo dentro de una misma huerta podría presentar propiedades biológicas, químicas y físicas diferentes, aún siendo parcelas contiguas. En relación a esto es que se realizó un muestreo espacial y temporal con el objetivo de observar el grado de heterogeneidad en cuanto a propiedades biológicas, físicas y químicas del suelo, y poder evaluar si la presumible homogeneidad/heterogeneidad de esta matriz podría afectar el estudio de otras propiedades como la biodegradación de los plaguicidas.

Para evaluar esto, los parámetros medidos en las muestras de suelo fueron: densidad aparente, porcentaje de materia orgánica, conductividad, pH, retención de agua, humedad, fósforo total y biomasa microbiana. La tabla 3.1 muestra los valores para todos los puntos del muestreo, polígono por polígono según se identificaron en la figura 2.1 del capítulo de materiales y métodos (pág. 57). Además, las mismas mediciones se realizaron en suelos controles denominados referencia (Rf1) y (Rf2), correspondientes a un patizal adyacente a la huerta (Rf1) y al suelo de un bosque de eucaliptus también cercano (Rf2). El objetivo de estos controles fue comparar cómo la actividad hortícola podría alterar las propiedades características de los suelos de esa zona.

En la tabla 3.1, se pueden observar variaciones significativas en relación con el contenido de fósforo total, siendo P1 el polígono en donde mayor cantidad fue encontrada, seguido por P2 y luego por P3. Por otra parte, se encontraron valores de porcentaje de materia orgánica en los tres polígonos de la huerta consistentemente menores respecto de los valores encontrados para el suelo de referencia Rf1. Cabe destacar que el suelo proveniente del bosque de eucaliptos (Rf2) presentó valores marcadamente más altos en los que respecta a biomasa microbiana, materia orgánica,

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

retención de agua y humedad; y cantidades muy bajas de fósforo total en comparación con los encontrados en los polígonos de la huerta. Esto puede explicarse, al menos parcialmente, por la gran cantidad de hojas de eucalipto presente en estado de descomposición en el horizonte A de este suelo.

Por otro lado es interesante señalar que hacia el interior de la huerta en los tres polígonos (P1, P2 y P3) no se observan diferencias significativas de la densidad aparente, el pH, la conductividad, la humedad y la materia orgánica (Tabla 3.1).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Tabla 3.1: Propiedades biológicas, físicas y químicas. Muestreo espacial

Punto de Muestreo (Fig.)	Propiedades biofísico-químicas							
	RM ¹ (mg CO ₂ /g suelo)	Hum. ² (%)	MO ³ (%)	Cond. ⁴ (mS/cm)	pH	Vol. Ret. ⁵ (mL/g)	Densidad (g/mL)	P ⁶ (mg/g tierra)
P1-A1	0,42	15,5	4,79	0,114	6,45	1,44	NM7	0,277
P1-B1	0,29	17,8	4,40	0,067	5,99	1,28	1,10	0,226
P1-C1	0,39	14,5	4,36	0,051	6,45	1,12	1,80	0,258
P1-D1	0,42	16,9	4,41	0,045	6,55	0,99	2,01	0,248
P1-E1	0,32	20,3	4,75	0,032	6,09	0,94	1,66	0,214
P1-E2	0,46	19,6	4,39	0,144	7,04	1,29	1,52	0,194
P1-F1	0,45	20,4	4,82	0,058	6,35	1,10	NM	0,185
P1-F2	2,41	21,3	4,61	0,133	6,15	1,34	0,29	0,202
P2-A	1,16	12,7	6,05	0,083	5,95	0,94	1,52	0,066
P2-B	0,60	22,3	6,42	0,031	5,39	0,76	1,91	0,088
P2-C1	0,68	22,4	4,01	0,143	5,17	1,02	1,82	0,104
P2-C2	0,46	14,1	6,31	0,050	6,09	0,94	1,63	0,204
P2-D1	0,84	17,5	4,27	0,027	5,19	0,81	1,90	0,149
P2-D2	0,38	13,6	4,28	0,046	6,03	0,70	1,62	0,290
P3-A1	0,25	16,3	4,35	0,268	7,05	1,20	1,62	0,160
P3-A2	0,55	21,6	4,42	0,061	5,65	0,73	1,70	0,164
P3-B1	0,57	19,6	5,71	0,056	5,75	1,05	1,57	0,155
P3-B2	0,51	19,4	4,70	0,063	6,21	0,77	2,50	0,147
P3-C1	0,44	14,9	2,78	0,027	5,21	1,12	1,52	0,186
P3-C2	0,37	17,1	6,23	0,054	5,65	0,83	NM	0,168
Rf1	0,77	28,4	8,59	0,080	5,72	0,88	0,95	0,090
Rf2	2,00	34,4	38,16	0,203	4,70	1,55	1,00	0,040

1 RM: Respiración microbiana (mg CO₂/g suelo seco).
 2 Hum: Humedad (% referido a suelo seco).
 3 MO: Contenido de materia orgánica (% referido a suelo seco).
 4 Cond.: Conductividad
 5 Vol. Ret: Volumen de retención (mL agua/g suelo seco).
 6 Fósforo Total (mg P/g suelo seco).
 NM: No medido

Los valores de la tabla 3.1, para el caso de las propiedades entre polígonos de la huerta (P1, P2 y P3) fueron promediados y graficados, con las respectivas desviaciones estándar (Fig. 3.1), con el objetivo de visualizar mejor el grado de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

heterogeneidad/homogeneidad entre los polígonos hortícolas.

La figura 3.1 a presenta los valores porcentuales de humedad para los tres polígonos de la huerta. Las tierras antes de ser sometidas al ensayo de humedad fueron secadas al aire, por lo cual la humedad medida corresponde a la porción de agua higroscópica asociada a la retenida en las partículas del suelo. No se observan variaciones importantes en los resultados, por lo cual se puede decir que las tierras presentan en promedio un 17% de humedad. Esta homogeneidad en el valor de porcentaje de humedad se podría asociar a las características de la textura del suelo de huerta que presenta porcentajes de arcilla de alrededor de un 22% (dato obtenido a partir del análisis textural de las tierras realizado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires).

La figura 3.1 b presenta la cantidad de fósforo total encontrado por gramo de suelo seco en cada polígono productivo. Se observa que el polígono 1 difiere de los otros dos por ser el que mayor valor de fósforo registró, alrededor de un 30% más, mientras que P2 y P3 muestran un valor similar entre ellos.

En cuanto a la medición de densidad aparente (fig 3.1 c), no se observan diferencias significativas entre polígonos. Los valores obtenidos oscilan entre 1,4 g/mL y 1,8 g/mL, indicando un grado de compactación significativo en el que se encuentran estos suelos.

La biomasa microbiana fue estimada a partir de la cantidad de CO₂ liberado de las tierras estudiadas, es decir, se determinó la biomasa midiendo la respiración total de los microorganismos del suelo. En la Fig. 3.1d se presentan los valores promedio para la medición de CO₂. Estos valores oscilan entre 0,40 mg y 0,70 mg de CO₂ por gramo de suelo. Sin embargo, en la Tabla 3.1, se observa una variación significativa para el polígono P2, presumiblemente explicable por un mayor contenido de biomasa microbiana.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

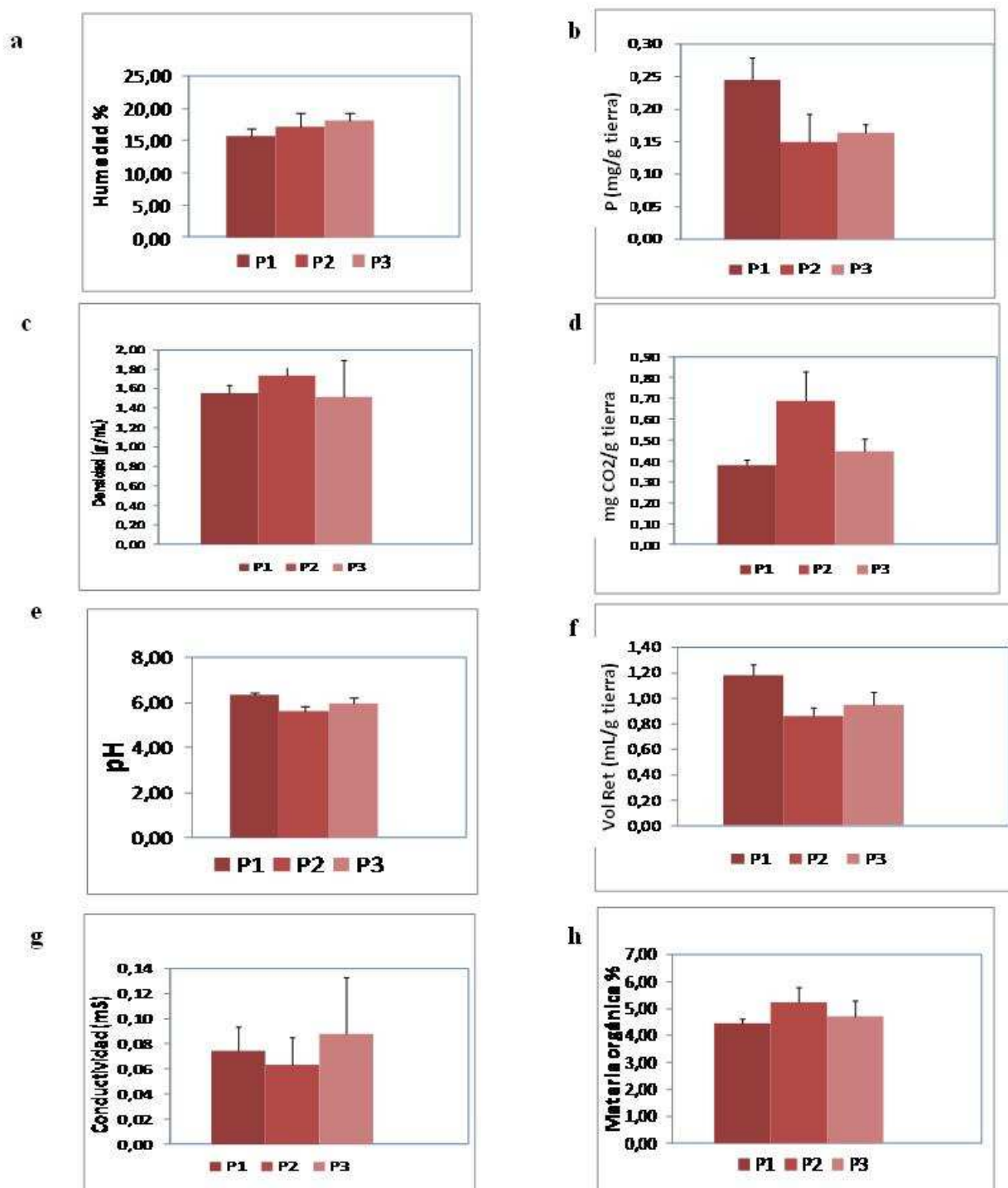


Fig 3. 1: Muestreo espacial. Humedad (a), Fósforo total (b), Densidad (c), Respiración microbiana (d), pH (e), Volumen retenido (f), Conductividad (g) y Materia orgánica (h). Los datos fueron normalizados teniendo en cuenta los % de humedad

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

En lo que se refiere al pH del suelo, para el caso del muestreo espacial (fig 3.1 e), se puede observar que existe homogeneidad en cuanto a los valores dentro de la huerta. La actividad hortícola y las diferencias de tratamiento para los cultivos no alteraron notablemente esta propiedad. Las mediciones de pH y conductividad fueron realizadas simultáneamente. Nuevamente, en el caso de conductividad (fig 3.1 g) no se observaron diferencias significativas entre los polígonos de la huerta, pero si en el caso de este parámetro se observó mucha dispersión en las mediciones al interior de cada polígono (ver tabla 3.1).

Con respecto al volumen de agua retenido (fig 3.1 f), se puede observar que existe una diferencia entre el polígono 1 y los polígonos 2 y 3, donde el suelo proveniente del polígono 1 retiene aproximadamente un 25% más que en los otros casos.

Con respecto a la medición de materia orgánica (fig 3.1 h), se utilizó el método de ignición para el que se calcinaban a 400°C los suelos tamizados. Como consecuencia de este calentamiento, se consideró el resultado de la pérdida de masa como materia orgánica total, y se expresó en forma porcentual. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre los tres polígonos, obteniéndose valores que oscilan entre 4,5 % y 6%.

Desde este análisis surge que, en lo que refiere al muestreo espacial, los polígonos de la huerta no presentaron diferencias significativas entre ellos por lo cual se ve una distribución que se podría considerar homogénea en cuanto a las propiedades biológicas, físicas y químicas del suelo. Por otra parte, se vieron diferencias significativas entre las propiedades de las muestras de suelo hortícola y las utilizadas como control Rf1 y Rf2. Este aspecto se discutirá más adelante.

Con respecto al muestreo temporal, en la tabla 3.2 se encuentran los valores obtenidos para cada punto en la huerta según la Fig. 2.2 del capítulo de Materiales y Métodos (pág. 59). En la Fig. 3.2 se pueden observar, por otro lado, los valores promedios y las desviaciones estándar para cada propiedad de todos los polígonos de acuerdo al

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

muestreo correspondiente (t_1 : primavera, t_2 : otoño y t_3 : invierno).

Tabla 3.2: Propiedades biológicas físicas y químicas. Muestreo temporal

Punto de muestreo	Propiedades Biofísico-químicas				
	RM ¹ (mg CO ₂ /g suelo)	Hum. ² (%)	MO ³ (%)	P ⁴ (mg/g suelo)	Vol. Ret ⁵ (mL/g suelo)
P1-C- t_1	0,37	12,8	4,2	0,32	1,25
P1-C- t_2	1,77	22,6	5,1	0,23	0,74
P1-C- t_3	1,08	19,0	4,4	0,18	0,51
P1-E- t_1	0,39	20,0	4,6	0,20	1,11
P1-E- t_2	0,40	20,6	4,0	0,29	0,87
P1-E- t_3	0,73	17,8	3,9	0,15	0,46
P1-F- t_1	1,43	20,9	4,7	0,19	1,22
P1-F- t_2	1,66	19,9	4,4	0,41	0,85
P1-F- t_3	0,66	12,0	3,9	0,53	0,65
P2-A- t_1	0,68	22,4	4,0	0,10	1,02
P2-A- t_2	1,15	17,9	3,6	0,14	0,76
P2-A- t_3	1,50	16,3	3,6	0,08	0,50
P2-C2- t_1	0,46	14,1	6,3	0,20	0,94
P2-C2- t_2	1,93	21,9	3,9	0,27	1,02
P2-C2- t_3	1,45	23,4	4,0	0,15	0,24
P2-D- t_1	0,61	15,5	4,3	0,22	0,76
P2-D- t_2	0,96	18,5	4,7	0,27	0,62
P2-D- t_3	1,11	19,4	5,1	0,13	0,39
P3-A- t_1	0,40	18,9	4,4	0,16	0,97
P3-A- t_2	0,49	21,6	3,2	0,32	0,84
P3-A- t_3	0,69	16,3	3,1	0,27	0,44
P3-C- t_1	0,40	16,0	4,5	0,18	0,97
P3-C- t_2	0,59	18,1	3,8	0,42	0,83
P3-C- t_3	0,83	19,0	3,6	0,30	0,85

¹ RM: Respiración microbiana (mg CO₂/g suelo seco).

² Hum: Humedad (% referido a suelo seco).

³ MO: Contenido de materia orgánica (% referido a suelo seco).

⁴ Vol. Ret: Volumen retenido de agua (mL de agua /suelo seco)

⁵ Fósforo Total (mg P/g suelo seco).

Claramente el porcentaje de materia orgánica, el contenido de fósforo y la humedad no presentaron variaciones estacionales. Aunque no son estadísticamente significativos, dado el alto valor de la desviación estándar, si parece observarse diferencias

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

para el caso de la respiración del suelo y el volumen de retención. Una posible hipótesis podría estar dada por el proceso de enmienda que se realiza sobre estos suelos, utilizando componentes naturales (cama de pollo) y químicos. De todas maneras esta conjetura debe ser estudiada.

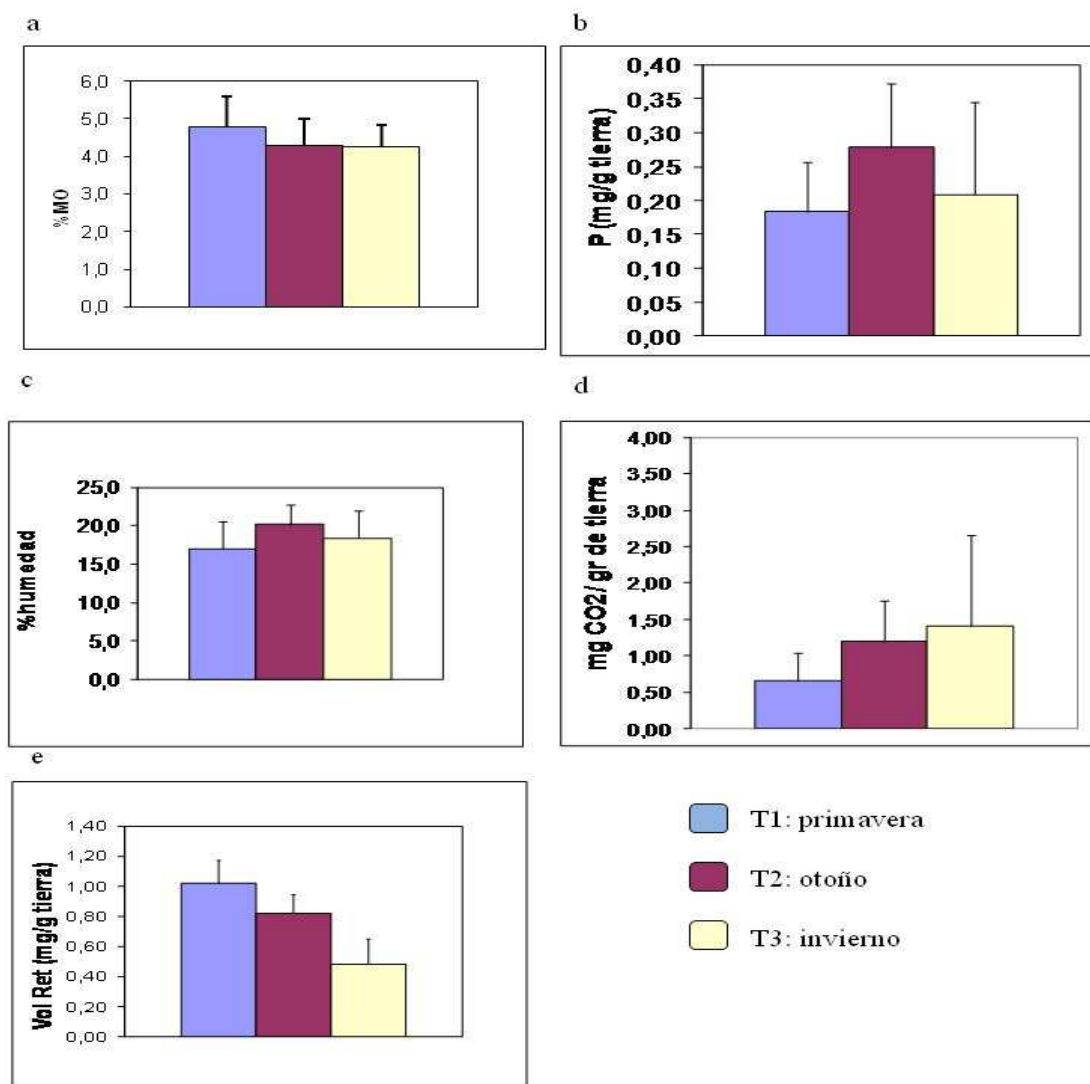


Fig3. 2: Muestreo temporal (promedio de los parámetros medidos en los polígonos para cada tiempo) Materia orgánica (a), Fósforo total (b), Humedad (c), Respiración microbiana (d), Volumen retenido. Los datos fueron normalizados teniendo en cuenta los % de humedad

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Se puede concluir entonces que no se observaron diferencias significativas entre los valores de las propiedades medidas sobre las muestras de los diferentes polígonos dentro de la huerta (muestreo espacial) y en las mediciones estacionales en ciertos puntos de la huerta (muestreo temporal). Sin embargo si existe una diferencia significativa al comparar los suelos de la huerta (HS) con los llamados "referencia" y "eucalipto". En la fig. 3.3 se pueden observar los correspondientes gráficos con los promedios para cada parámetro.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

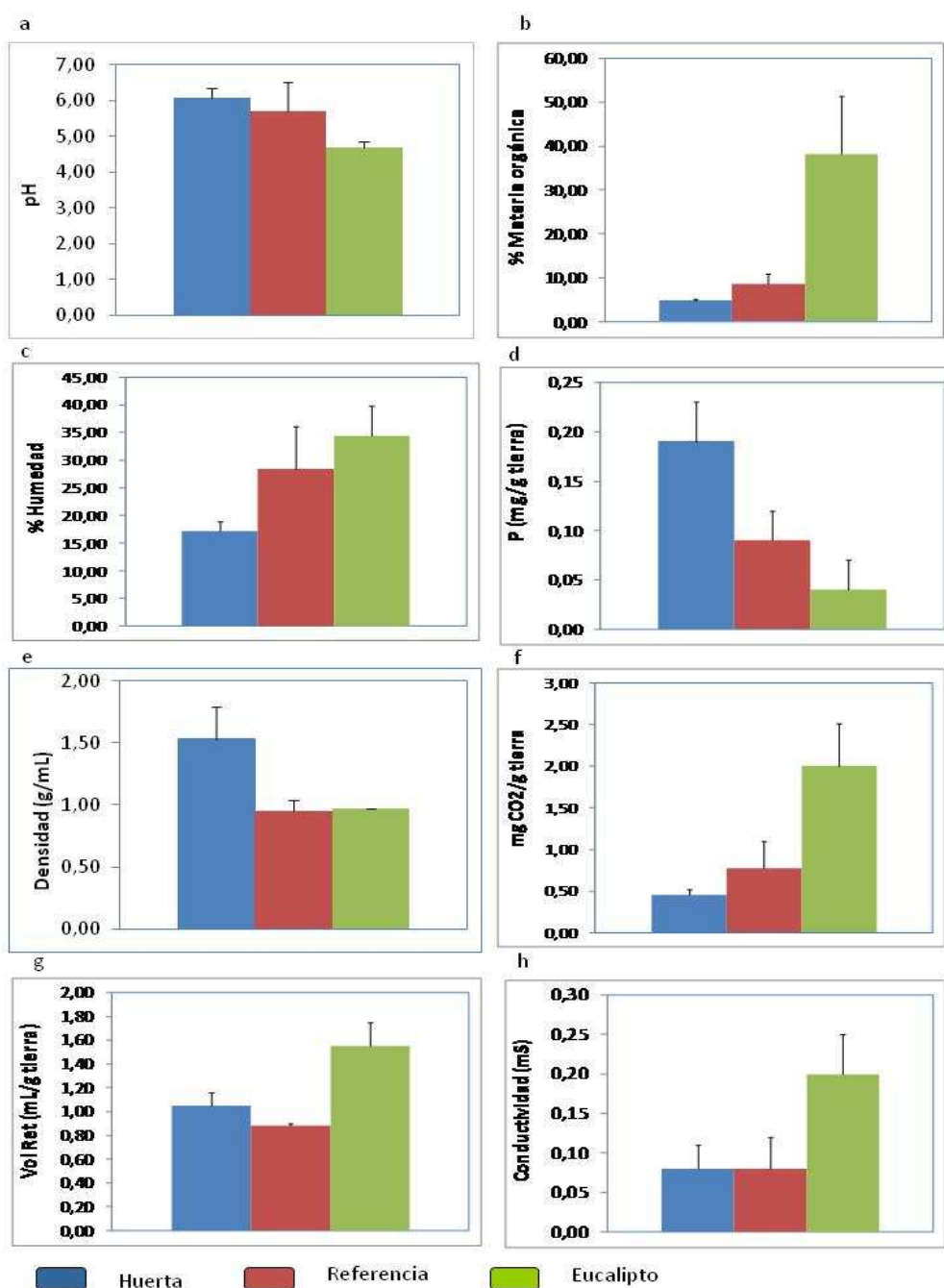


Fig 3.3: Comparación entre tierra de huerta y controles (referencia y eucalipto). pH (a), Materia orgánica (b), Humedad (c), Fósforo total (d), Densidad (e), Respiración microbiana (f), Volumen retenido (g) y Conductividad (h). Los valores fueron normalizados teniendo en cuenta el %humedad

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Si bien el suelo de la huerta (HS) era similar en composición y textura al suelo de referencia RF1, en el caso de respiración microbiana este parámetro fue mayor en el suelo de referencia Rf1 con $0,77 \pm 0,07 \text{ mg CO}_2/\text{g}$ suelo seco mientras que HS dio valores de $0,45 \pm 0,07 \text{ mg CO}_2/\text{g}$ suelo seco. Por otro lado el suelo del bosque de eucaliptos (Rf2) presentó valores de más del doble que el resto de los sitios muestreados. Lo mismo ocurrió con el porcentaje de materia orgánica donde, en eucalipto, fue tres veces mayor que en el resto de los puntos. Esto indicaría que el porcentaje de materia orgánica y los valores de respiración están correlacionados (Fig 3.2 b y f): a mayor porcentaje de materia orgánica existe mayor cantidad de sustrato (fuente de carbono) susceptible de ser metabolizado por los microorganismos incrementando consecuentemente los valores de biomasa. El control llamado eucalipto (Rf2) correspondía a una zona donde se encuentra una aglomeración de estos árboles, por lo cual la cantidad de hojarasca presente en esos suelos era muy grande. Esta observación permitiría explicar los altos porcentajes de materia orgánica hallados en el sector y el consecuente incremento en las mediciones de biomasa microbiana por medio de respiración.

El bajo contenido de materia orgánica encontrado en suelo de huerta (Fig. 3.2) podría explicarse por el estrés generado por la producción intensiva sobre estos suelos.

En relación con el efecto del agregado de enmienda sobre la estructura de los suelos, D'Hose et al (2013) encontraron que el agregado de enmiendas produce una disminución de la densidad aparente variando, las propiedades estructurales del suelo. Sin embargo, como se observa en la Tabla 3.1, los valores de densidad aparente para los suelos estudiados son mayores a los de los suelos de referencia, es decir, se observa un aumento en la densidad aparente a pesar de los agregados de enmiendas que las tierras de huerta pudieran recibir. En relación con la estructura de los suelos, se pudo determinar a partir del análisis realizado a los suelos de huerta y referencia (Rf1) que las primeras eran más ricas en arcilla (21,5% suelo de huerta, 18,0% suelo de referencia) y las últimas en arena (11,88% frente a 9% en suelo de huerta, 11,88% suelo de referencia), lo cual

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

podría hacer presumir que los suelos de huerta, además, recibieron el aporte de “suelo exógeno”, es decir proveniente de otra locación.

Como se mencionó anteriormente, se encontraron altos valores de fósforo total en los suelos productivos estudiados. Se vio que los niveles en el suelo de las huertas ($0,19 \pm 0,04$ mg P/g suelo seco, fig 3.3 d) representaban el doble de los valores encontrados en el suelo de referencia ($0,09 \pm 0,03$ mg P/g suelo seco, fig 3.3 d). Este enriquecimiento en fósforo es consecuencia de la fertilización de los campos, realizada previa al cultivo. En particular, en estos emprendimientos hortícolas estudiados, la fertilización se realiza con cama de pollo, la cual tiene la característica de aportar fósforo, nitrógeno y materia orgánica. Si bien estos suelos reciben un aporte exógeno importante de fósforo, a su vez, las especies de fósforo solubles en agua sufren un rápido proceso de inmovilización en estos suelos, que puede ser explicado parcialmente por la importante dureza de las aguas de la zona. En función de esta hipótesis y a partir de un análisis del Ca^{2+} y el Mg^{2+} presentes en muestras de suelo analizadas en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, se obtuvo que las tierras de huerta poseen un nivel medio de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} de 8 meq/100g y 4 meq/100g, respectivamente, que pueden considerarse como altos. Esta hipótesis se alinea con lo postulado por Jin Fa et al (2014) quienes sugirieron que los agregados de fósforo en el suelo quedan mayoritariamente inmovilizado, sin capacidad de estar biodisponibles.

González et al (2010) postulan que las enmiendas de suelo, cuyo fin principal es el agregado de materia orgánica y nutrientes, mejorarían las propiedades físico-químicas, bioquímicas y microbiológicas de los mismos. Entre los beneficios que aportan se encuentran: mejorar la agregación del suelo, la retención de agua, reducir la densidad aparente y estabilizar el pH. Sin embargo, éstas cuestiones no se ven reflejadas en los resultados obtenidos para suelo de huerta, probablemente debido a que también existen otros factores, como la compactación del suelo que podría alterar la densidad aparente y la retención de agua.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

En la figura 3.3 f se pueden observar los valores de producción de CO₂ producto de la respiración de los microorganismos aerobios en las tres muestras de suelo. La muestra de referencia del bosque de eucalipto (Rf2) presentó una producción de CO₂ cuatro veces mayor que la proveniente de la huerta, mientras que la del suelo de referencia (Rf1), no tuvo diferencias significativas con la medición en huerta. Esto podría explicarse parcialmente teniendo en cuenta que el suelo proveniente de la huerta presentó mayores valores de densidad aparente (Fig. 3.3 e), bajos volúmenes de retención de agua (Fig. 3.3 g), y menor contenido de materia orgánica, con lo cual se esperaría encontrar en estos suelos menor producción de CO₂ que en los de referencia. De esta forma por el nivel de compactación de los suelos hortícolas se ve reducida la cantidad de macroporos donde se almacenan los gases pertenecientes a la atmósfera del suelo, donde los microorganismos aerobios toman el O₂ necesario para realizar la respiración, por lo cual el desarrollo de la biomasa se vería desfavorecido.

En cuanto a los valores de densidad aparente, se puede observar en la figura 3.3 que los valores en huerta son aproximadamente un 85% mayores que en los suelos de referencia. Algunos autores tales como Wilson et al (2013), postulan que si aumenta la densidad aparente, baja la retención de agua afectando la estructura del suelo y por ende la fertilidad de la matriz. Los valores de densidad aparente son muy dependientes de los procesos de compactación que sufren los suelos hortícolas producto de los procesos mecánicos que los productores realizan al trabajar estas tierras. Valores altos producen alteraciones fisiológicas y morfológicas en las plantas que llevan a la reducción de los cultivos mediante la limitación en el crecimiento de las raíces (Wilson et al, 2013).

Adicionalmente, la compactación también afectaría en forma negativa el almacenamiento de agua, la aeración y la temperatura. Se puede observar en la figura 3.3 g que la tierra de eucalipto retuvo poco más del doble del volumen de agua retenido por los suelos de huerta. Estos resultados también se condicen con los valores hallados de porcentaje de humedad (fig 3.3 c) en todas las tierras donde Rf2 una vez más presenta un

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

porcentaje dos veces mayor que HS

3.2-Degradación de plaguicidas

3.2.1- Cinética de degradación de clorpirifós, trifluralina y procimidone

Se realizó una experiencia de degradación aplicando simultáneamente clorpirifós, trifluralina y procimidone en la forma de sus formulados comerciales a una muestra de suelo de huerta y a otra correspondiente al suelo de referencia. En el caso del suelo de huerta, la muestra de estudio resultó de una composición representativa de los tres lotes de estudio. Se realizó el análisis de la degradación de los plaguicidas durante un período entre 24 y 32 días para evaluar la disipación de estos productos.

La Figura 3.4 presenta los resultados de la primera experiencia (dosis aplicada 0.015-0.035mg/g suelo seco), donde se aplicaron los tres plaguicidas simultáneamente en una muestra combinada de suelo de huerta y en un control referencia. Se puede observar que, por la pendiente de las curvas en la Figura 3.4 a en la muestra de suelo consolidado de la huerta la cantidad de producto hallada disminuye de manera más rápida que en los suelos de referencia, a las concentraciones aplicadas.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

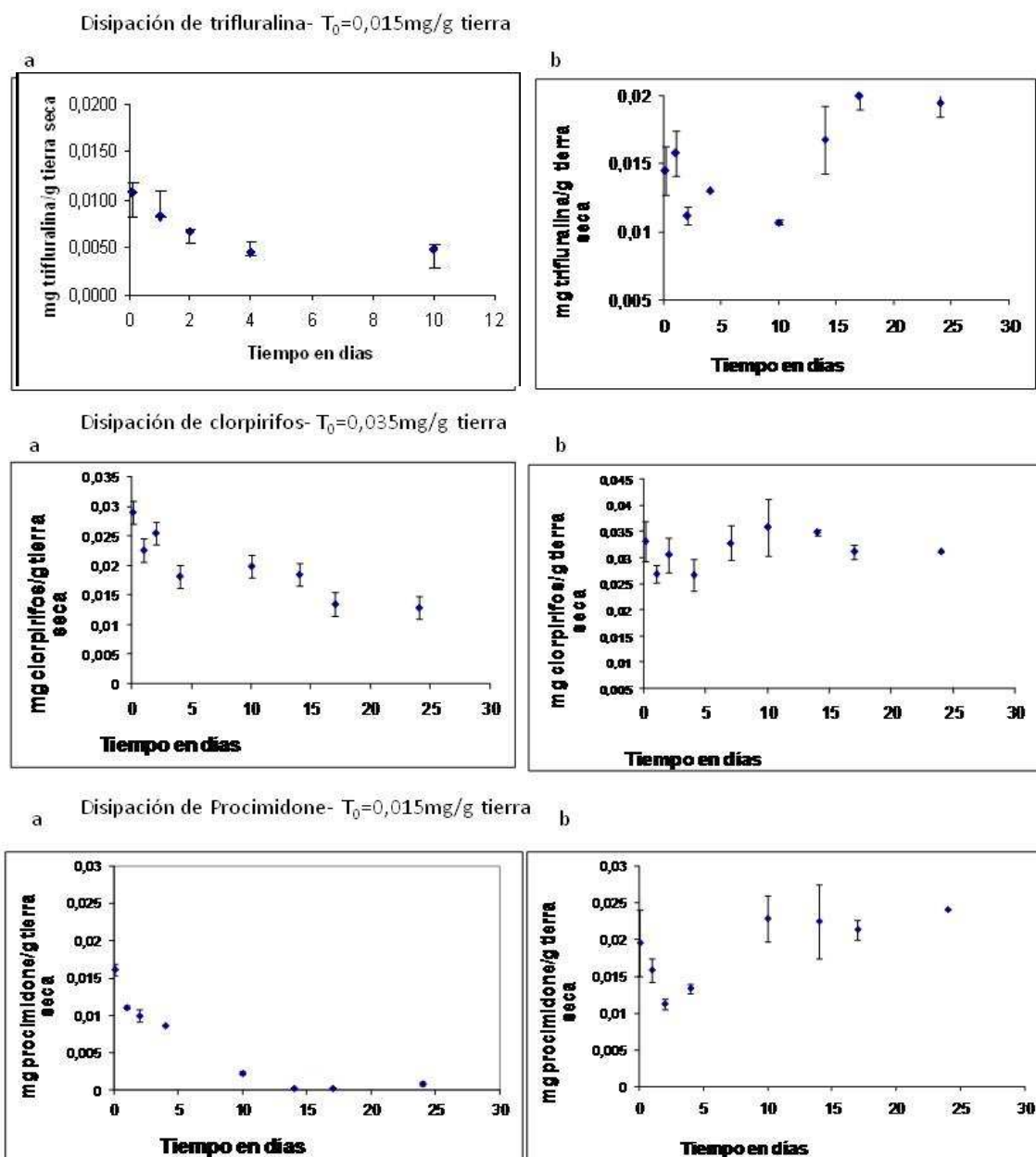


Fig 3. 4: Disipación de trifluralina, clorpirifós y procimidone en (a) tierra de huerta y (b) tierra de referencia. Dosis 0,015-0,035 mg/g tierra

Se realizaron simultáneamente los ensayos de control de biomasa microbiana, mediante la medición de la respiración del suelo realizada en forma paralela al ensayo de degradación para los mismos intervalos de tiempo. La figura 3.5 presenta los valores de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

respiración microbiana para suelos expuestos a los plaguicidas y para los suelos controles. Es interesante señalar que no se observan diferencias significativas entre la respiración microbiana del suelo de huerta y las de los suelos referencia a lo largo de 24 días. Sin embargo, se puede observar que en los primeros intervalos después de la aplicación del pulso de plaguicidas, los valores de respiración aumentan para el suelo de huerta, coincidiendo con una marcada disminución de la concentración de los plaguicidas (Fig. 3.4), lo que podría explicarse teniendo en cuenta el proceso de metabolización de estos xenobióticos. Es así que los valores de respiración parecen indicar un estrés asociado con el pulso inicial de los productos (Fig. 3.5), que luego es superado por la población microbiana. Este efecto se pone en evidencia teniendo en cuenta que a las 2 horas luego de la aplicación de los productos, el suelo de huerta presentó un valor para la respiración de 3,19 mg de CO₂/g de tierra mientras que antes de la aplicación del pulso inicial de plaguicidas los valores oscilaban alrededor de 2,70 mg de CO₂/g de suelo.

Para verificar el efecto de la concentración de los productos aplicados, se realizó un nuevo experimento en el cual se incrementó la dosis aplicada en el pulso inicial en un segundo ensayo. Este aumento de la cantidad de plaguicida podría alterar la capacidad biodegradativa de los microorganismos. Fang Hua, et al, (2009) observó que a medida que se incrementa la dosis, más es el tiempo que tarda el producto en disiparse del ambiente.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

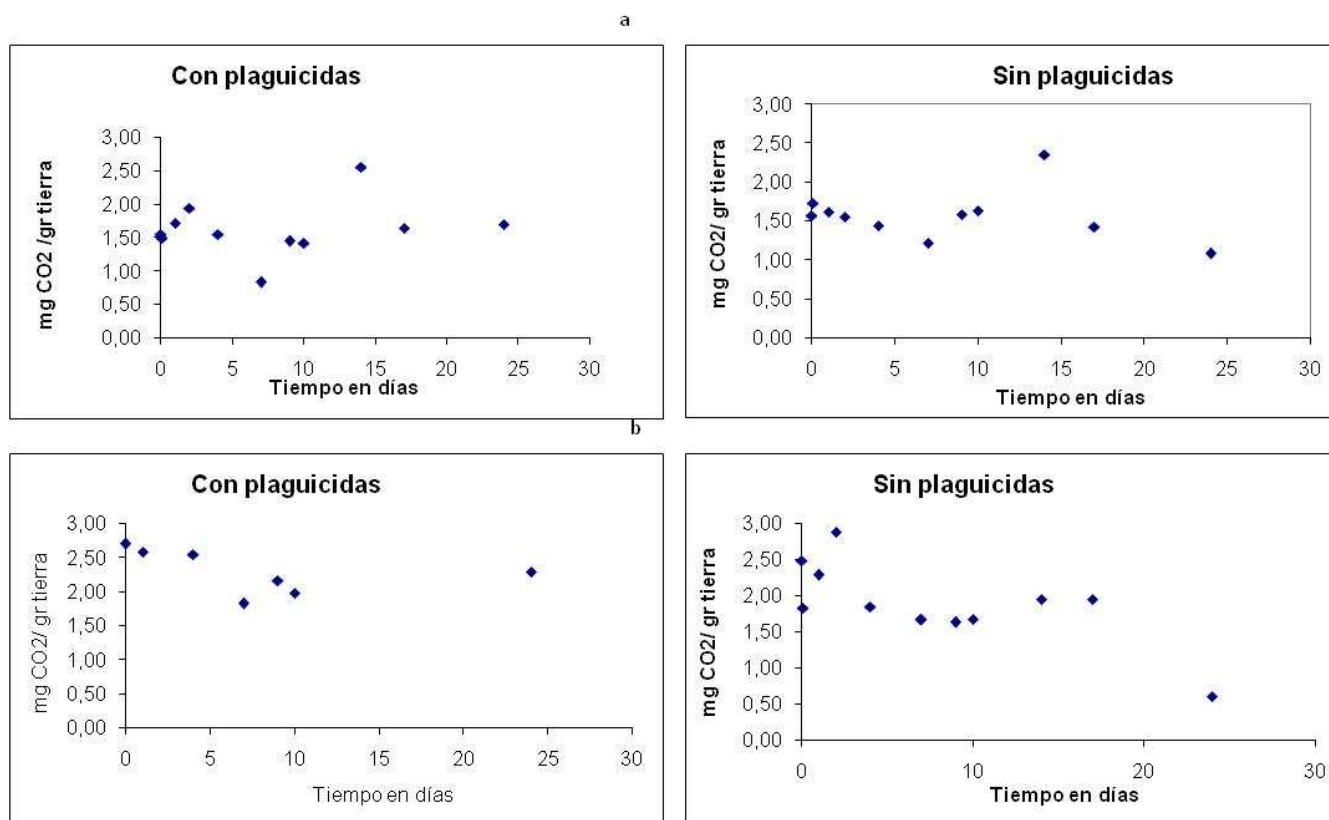


Fig 3. 5: Respiración microbiana en tierra de referencia (a) y tierra de huerta (b). Dosis 0,015-0,035 mg/g tierra

En esta segunda experiencia se incrementó un orden la dosis aplicada de clorpirifós, procimidone y trifluralina, siendo ésta de 0.111 mg/g -0.200 mg/g de suelo seco. Cabe destacar que, en este caso, se agregó un control adicional llamado “eucalipto” para evaluar la capacidad degradativa de este suelo que había resultado tener una respiración alta (y presumiblemente una alta masa microbiana).

En las figuras 3.6, 3.7 y 3.8 se pueden observar los gráficos de degradación obtenidos para este segundo ensayo con trifluralina, clorpirifós y procimidone respectivamente, para los distintos tiempos de medición de la concentración de plaguicidas y para las diferentes muestras de suelo (huerta, referencia y eucalipto).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

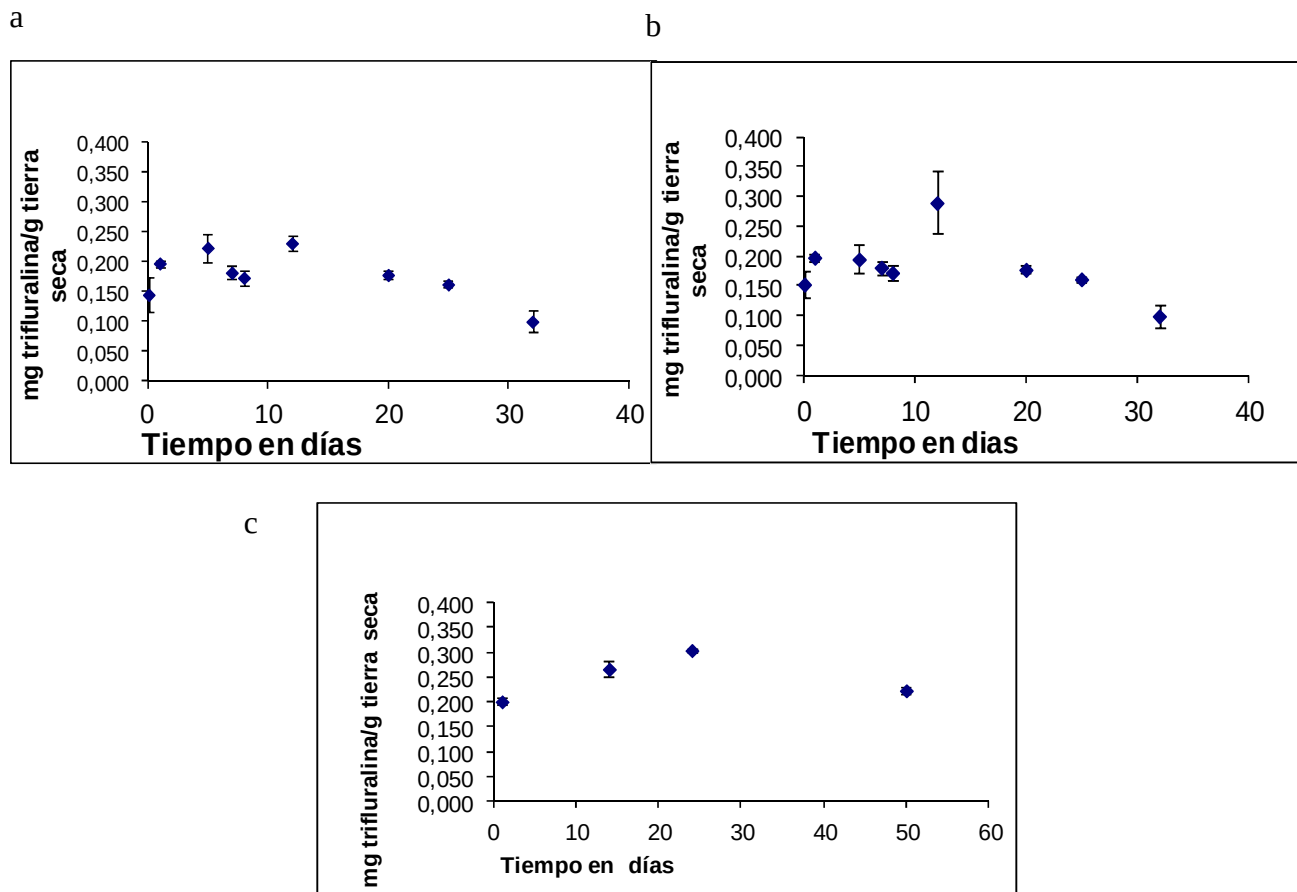


Fig 3. 6: Disipación de Trifluralina en (a) tierra de huerta, (b) tierra de referencia y (c) tierra de eucalipto. Dosis 0,200 mg/g tierra seca

Utilizando cantidades dosis mayores de plaguicidas, las cinéticas de degradación son diferentes al caso anterior. Se observa que clorpirifós es degradado tanto en la muestra proveniente de huerta como en la de referencia aproximadamente en un 70 % en 30 días mientras que solo un 33% es degradado en "eucalipto". Con procimidone no es muy clara la tendencia en las tres muestras; los gráficos muestran un perfil relativamente constante en cuanto a la cantidad de producto. Si se toma en cuenta el estado inicial y el final se puede decir que en el caso de procimidone la reducción de la cantidad de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

producto fue en un 50% transcurridos mas de 30 días mientras que en trifluralina, durante el mismo período de tiempo, fue del 57% aproximadamente.

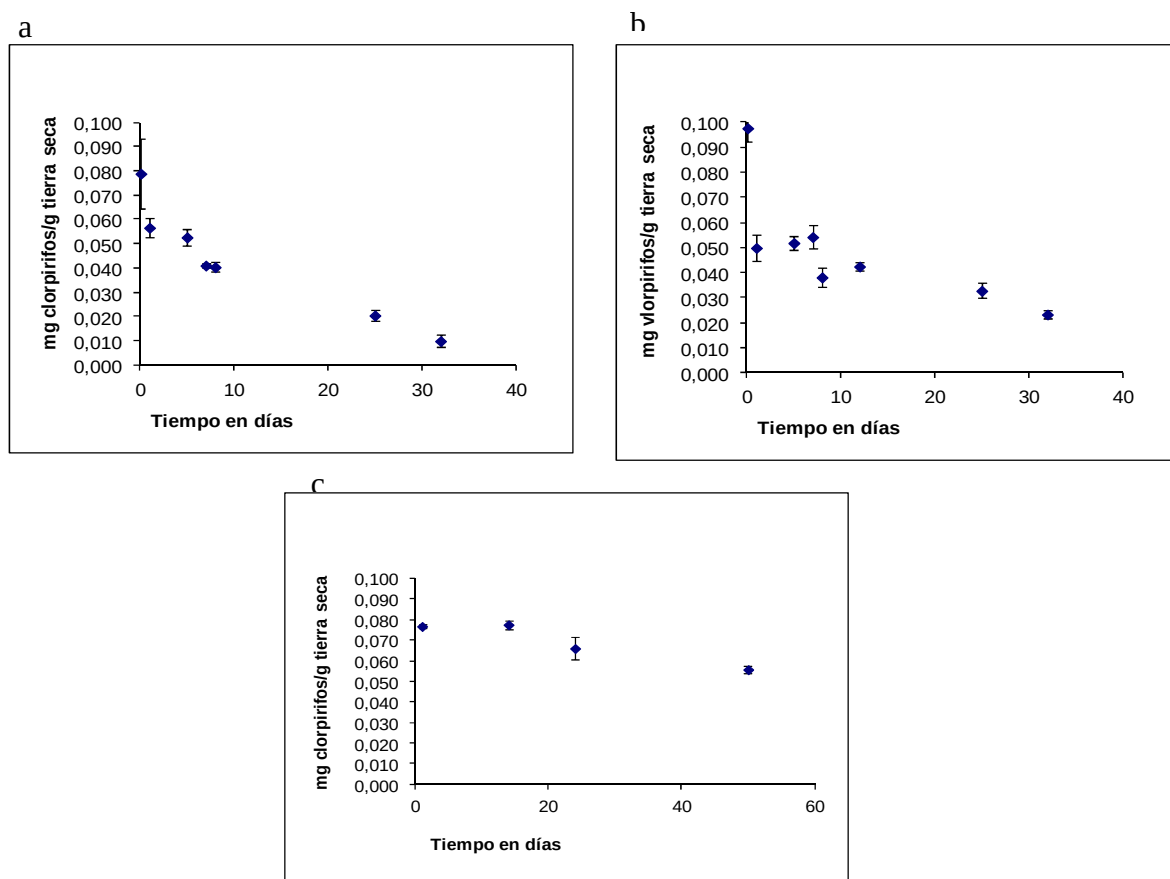


Fig 3. 7: Disipación de clorpirifós en (a) tierra de huerta, (b) tierra de referencia y (c) tierra de eucalipto. Dosis 0,15 mg /g tierra

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

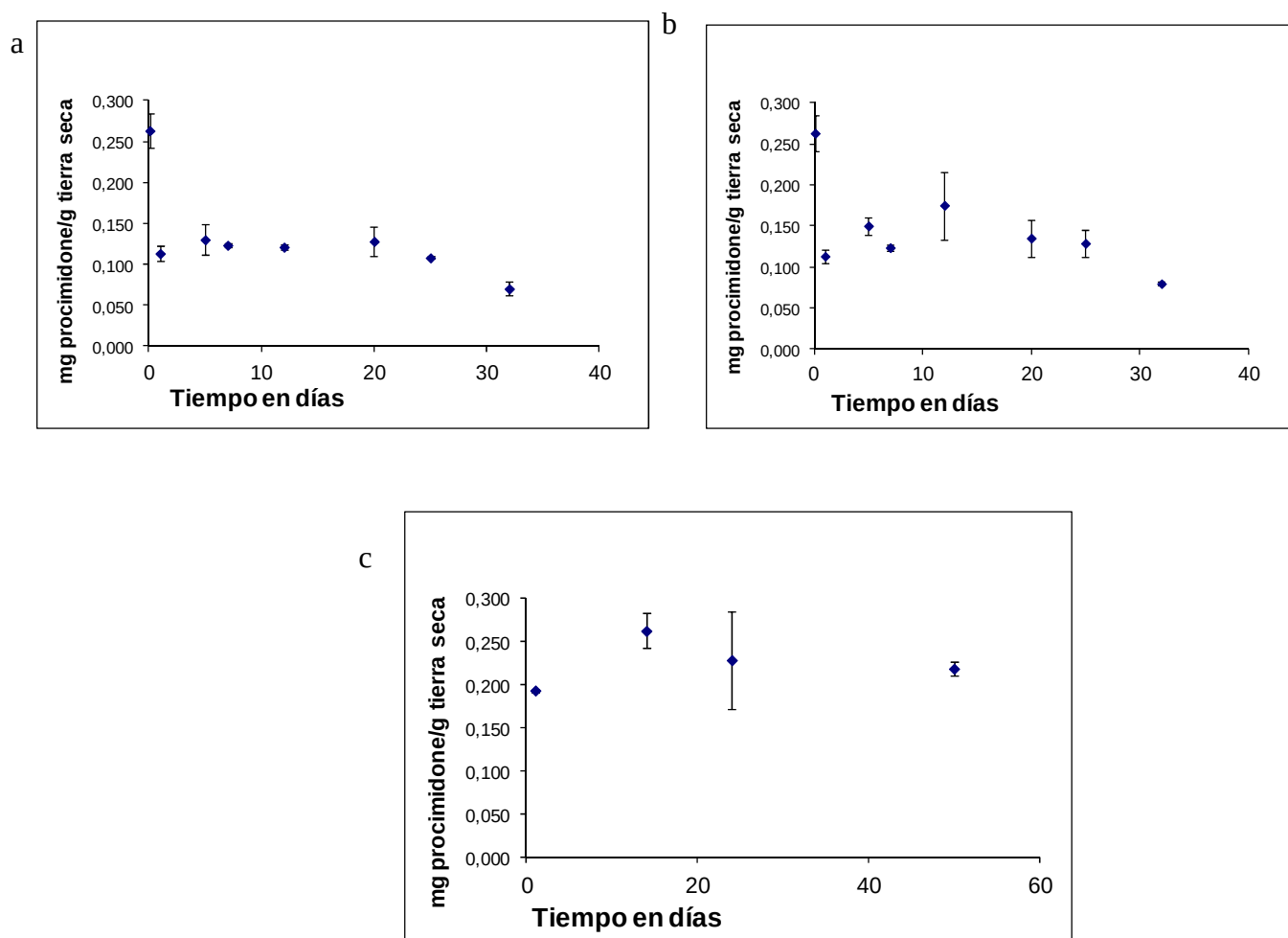


Fig 3. 8: Disipación de procimidone en (a) tierra de huerta, (b) tierra de referencia y (c) tierra de eucalipto. Dosis 0,20 mg/g tierra

Comparando los resultados de estas experiencias con los valores del experimento de degradación a dosis más bajas, se puede concluir que a mayor dosis aplicada, más lenta es la disipación de los productos. Esto es consistente con lo que otros autores observaron, como es el caso de Fang Hua et al (2008). Conocer la velocidad de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

degradación en relación con la cantidad de biomasa microbiana presente, es importante y es complementario ya que los plaguicidas tienen efectos tóxicos evidentes sobre los microorganismos. De acuerdo con Lian-Kuet Chan et al (2010), la estructura, la temperatura y la población microbiana son variables críticas que afectan la degradación. Esto explicaría, en parte, por qué al aumentar la dosis aplicada de clorpirifós, trifluralina y procimidone no se puede observar en el intervalo de tiempo dado, una cinética de degradación más rápida como la observada en el primer ensayo.

Para el experimento en el cual se incrementó en un orden la dosis aplicada, además de evaluar la biomasa microbiana a través de la medición de la respiración (Fig. 3.9), se realizó un recuento de bacterias aerobias heterótrofas totales. Este recuento se realizó en las tres muestras (huerta, referencia y eucalipto) en paralelo a los ensayos de degradación y biomasa microbiana. Cabe destacar que las muestras destinadas a estos ensayos microbiológicos recibieron el mismo tratamiento que las demás, es decir, un pulso inicial de plaguicidas (dosis 0,111-0,200 mg/g tierra) y la incubación para realizar el recuento también fue a tiempos fijos antes y luego de la aplicación inicial.

Los resultados de las mediciones de biomasa mostraron diferencias entre las muestras que recibieron agregados de plaguicidas y las que no, pero no se encontraron diferencias entre las muestras con distinta procedencia (Fig. 3.9). Sin embargo, cuando se realizó el recuento, se pudo observar un descenso en las UFC/g de suelo al aplicar los plaguicidas (Fig. 3.10), disminución que no se repite en el caso de las mediciones de respiración.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

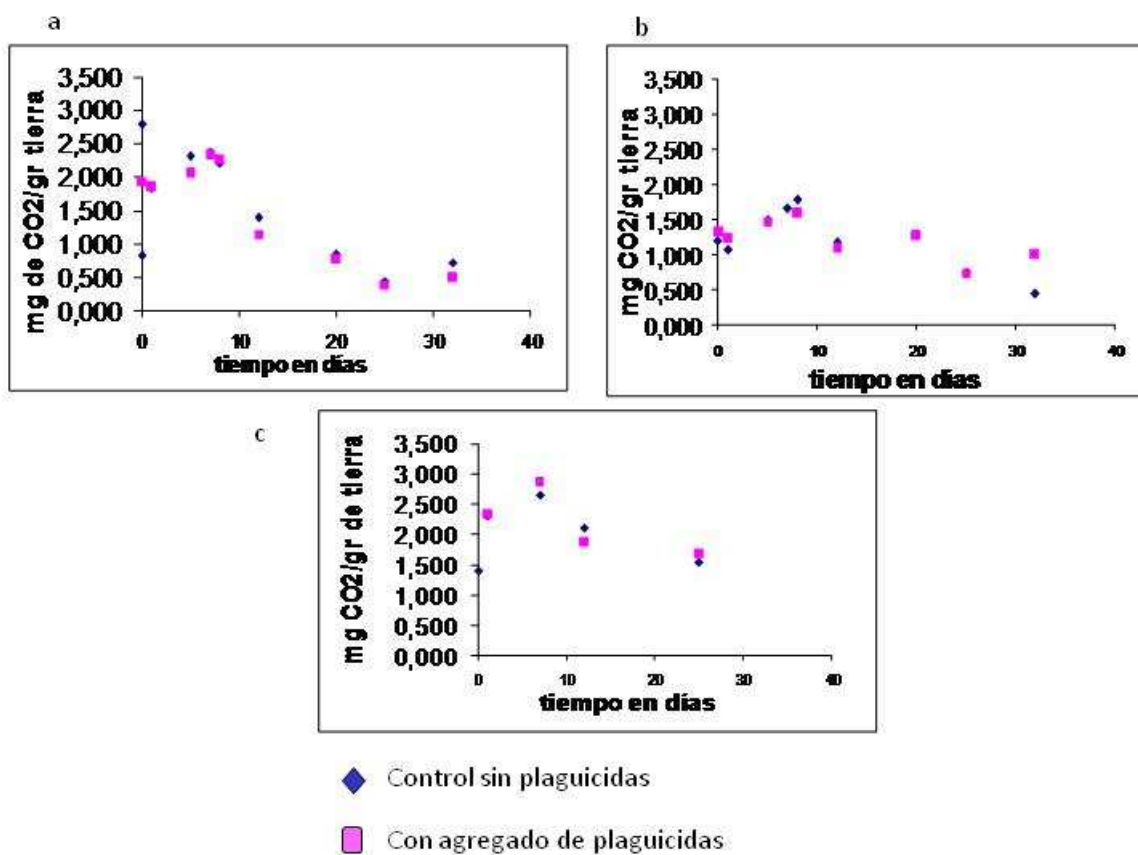


Fig 3. 9: Respiración microbiana en tierra de huerta (a), tierra de referencia (b) y tierra de eucalipto (c). Dosis: 1,15-0,20 mg/g tierra

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

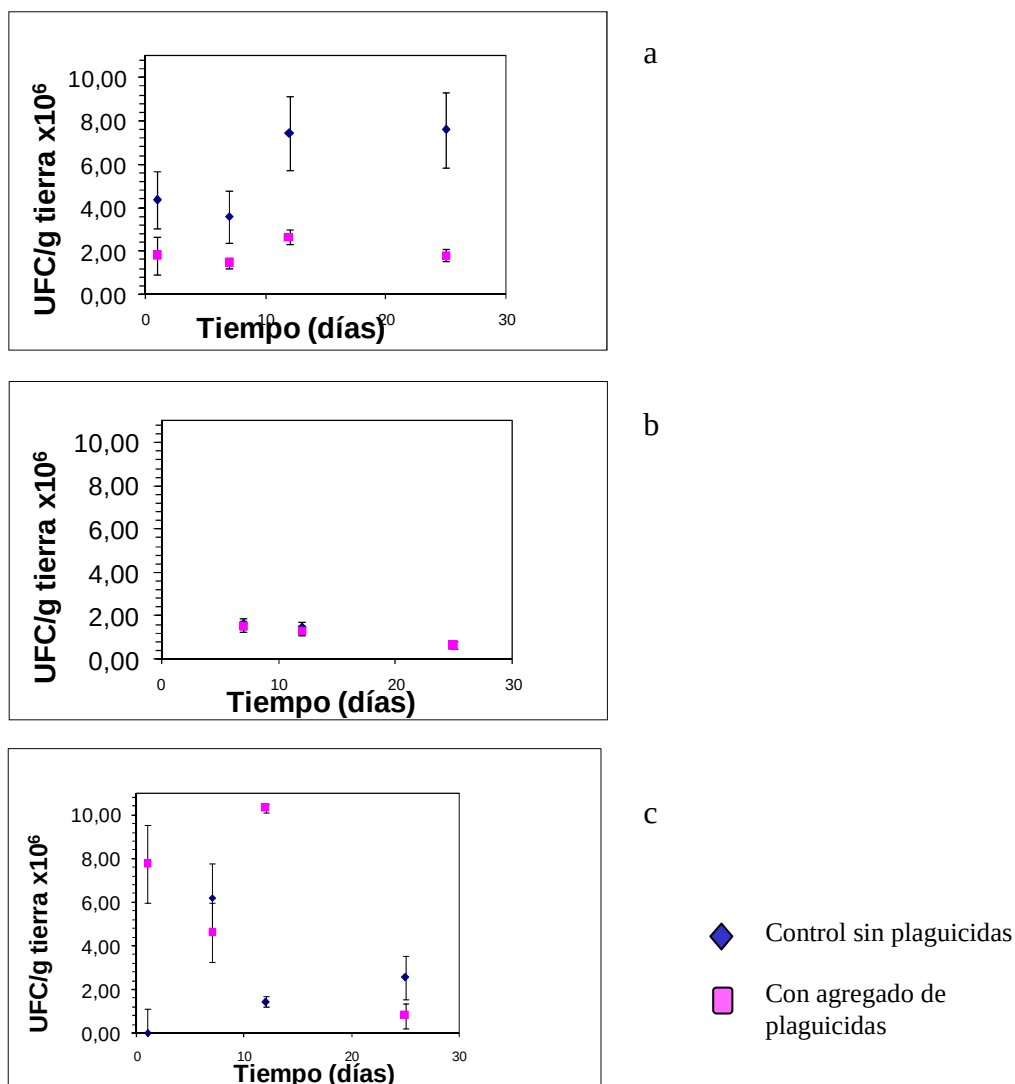


Fig 3. 10: Recuento de bacteria heterótrofas aerobias totales en tierra de huerta (a), tierra de referencia (b) y tierra de eucalipto (c). Dosis: 0,15-0,20 mg/g tierra

Como se observó en los resultados de biomasa del primer ensayo de degradación, el pulso inicial de plaguicidas provocó un nivel de estrés en los microorganismos. En la Figura 3.5 se observa que luego de transcurridas dos horas desde la aplicación de los plaguicidas, para el suelo hortícola la cantidad de dióxido de carbono detectada es poco menos del doble que en el control, y luego de un día desde el pulso inicial, tanto el control

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

como el suelo con plaguicidas igualan los valores de medición de biomasa. En el caso donde se aplicó una dosis un orden mayor ocurre que, luego de la aplicación, disminuye la biomasa en los suelos con plaguicidas frente a los controles. Cabe recordar que, antes de incorporar a los suelos los productos, se realizó un ensayo de medición de biomasa microbiana para poder comparar los efectos luego de la aplicación de los plaguicidas. Se pudo observar que, en el caso de la tierra de huerta, antes del pulso inicial los valores eran de 0,822 mg CO₂/g tierra, luego de dos horas de la aplicación la respiración aumentó a 1,939 mg CO₂/g tierra. Por otro lado, la muestra de huerta que recibió un agregado de agua destilada en lugar de plaguicidas, para el mismo tiempo de incubación arrojó como resultado 2,797 mg CO₂/g tierra. Luego de un día de la incorporación de los tres productos, la muestra de tierra de huerta que tenía el pulso inicial con plaguicidas ya presentaba una disminución de los valores en aproximadamente en 0,100 mg CO₂/g tierra.

Probablemente, la diferencia entre la respuesta del primer y segundo ensayo tenga que ver con el nivel de toxicidad aportado por los productos al aumentar la dosis en un orden. Está reportado que el producto de degradación del clorpirifós, el tricloropiridinol (TCP) posee efectos bactericidas. Se han realizado análisis en laboratorio con bacterias del género *Pseudomonas* en medios líquidos en presencia de TCP donde se identificaron los efectos tóxicos de este metabolito (Fang Hua et al, 2009). Sin embargo, a los cinco días luego de la aplicación la biomasa de los suelos que recibieron los productos se iguala con la de los controles. Esto demostraría que la población de microorganismos es resiliente y que la biomasa posee mecanismos para soportar el impacto de estos productos.

Se sabe que los plaguicidas en dosis concentradas poseen un efecto inhibitorio sobre los microorganismos del suelo (Fang Hua et al, 2008), pero también se sabe que el género *Pseudomonas* tolera altísimas concentraciones de plaguicida (Ahemad et al, 2011). Chu Xia Oqiang et al (2007) también observó que el clorpirifós tiene un efecto de inhibición/estímulo sobre los microorganismos viendo que, tras su aplicación, la población de microorganismos se reducía a un 44,1% y, luego de 14 días se registraba un aumento

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

que alcanzaba aproximadamente los valores anteriores a la aplicación del insecticida. Esto es consistente con los datos expuestos en la figura 3.10, donde para tierra de huerta se observa un descenso en la UFC/g suelo, luego de la aplicación de los tres productos, frente a la muestra control. Se puede ver también, que días después se registró un leve ascenso. En suelo de eucalipto se observa una tendencia similar donde la muestra con agregados de plaguicidas registra un descenso en la cantidad de UFC/g suelo frente a la muestra control. En el caso de la referencia no se observan diferencias significativas entre lo registrado para el suelo control y para la muestra con agregados de los tres plaguicidas.

Se mencionó y discutió en párrafos anteriores las diferencias en la disipación de los mismos productos aplicados en diferentes dosis. Además se asoció esta cinética a la actividad de las bacterias quienes estarían utilizando los productos como fuente de carbono. Sumado a esto, se observó que en suelo de huerta la disipación es mayor respecto a los suelos de referencia y de eucalipto, probablemente asociada a la degradación microbiana dado que los recuentos y aislamientos probaron que en dicho suelo existían bacterias más tolerantes a los plaguicidas utilizados que en las otras muestras. En base a esto, se podría concluir que las bacterias de suelo hortícola están adaptadas a la aplicación de plaguicidas, es decir, poseen mecanismos de adaptabilidad que les permiten utilizar plaguicidas para su metabolismo dadas las repetidas aplicaciones. En relación con este aspecto, Arbeli & Fuente (2007) observaron que en suelos donde existen repetidas aplicaciones de productos fitosanitarios se produce un aumento en la velocidad de degradación de los plaguicidas. Esto es conocido como degradación acelerada y es lo que podría estar ocurriendo en los suelos de la huerta estudiados. Estos autores sostienen que mediante la formación de estructuras de resistencia los microorganismos pueden soportar las condiciones adversas y utilizar los plaguicidas como una fuente continua de sustrato. Este crecimiento bacteriano a costa de los agregados de productos para la producción también está asociado y condicionado por factores ambientales; siendo el pH el factor más importante para el crecimiento de estos

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

organismos.

Por último, en relación a lo tratado en la sección 3.1, se puede decir que los resultados observados en este caso son contrarios a las afirmaciones hechas por Kah et al (2007) quien afirma que hay una correlación positiva entre la materia orgánica y la velocidad de degradación para casi todos los plaguicidas, y que esa correlación es mayor cuando se usaron los productos en una única mezcla de aplicación. En el caso por nosotros estudiado se pudo observar que si bien "referencia" tiene mayor porcentaje de materia orgánica, la velocidad de degradación es mayor en "huerta"; esto implica que hay que evaluar no sólo la materia orgánica sino también la comunidad microbiana y su funcionalidad en cada suelo. En este sentido, Steenwerth et al (2002) obtuvo resultados más concordantes con los de este trabajo, encontrando diferencias en la composición de la comunidad microbiana relacionadas mayormente con la biomasa, el pH y factores tales como fertilizantes, herbicidas e irrigación.

3.2.2- Cinética de degradación de plaguicidas en función de los sitios muestreados

En esta etapa se buscó identificar si existían diferencias para la degradación de los plaguicidas en función de los diferentes sectores de la huerta. La motivación inicial para realizar este ensayo parte de que, según lo comentado por el productor, cada uno de los sectores tenía una historia diferente en cuanto a rotación de cultivos y tratamiento para los mismos. Es decir, si la historia productiva de cada sector era diferente, esto tal podría alterar los tiempos de degradación aún considerando que las propiedades físicoquímicas no presentaban diferencias significativas entre sectores.

Cabe recordar que al principio se realizaron ensayos para estudiar si existía heterogeneidad en cuanto a las propiedades biológicas físicas y químicas entre diferentes puntos de la misma huerta. Como resultado se obtuvo que las diferencias no eran significativas y por tal motivo para los subsiguientes ensayos de degradación las muestras

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

de distintos sitios del campo se consolidaron en una sola que se denominó “huerta”. En el caso de este nuevo ensayo no se consolidó el suelo sino que el interés fue estudiar en forma sectorizada la capacidad degradativa, de forma de poder evaluar si se verificaba la hipótesis inicial sobre la homogeneidad en el comportamiento de los distintos sectores de la huerta.

En el apartado 3.2.1, se discutió la rápida degradación de los productos fitosanitarios en los primeros 15 días cuando la dosis era 0,015-0,035 mg/g suelo. Luego de los primeros 15 días, la disminución relativa era menor y hacia el día 30 se notaba la tendencia a la desaparición total de los plaguicidas. En base a estos resultados se diseñó una experiencia para evaluar la cinética de degradación de los plaguicidas de acuerdo a los diferentes sitios dentro de la huerta, es decir, estudiar la cinética en función del punto muestreado en campo conociendo qué se cultivó en cada sitio en las dos últimas temporadas. En la Figura 3.11 se puede observar el plano de la huerta, dentro de los sectores en cada polígono se observan los puntos de muestreo para este experimento, seleccionando siete sitios en total dentro de la huerta. Como se dijo anteriormente, la hipótesis inicial en esta experiencia fue que la capacidad degradativa del suelo en los diferentes sitios podría variar, dada la historia de uso. Por esta razón en la Figura 3.11 y en el análisis de los resultados se incorporó, para cada punto de muestreo, el cultivo encontrado en el momento de toma de muestras, siendo “1º” el primer muestreo y “2º” la segunda campaña. Por otro lado, así como se consideró en el resto de los ensayos, se muestreó la tierra “referencia” (Ref).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

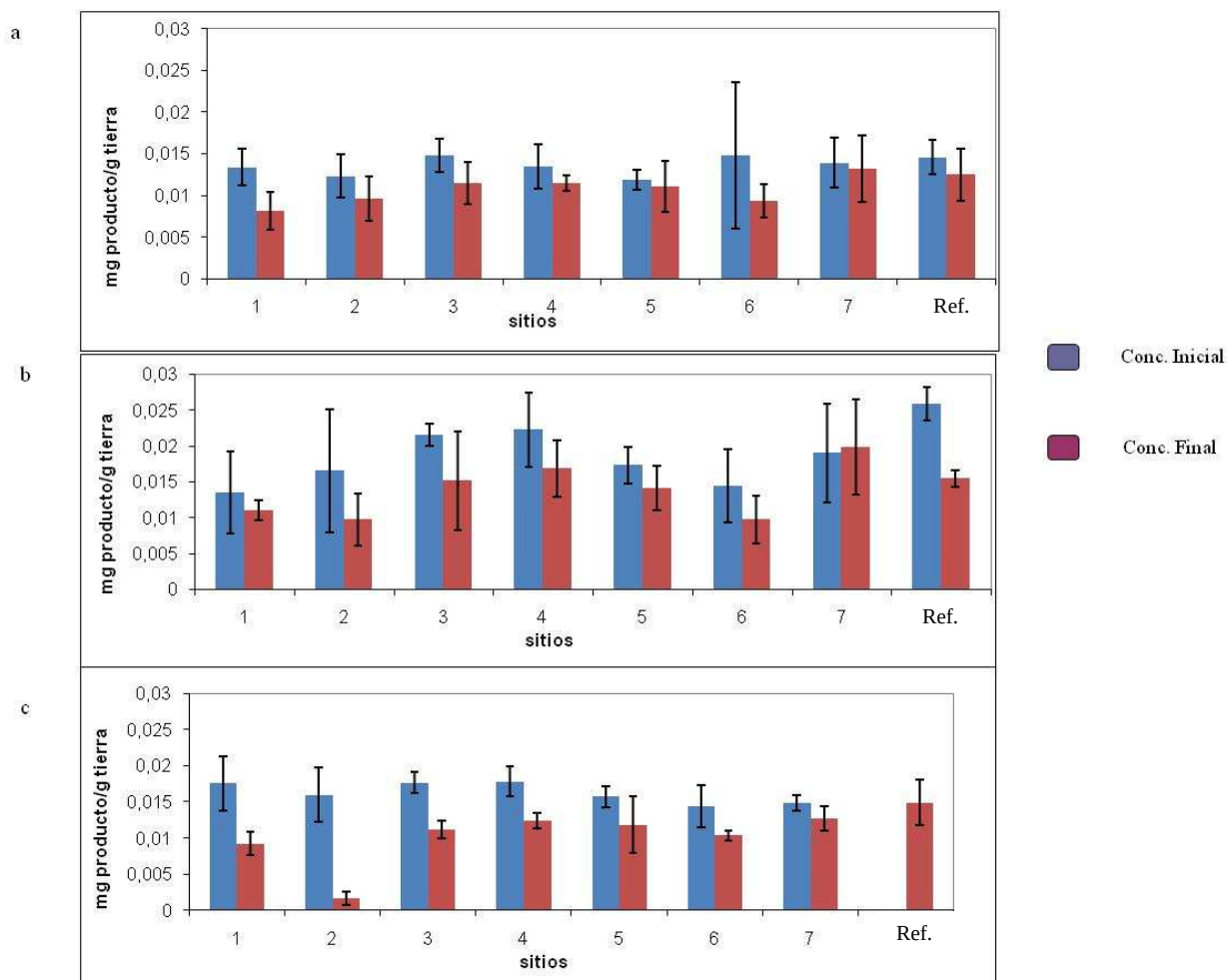


Fig 3. 12: Degradación por sitios de trifluralina (a), procimidone (b) y clorpirifós (c)

En cuanto al clorpirifós, sobresale el sitio 2 (Fig 3.12 c) para el cual la desaparición del producto fue casi total; por otro lado, cabe destacar que no se pudo medir la concentración inicial de clorpirifós en el punto Ref. por errores de procedimiento. En general los promedios de los valores de degradación en todos los puntos presentan menor tasa de desaparición de trifluralina (Fig. 3.12a), contrariamente a lo que se podría conjeturar dado que la trifluralina está reportada como producto volátil (Bellinaso et al, 2003; Beidos et al 2006) y se esperaría que se registren menores cantidades presentes en el suelo pasados los 15 días.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Por otro lado, se registraron sitios donde la trifluralina, el procimidone y el clorpirifós disminuyeron su concentración en proporciones similares. Este es el caso de los sitios 3 y 6.

Por último, se observa que el insecticida clorpirifós fue el que presentó mayor porcentaje de degradación, en comparación con los otros dos productos, en función de lo que se observa en el sitio 2 (Fig 3.12c). Por otro lado, si bien los sitios 4, 5 y 6 se hallan cercanos en el mapa (Fig. 3.11) tienen historias de usos diferentes. Sin embargo, no presentaron capacidades para degradar los plaguicidas significativamente diferentes, o al menos las prácticas de cultivo ensayadas en los sectores no incidieron en la capacidad de degradación de los plaguicidas ensayados.

En el caso del sitio Ref., se observa que el procimidone fue degradado en un 40% mientras que trifluralina solo se degradó en alrededor de un 20%. En dicho sitio, al tratarse de la tierra de referencia, se habría esperado que la capacidad degradativa no sea alta ni tampoco significativamente diferente entre los productos como ocurrió en los experimentos de degradación analizados en la sección 3.2.1 donde se observó que en el suelo de huerta (en ese caso una mezcla de suelo proveniente de los diferentes sectores conformaban la muestra) los productos se degradaban en menor tiempo que en la tierra referencia.

Se puede concluir esta sección indicando que parece no existir una gran diferencia en la capacidad degradativa de los suelos cuando se tiene en cuenta muestras tomadas en diferentes puntos de la huerta que tuvieron historias productivas diferentes. Este hecho es coincidente con lo observado en el estudio de las propiedades materia orgánica, respiración, pH, densidad, y conductividad en función de la posición, siendo prácticamente sólo el valor de fósforo total y la capacidad de retención de agua las propiedades que mostraban una dependencia posicional.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

3.3- Enriquecimiento y aislamiento de bacterias

3.3.1- Clorpirifós, procimidone y trifluralina

A partir del enriquecimiento con clorpirifós, procimidone y trifluralina, siete cepas fueron aisladas del suelo hortícola, y dos del de referencia. Todas ellas fueron caracterizadas como Gram negativas, por lo que luego se les realizó la caracterización bioquímica API20E (Tabla 3.3). De esta última caracterización, se obtuvo que las nueve cepas aisladas pertenecen al género *Pseudomonas* con una aproximación aceptable. Con menor discriminación, algunas cepas podrían responder al género *Bordetella*, *Alcaligenes*, *Moraxella* u *Ochrobactum* (Tabla 3.4). La Fig. 3.13 presenta a manera de ejemplo las colonias en una placa de enriquecimiento.

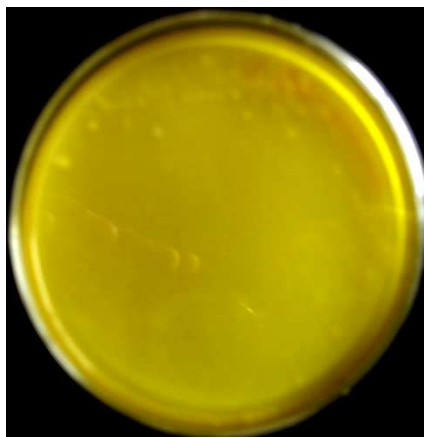


Fig 3. 13: Crecimiento en placa enriquecida con clorpirifós, trifluralina y procimidone en sus formulaciones comerciales

Se puede observar una clara diferencia entre el número de cepas aisladas desde el suelo de la huerta y desde el suelo referencia, utilizando como única fuente de carbono los productos comerciales con clorpirifós, trifluralina y procimidone juntos. En las tablas 3.3 y 3.4 se observan los resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas denominadas Hu 2, Hu 3, Hu nvo 2, Hu nvo 3, Hu nvo 4, PCA Hu 1 y PCA Hu 2, las cuales se aislaron de los suelos de huerta; y Al nvo 1 y Al nvo 2, que fueron aisladas del suelo de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

referencia. Esta diferencia en el número de cepas aisladas refuerza aún más la hipótesis realizada en la sección 3.2 acerca de que existe una adaptación de las bacterias propias del suelo de la huerta como consecuencia de la presión de selección dada por la aplicación de los productos fitosanitarios. Esta circunstancia genera un cambio en la comunidad bacteriana del suelo de huerta; no es casualidad que las cepas en su mayoría pertenezcan al género *Pseudomonas* ya que son bacterias muy versátiles en términos de diversidad metabólica y estrategias de supervivencia en diferentes ambientes. Es sabido que éstas son las responsables de la degradación de productos organofosforados (Chamika et al, 2011).

Tabla 3.3: Caracterización bioquímica API20E

Ensayo	Cepa								
	Hu 2	Hu 3	Hu nvo 2	Hu nvo 3	Hu nvo 4	Al nvo 1	Al nvo 2	PCA Hu 1	PCA Hu 3
ONPG ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH ²	-	+	-	-	-	-	-	+	+
LDG ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODG ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT ⁵	+	+	-	+	+	-	+	+	+
H ₂ S ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE ⁷	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TDA ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP ¹⁰	+	+	+	+	+	+		+	+
GEL ¹¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU ¹²	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MAN ¹³	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR ¹⁵		-	-	-	-	-	-	-	-
RHA ¹⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC ¹⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEL ¹⁸	+	+	+	+	+	-	+	+	+
AMY ¹⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA ²⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX ²¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₂ ²²	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₂ ²³	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹β-galactosidasa, ²Arginina dehidrolasa, ³ Lisina descarboxilasa, ⁴Ornitina decarboxilasa, ⁵Utilización de citrato, ⁶ producción de H₂S, ⁷Ureasa, ⁸Triptofano deaminasa, ⁹Producción de indol, ¹⁰Producción de acetoina, ¹¹Gelatinasa, ¹²Fermentación/ oxidación (glucosa), ¹³Fermentación/ oxidación (manitol), ¹⁴Fermentación/oxidación (inositol), ¹⁵Fermentación/oxidación (sorbitol), ¹⁶Fermentación/oxidación (ramnosa), ¹⁷Fermentación/ oxidación (sacarosa), ¹⁸Fermentación/oxidación (melibiosa), ¹⁹Fermentación/oxidación (amygdalyn), ²⁰Fermentación/oxidación (arabinosa), ²¹Citocromo oxidasa, ²²Producción de NO₂, ²³Reducción del gas N₂

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Estos resultados se condicen con lo discutido en la sección anterior, a partir de la observación que en el suelo proveniente de la huerta la degradación de clorpirifós, trifluralina y procimidone es más eficiente que en suelos no utilizados para la producción hortícola (referencia y eucalipto). Este resultado coincide con lo que se sabe acerca de que los plaguicidas disminuyen la diversidad microbiana y aumentan la diversidad funcional de las comunidades (Hussain et al, 2009). Chen et al (2001) postula que los fungicidas, al eliminar o inhibir el crecimiento de los hongos, conduce a un aumento de la actividad bacteriana. Esto puede influenciar la supervivencia de la población degradadora promoviendo el desarrollo de la degradación acelerada (Arbelli y Fuentes, 2007).

Tabla 3.4: Interpretación de resultados API 20E

Hu 2	<i>Pseudomonas putida</i>
Hu 3	<i>Pseudomonas putida</i>
Hu nvo 2	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
Hu nvo 3	<i>Pseudomonas putida</i>
Hu nvo 4	<i>Pseudomonas putida</i>
Al nvo 1	<i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella</i>
Al nvo 2	<i>Pseudomonas putida</i>
PCA Hu 1	<i>Pseudomonas putida</i>
PCA Hu 3	<i>Pseudomonas putida</i>

Por otro lado, la biodegradación depende de un conjunto complejo de factores como el clima y diferentes propiedades edáficas que favorecen el metabolismo bacteriano. El suelo a temperaturas cálidas, estructura adecuada y presencia de materia orgánica generalmente promueve la actividad microbiana y, consecuentemente, el potencial metabolismo de plaguicidas (Helting et al).

3.3.2- Evaluación de consorcios

Las bacterias pueden existir conviviendo con un conjunto muy grande de especies diferentes en un mismo ecosistema, funcionando como consorcio. Esto es posible porque

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

tienen un comportamiento en el cual todas cooperan para la supervivencia. Esa cooperación puede consistir en la degradación de un producto cuyo metabolito le sirve a otra cepa microbiana para su nutrición, y esto se repite en multitud de etapas y microorganismos, favoreciendo así la desaparición de las sustancias aplicadas a la huerta.

Con el objetivo de evaluar esa interacción en las cepas aisladas del suelo de la huerta mediante el enriquecimiento, se realizó un ensayo de evaluación de consorcios microbianos, cuyos los resultados son expuestos en la Tabla 3.5. La experiencia consistió en hisopar una placa con una cepa (césped) y luego incorporar las demás cepas en forma localizada aplicando una gota con una pipeta automática (inóculo).

Las cepas llamadas *Hu nvo 2*, *3* y *4* no inhibieron el crecimiento de ninguna otra cuando estaban incorporadas como césped. Sin embargo, *Hu nvo 2* se vió inhibida cuando la *PCA hu 1* y *2* se encontraban como césped. *Hu nvo 3* y *4* presentaron crecimiento leve frente a *Hu 2* y *3* en césped. Tanto *Hu 2* como *Hu 3* inhibieron o dificultaron el crecimiento de las demás cepas al encontrarse como césped de la placa. Por lo tanto, *Hu 2* y *Hu 3* no serían apropiadas para formar consorcio con las demás dado que dificultaron el crecimiento de las demás sobre ellas. No obstante *Hu nvo 2*, *3* y *4* mostraron un comportamiento que podría ser óptimo para conformar un consorcio entre ellas.

Tabla 3.5: Ensayo de compatibilidad de cepas aisladas de suelo de huerta

Inóculo/ Césped	pca Hu1	pca Hu3	Hu nvo2	Hu nvo3	Hu nvo 4	Hu2	Hu3
pca Hu 1		+	+	+	+	crec leve	crec leve
pca Hu 3	+		+	+	+	crec leve	crec leve
Hu nvo2	Inhib	Inhib		+	+	+	+
Hu nvo3	+	+	+		+	crec leve	crec leve
Hu nvo4	+	+	+	+		crec leve	crec leve
Hu2	Inhib	Inhib	+	+	+		inhib
Hu3	+	+	+	+	+	+	

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

3.3.3- Endosulfán

El endosulfán es un plaguicida con una alta vida media en el ambiente, por lo que la búsqueda de microorganismos naturales capaces de degradarlo es un objetivo relevante. Mediante la realización de un nuevo enriquecimiento realizado con Lorsban y luego con endosulfán puro se pudieron aislar tres cepas nombradas *huen 1*, *huen 2* y *huen 3* capaces de degradar este plaguicida. Las cepas fueron aisladas del suelo de la misma huerta que las cepas tratadas en secciones anteriores. Las tres resultaron ser Gram negativas, por lo cual fueron caracterizadas bioquímicamente usando el API20E (Tabla 3.5). Tanto *huen 1* como *huen 3* resultaron pertenecer al género *Pseudomonas* con alto nivel de discriminación, mientras que *huen 2* podría pertenecer al género *Burkholderia cepacia* con un 52% de discriminación (Tabla 3.5).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Tabla 3.6: Caracterización bioquímica API20E e interpretación para la serie de cepas Huen

Ensayo	Cepas		
	Huen 1	Huen 2	Huen 3
ONPG ¹	-	-	-
ADH ²	+	-	+
LDG ³	-	-	-
ODG ⁴	-	-	-
CIT ⁵	+	+	+
H ₂ S ⁶	-	-	-
URE ⁷	-	-	-
TDA ⁸	-	-	-
IND ⁹	-	-	-
VP ¹⁰	-	-	-
GEL ¹¹	-	+	-
GLU ¹²	-	+	+
MAN ¹³	-	-	-
INO ¹⁴	-	-	-
SOR ¹⁵	-	-	-
RHA ¹⁶	-	-	-
SAC ¹⁷	-	-	-
MEL ¹⁸	-	-	+
AMY ¹⁹	-	-	-
ARA ²⁰	-	+	-
OX ²¹	+	+	+
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Burkholderia cepacia/Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>

¹β-galactosidasa, ²Arginina dehidrolasa, ³Lisina descarboxilasa, ⁴Ornitina decarboxilasa, ⁵Utilización de citrato, ⁶producción de H₂S, ⁷Ureasa, ⁸Triptofano deaminasa, ⁹Producción de indol, ¹⁰Producción de acetoina, ¹¹Gelatinasa, ¹²Fermentación/ oxidación (glucosa), ¹³ Fermentación/ oxidación (manitol), ¹⁴Fermentación/oxidación (inositol), ¹⁵Fermentación/oxidación (sorbitol), ¹⁶Fermentación/oxidación (ramnosa), ¹⁷Fermentación/ oxidación (sacarosa), ¹⁸Fermentación/oxidación (melibiosa), ¹⁹Fermentación/oxidación (amygdalyn), ²⁰Fermentación/oxidación (arabinosa), ²¹Citocromo oxidasa.

Luego de enriquecer en endosulfán y aislarse las cepas del suelo de huerta, fue interesante observar cuál de ellas, de manera aislada, podría metabolizar el plaguicida en cuestión. Este interrogante surge dado que las cepas fueron purificadas, por lo cual la interacción con el plaguicida de manera individual de cada cepa no necesariamente correspondería al comportamiento del conjunto. En una placa de Petri, con medio mínimo en agar sin fuente de carbono, se incorporó el endosulfán con etanol pulverizándolo sobre

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

la placa y dejando evaporar luego el solvente dentro del flujo laminar encendido. Debido a las características estructurales del endosulfán, se sabe que es muy poco soluble en agua y por ello para la incorporación del producto en los medios de cultivos, ya sea en placa o líquidos, se utilizó un co-solvente; en este caso fue etanol.

Al estriar las cepas y luego de incubarlas, se observó que *huen 2* no pudo crecer en placas de Petri rociadas con endosulfán mientras que *huen 1* y *huen 3* si. Estas últimas no crecieron de igual manera, *huen 1* formaba un claro halo (Fig. 3.14b) mientras que *huen 3* mostró un crecimiento más compacto (Fig. 3.14a). La aparición de un halo, como en el caso de *huen 1*, podría significar varias cosas; no sólo que la bacteria consume de alguna forma el plaguicida, sino que también podría estar produciendo surfactantes. Considerando esta última hipótesis, el halo formado podría corresponder entonces a la disolución del plaguicida a partir del algún exudado secretado por parte de la colonia bacteriana.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

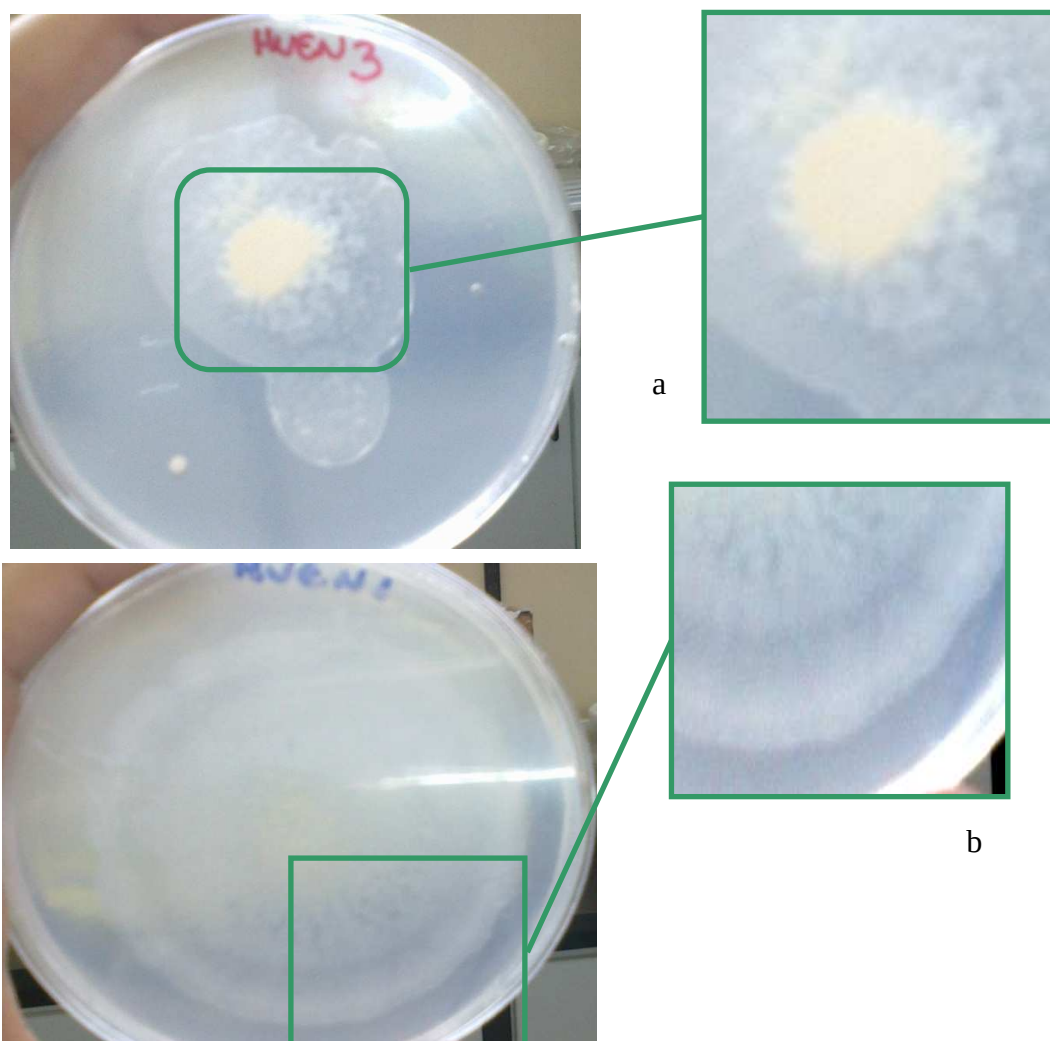


Fig 3.14 Agar con endosulfán como única fuente de C. Crecimiento de Huen 3 (a) y Huen 1 (b)

Es sabido que las bacterias pueden usar endosulfán como fuente de carbono y de azufre (Li et al, 2009), es por esto que se decidió realizar otro ensayo para evaluar el crecimiento de las dos cepas que se desarrollaron en placa. El objetivo de esto era saber de qué forma utilizaban el producto y así estimar qué posibles metabolitos se podrían formar.

Está reportado en bibliografía que el endosulfán es metabolizado por diferentes vías dando lugar a la formación de endosulfán diol o endosulfán sulfato como primeros

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

intermediarios. El diol es la especie no tóxica y las bacterias son esenciales en la formación de ese intermediario dado que el endosulfán tiene efectos inhibitorios de corta vida en hongos, aumentando así la población de bacterias (Xie, et al, 2011)

En cuanto a la utilización de endosulfan como fuente de S o C, mediante observación de los medios líquidos, se notó un mínimo crecimiento bacteriano que no alcanza para inferir el metabolismo. Sin embargo, en el análisis cromatográfico de los medios líquidos (Fig. 3.15), se observó un decrecimiento en las concentraciones de endosulfan en los sobrenadantes que podría estar relacionado con la poca solubilidad del mismo en agua.

Los co-solventes fueron seleccionados mediante una prueba de toxicidad y sabiendo que las bacterias no lo usarían como fuente de carbono en su metabolismo. Los solventes utilizados fueron di-metil-formamida en el caso de *Huen 1* y metanol en el caso de *Huen 3*. Sin embargo, la solubilidad del plaguicida no varió demasiado y el endosulfan, por su carácter hidrofóbico, tuvo más afinidad para interactuar con la bicapa lipídica de las células bacterianas. Se encuentra, por lo tanto, la mayor proporción de plaguicida en el pellet, por lo que se infiere que el plaguicida quedaría retenido en las células. De todas maneras, se deberían realizar más ensayos para corroborar estas suposiciones.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

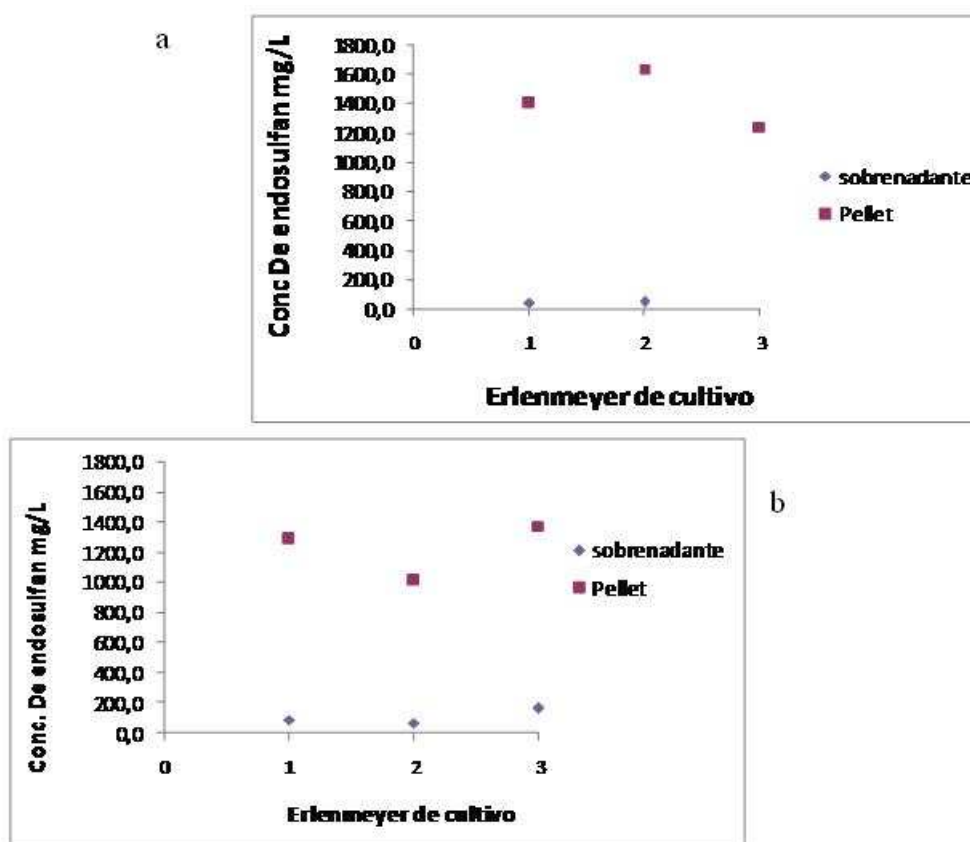


Fig 3. 15: Evaluación de la utilización de endosulfan -por triplicado- como fuente de carbono solamente (a) y como fuente de azufre y carbono (b)

3.4 Movilidad de Plaguicidas

Con el objetivo de llevar adelante una caracterización inicial de la movilidad de los plaguicidas en los suelos estudiados, se realizó un ensayo de movilidad vertical en columna con suelo tamizado, para suelo de huerta y referencia. Los plaguicidas ensayados fueron nuevamente trifluralina, procimidone y clorpirifós.

Todos los plaguicidas fueron comparados con uno de movilidad intermedia, la atrazina, recomendado según la guía OECD 2004. Este plaguicida de referencia fue incorporado en la misma columna y al mismo tiempo que el producto a estudiar para poder mantener uniformidad en la manera de analizar la serie de xenobióticos, y así

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

comparar la movilidad entre ellos. La figura 3.16 muestra los promedios para los resultados de cinco columnas para atrazina en suelo de huerta y referencia; siendo las dos primeras realizadas junto con trifluralina, las dos segundas en paralelo con clorpirifós y la última junto con procimidone.

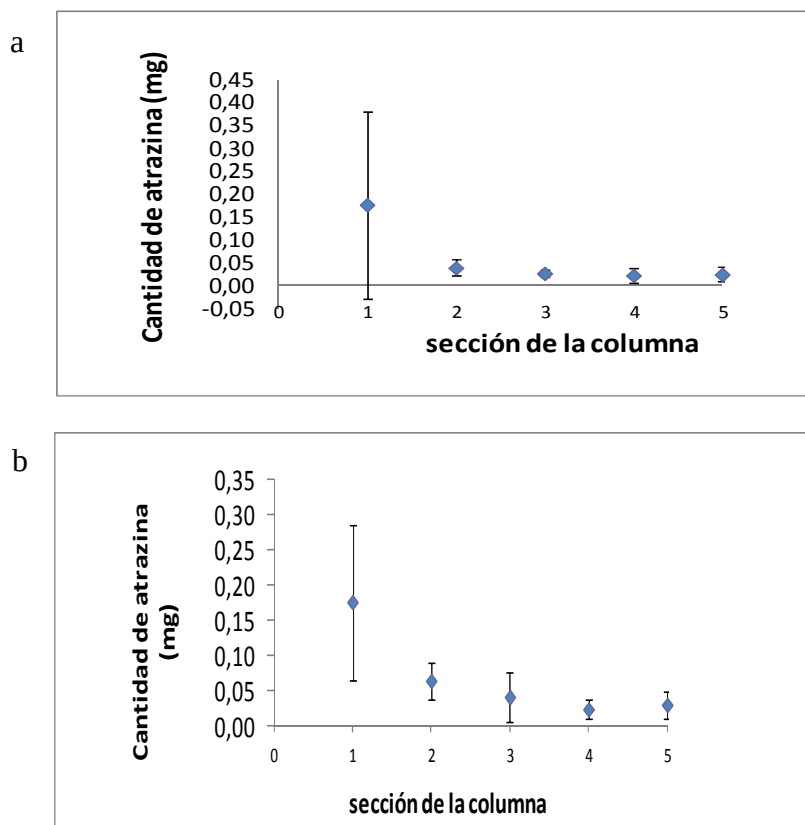


Fig 3. 16: Movilidad de atrazina en suelos de huerta (a) y referencia (b)

Considerando la sección 1 el fragmento de 0-5 cm, sección 2 5-10cm, sección 3 10-15cm, sección 4 15-20 cm, sección 5 20-25 cm

En rasgos generales se puede ver que la atrazina resultó ser más móvil en el suelo de referencia (Fig. 3.16b) que en el de huerta (Fig. 3.16a). Cabe destacar, que los porcentajes de recuperación de atrazina no fueron óptimos, obteniendo un porcentaje máximo de 40%. Este hecho se evidencia en la dispersión de los resultados en el punto que refiere a la primera sección de la columna. Sin embargo, se detectaron cantidades ínfimas de atrazina a lo largo de toda la columna, señalando que este producto

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

efectivamente se desplazó.

Las figuras 3.17, 3.18 y 3.19 presentan gráficamente los resultados de movilidad vertical en columna con suelo tamizado, para suelo de huerta y referencia, para trifluralina, clorpirifós y procimidone respectivamente.

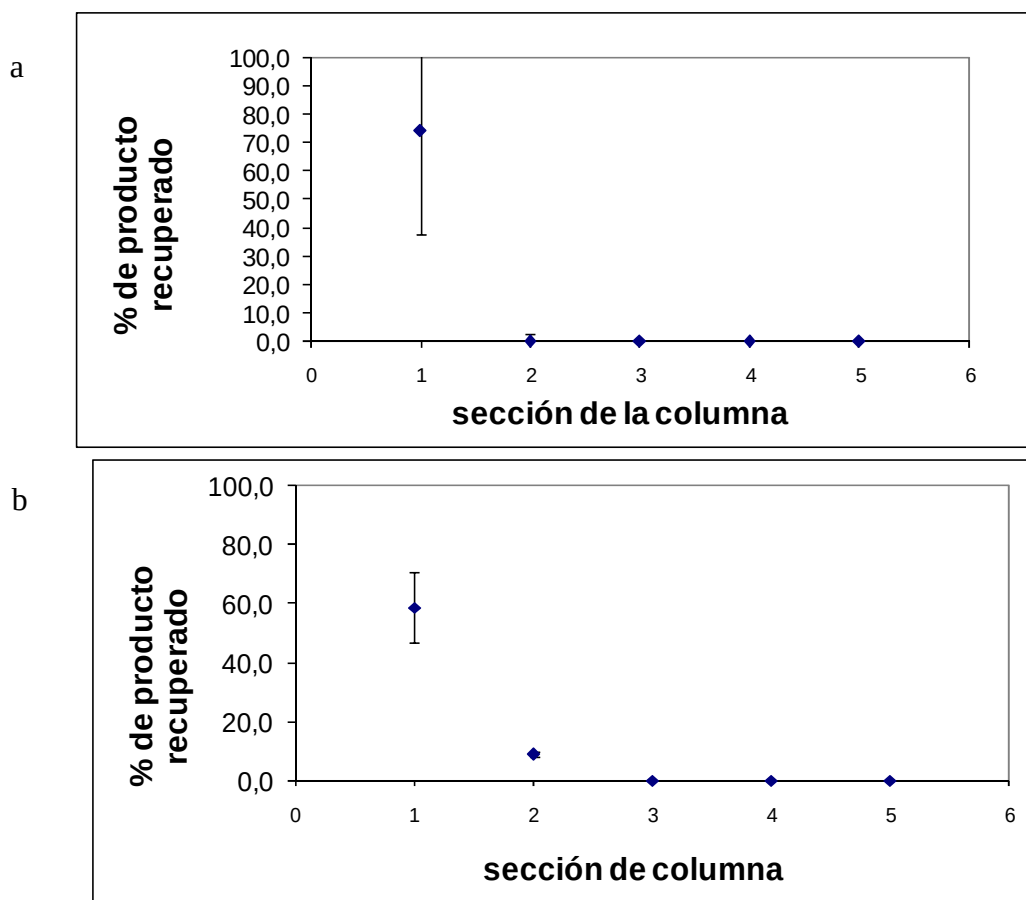


Fig 3. 17: Movilidad de trifluralina en suelos de huerta (a) y referencia (b)

Considerando la sección 1 el fragmento de 0-5 cm, sección 2 5-10cm, sección 3 10-15cm, sección 4 15-20 cm, sección 5 20-25 cm

En el caso de trifluralina, se puede observar que en suelo de referencia el plaguicida se desplaza a lo largo de dos secciones, es decir entre 5 y 10 cm (Fig. 3.17b). En el caso del suelo proveniente de la huerta este herbicida sólo fue detectado en los 5 cm

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

superiores de la columna (Fig 3.17a), es decir que prácticamente no se desplazó del lugar de siembra original. Estos resultados llevan a inferir que la trifluralina, a pesar de presentar menor movilidad que la atrazina, sigue un comportamiento similar a ésta, ya que en principio se movería más en el suelo de referencia.

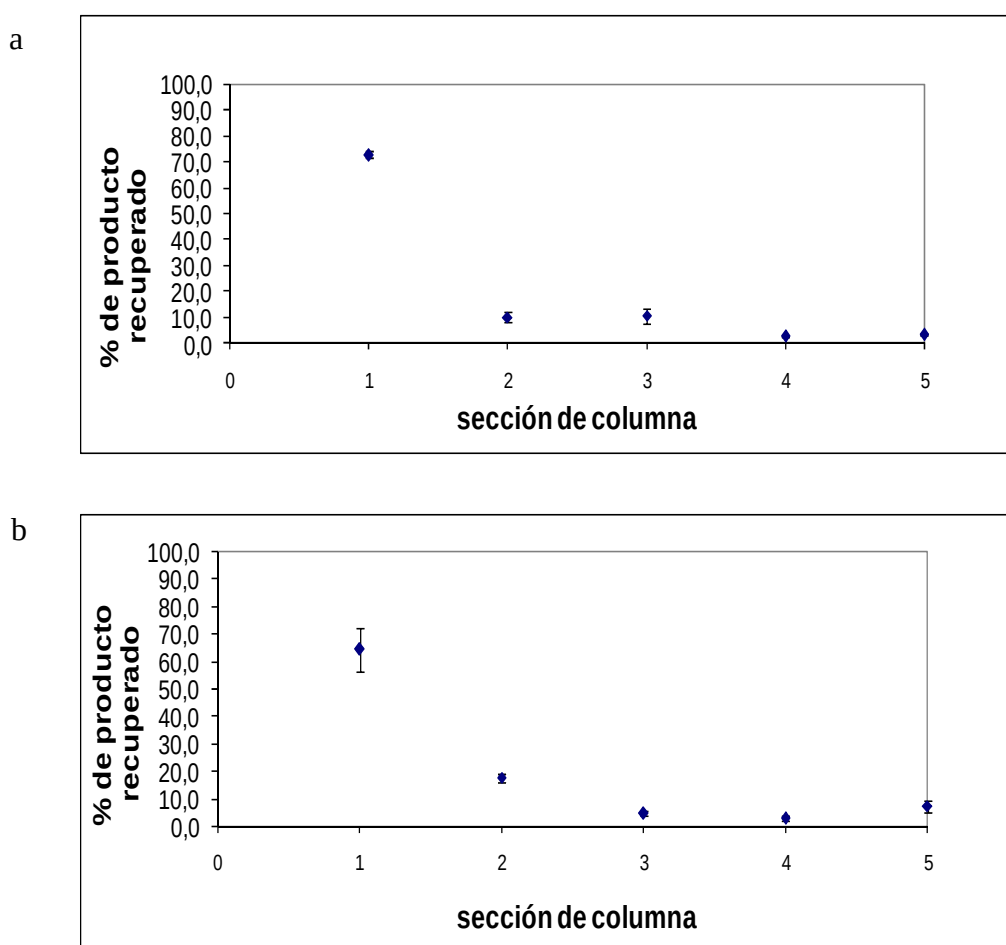


Fig 3. 18 Movilidad de clorpirifós en suelos de huerta (a) y referencia (b)
Considerando la sección 1 el fragmento de 0-5 cm, sección 2 5-10cm, sección 3 10-15cm, sección 4 15-20 cm, sección 5 20-25 cm

En el caso del clorpirifós en el suelo de referencia, se puede observar un porcentaje todavía significativo en la sección 3, es decir, entre 10 y 15 cm del lugar de siembra del insecticida en el extremo superior de la columna, e inclusive un porcentaje

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

menor en las secciones 4 y 5 (Fig. 3.18b). En el caso del suelo de huerta, si bien se observa que la mayor cantidad del producto quedó retenida en la primera sección, se ve un descenso menor hacia la tercera sección (Fig. 3.17a). Es decir, mientras el suelo de la huerta para la tercera sección retiene alrededor de un 10% de clorpirifós, el de referencia retuvo menos de un 5%. Sin embargo, se observa la presencia de producto en la sección 5 de suelo de referencia. Es interesante señalar que el clorpirifós es el que presenta mayor movilidad de los tres productos estudiados, lo que lo hace comparable con la atrazina.

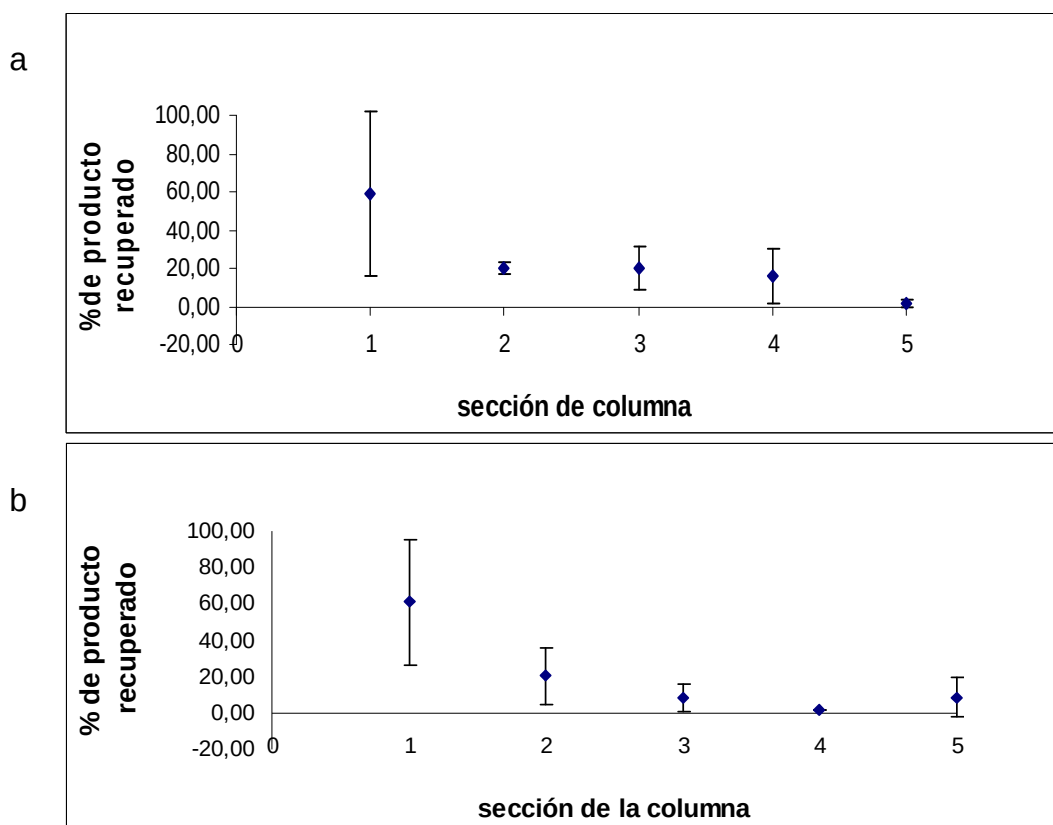


Fig 3. 19: Movilidad de procimidone en suelos de huerta (a) y referencia (b)
Considerando la sección 1 desde el extremo superior de la columna, el fragmento de 0-5 cm, sección 2 5-10cm, sección 3 10-15cm, sección 4 15-20 cm, sección 5 20-25 cm

Es necesario señalar que para el caso de procimidone, los resultados de los ensayos duplicados presentaron una dispersión importante, probablemente porque la formulación comercial de este fungicida es de consistencia viscosa y muy difícil de

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

dosificar volumétricamente, es decir, es complicada la preparación de las soluciones en forma reproducible. Se intentó realizar la medición de procimidone gravimétricamente pero de todas maneras los resultados dieron una dispersión bastante importante.

En el caso del suelo de huerta, este producto resultó ser móvil hasta la sección 4, es decir, entre 15 y 20 cm desde el borde superior de la columna (Fig. 3.19a). En el suelo de referencia (Fig. 3.19b) se observó señal del producto inclusive en la sección 5 (25 cm).

A partir de los resultados graficados en las figuras 3.17, 3.18 y 3.19 se pudo observar que el plaguicida que mayor movilidad tuvo en este sistema fue el clorpirifós y el que la menor movilidad en la columna fue la trifluralina (siempre referido a la movilidad con la atrazina). Como en el caso de secciones anteriores cabe destacar que la trifluralina es un compuesto volátil y esto podría estar influyendo con los porcentajes de recuperación.

Se sabe que los procesos de sorción/desorción influyen el lixiviado de plaguicidas en la superficie y pueden dar pautas para la predicción del transporte de los productos. Estos procesos son importantes porque determinan la velocidad de liberación y la posible movilidad de los plaguicidas en el suelo (Boivin et al, 2005).

A priori, al ver que las tierras de referencia poseían mayor porcentaje de materia orgánica, se esperaba que en estas muestras la movilidad fuera menor, sin embargo los resultados revelaron un comportamiento contrario. Este comportamiento también se registró para la atrazina, producto que se clasificó de movilidad media.

Por otro lado, en sus microporos, el suelo alberga agua que puede actuar como medio de transporte y distribución de plaguicidas, aunque sean hidrofóbicos. El agua en los microporos contiene materia orgánica la cual puede unirse a los plaguicidas facilitando su transporte (Gao et al, 1997). Sin embargo, en estos estudios de movilidad, el suelo se utilizó tamizado por lo cual, si bien es interesante saber la capacidad que tienen estos productos para desplazarse por cuestiones ambientales, sólo serviría para generar una hipótesis inicial, ya que la movilidad debería estudiarse en sistemas experimentales donde

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

la estructura del suelo estuviera intacta. De todas formas, estos resultados son interesantes ya que, como se vio en la sección de caracterización de los suelos, la tierra de la huerta está compactada y tiene poca retención de agua dada la alta densidad aparente. El suelo de referencia, por el contrario presenta menor densidad aparente que el de huerta y por ende, retiene menos agua que el suelo de huerta, lo que podría llevar a pensar qué, a pesar de ser un suelo más rico en materia orgánica, es propicio para que se produzca un desplazamiento de los plaguicidas.

También, en suelos como el de la huerta, con menor materia orgánica, el tamaño de la fracción arcillosa tiene influencia: al aumentar el contenido de arcilla, suele disminuir la movilidad (Spark et al, 2002). Es necesario destacar la diferente estructura de los suelos utilizados, mientras que el suelo de referencia era granular, la tierra la de huerta era más apelmazada y arcillosa.

En términos generales, se pudo ver en todos los casos que la movilidad fue mayor en el suelo de referencia que en huerta. Este resultado es contrario a la hipótesis inicial relacionada con el contenido de materia orgánica en el suelo.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

CAPÍTULO 4: **CONCLUSIONES**

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

4- Conclusiones

- ✓ No se observaron diferencias significativas en cuanto a las propiedades biológicas, físicas y químicas entre las diferentes parcelas de la huerta. Sin embargo, se vieron notables diferencias entre el suelo de huerta y el de referencia. Se vio que existen variaciones significativas en particular respecto al fósforo total, presumiblemente consecuencia del agregado de enmiendas.
- ✓ La materia orgánica en los suelos de las huertas es notablemente menor que en los suelos de referencias, lo que podría explicarse por la actividad productiva sostenida a lo largo de varios años.
- ✓ Se pudo establecer que la actividad productiva altera estructuralmente al suelo. Al comparar los valores de densidad específica con los de un suelo referencia, se observaron diferencias importantes. Estos datos se lograron correlacionar con los de retención de agua, observándose cómo la influencia de la compactación modifica aspectos importantes a tener en cuenta a la hora de evaluar la productividad de un suelo.
- ✓ Se pudo determinar que la degradación de los plaguicidas en el suelo de huerta es más rápida que en suelos control (no utilizados para tal actividad). Esto está asociado a la capacidad de adaptación de los microorganismos del suelo productivo como consecuencia de la presión de selección generada por el agregado de plaguicidas.
- ✓ Se comprobó que existen microorganismos que pueden utilizar los plaguicidas para su metabolismo. Se lograron aislar estas bacterias, fundamentalmente en el suelo hortícola, haciendo un enriquecimiento bacteriano con clorpirifós, procimidone, trifluralina y endosulfán.
- ✓ Los ensayos de movilidad preliminares de clorpirifós, procimidone, trifluralina y atrazina permiten conjeturar que la movilidad en estos suelos está más relacionada con su estructura que con la cantidad de materia orgánica presente.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

5- BIBLIOGRAFÍA

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Ahemad Gholamalizadeh Ahangar, R. S., Rai Kookana, David Chittleborough (2008). "Separating the effects of organic matter-mineral interactions and organic matter chemistry on the sorption of diuron and phenantherne." Chemosphere **72**: 886-890.

Alsina, Catenazzi (1998). Diagnóstico preliminar ambiental de Moreno. Instituto del Conurbano, Universidad Nacional de General Sarmiento.

Arbeli, Fuentes (2007). "Accelerated biodegradation of pesticides: an overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension." Crop protection **26**: 1733-1746.

Arias- Estévez, E., Martínez-Carballo, Simal-Gándara, Mejuto, García-Río (2008). "The mobility and degradation of pesticide in soils and the pollution of groundwater resources." Agriculture ecosystems & environment **123**: 247-260.

Bailey, Ferris, Krause, Strong (2002). Chemistry of the environment. Estados Unidos, Ed. Academic Press.

Baird (2000). Environmental chemistry. Estados Unidos, Freeman and Company.

Beidos, Gabrielle, Flura, Durand, Barriuso, Cellier (2006). "Measurement of trifluralin volatilization in the field: relation to soil residue and effect of soil incorporation." Environmental pollution **144**: 958-966.

Bellinaso, Peralba, Pegas Henriques, Gaylarde (2003). "Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil." FEMS microbiology ecology **43**: 191-194.

Boivin, Schiavon (2005). "A comparison of five pesticides adsorption and desorption processes in thirteen contrasting field soils." Chemosphere **61**: 668-676.

Bray R. H. y Kurtz L. T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorous in soil. Soil Science 134: 376-380

Buol, Hole, McCracken, (1973). Soil Genesis and Classification (primera edición). Ames, IA: Iowa State University Press.

Burrows, Santaballa, Steenken (2002). "Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides." Journal of photochemistry and photobiology **67**: 71-108.

Chamika, Soueref, Karas, Karanasios, Tsiropoulos, Tzortzakakis, Karpouzas (2011). "Isolation of bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticide." Biosource technology **102**: 3184-3192.

Charnay, Farrugia, Berriuso (2004). "Incorporation of pesticides by soil micro-organisms as a way of bound residues formation." Environ Chem Lett **2**: 27-30.

Castillo, Esperanza Romero (2011). "Isolation of an endosulfán-degrading bacterium from a coffee farm soil: persistence and inhibitory effect on its biological functions." Science of the total

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

environment **412-413**: 20-27.

Chesworth (2008). Encyclopedia of soil science. Canada, Springer.

Fulekar (2008). "Bioremediation of pesticides in surfaces soil treatment unit using microbial consortia." African journal of environment science and technology **2**: 36-45.

Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes (CASAFA) (2001). Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Tomo I y Tomo II. Décima edición.

Caseley and Parker. (1996). 10. Herbicides. Manejo de malezas en países en desarrollo. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.

Chen, Edwards, Subler (2001). "Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations". Soil biology and biochemistry **33**: 1971-1980

Chishiti, Arshad, Khalid, Arshad (2012). "Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil." Journal of environmental management.

Chu, Pan, Wang, Shan, Feng, Yu (2008). "Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations." Journal of environmental sciences **20**: 464-469.

Chu Xiaoqiang, Pan Xuedong, Wang Xiao, Shan Min, Feng Bo, Yu Yunlong (2008). "Degradation on Chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects in soil microbial populations." Journal of environmental sciences **20**: 464-469.

Coleman, D.C., Crossley D.A.J. & Hendrix, P.F. (2004). Fundamentals of soil ecology. Amsterdam. The Netherlands. Boston, MA, USA: Elsevier Academic Press.

Crawford, J. J., G.K. Sims, R.L. Mulvaney, and M. Radosevich (1998). "Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions". Appl. Microbiol. Biotechnol. **49** (5): 618-623.

D'Hose, Ruysschaet, Heuges, Viaene, De Vliengher y Willekens (2013): Soil organic matter management within the legal constraints of the fertilization laws-BOPACT field trial. Ghent vol 18

Evangelou (1998). Environmental soil and water chemistry: principles and applications. Canada, John Wiley & Sons Inc.

Fang Hua, Chu Xiaoqiang, Wang Xioguo, Yang Xiaoe, Yu Jingquan (2009). "Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity." Journal of environmental sciences **21**: 380-386.

Flores, Montserrat, Zalts (2014). "Determinación de la exposición a plaguicidas de los productores hortícolas y florícolas". Tesis presentada para optar por el título de doctor en ciencia y tecnología. Buenos Aires, Argentina.

Gao, Spatzauer y Kettrup (1998). "Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher Pond

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

(Southern Germany), I: equilibrium assessments effect of organic carbon content and pH." Pergamon **32**: 1662-1672.

Gebremariam, Yonge, Flury y Haesh (2012). "Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soil and sediments." Reviews of environmental contamination and toxicology **215**: 123-175.

Gianotti, Croce, Frascarolo, Gosetti, Mazzucco, Bottaro, Gennaro (2008). "The use of clays to sequester organic pollutants. Leaching experiments." Chemosphere **2008**: 1731-1736.

Grant y Long (1989). Microbiología ambiental. España, Acribia S.A.

Guo Hua, LV Zhaoping, Zhao Hua, Yang Hong (2009). "Alteration of microbial properties and community structure in soils exposed to napropamide." Journal of environmental sciences **21**: 494-502.

Health World Organization, (1984). Environmental health criteria 40. Endosulfán. International programme on chemical safety. Genova.

Helling (1976): "Dinitroaniline herbicides in soils". Journal of environmental quality. **5**; 1-15

Herrera A.C.. (2008). Gestión de Recursos Hídricos, Universidad Nacional de General Sarmiento.

Hua Fang, Yi Jie Hao, Xiao Qiang Chu, Xue Dong Pan, Jing Quan Yu, Yun Long Yu (2008). "Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi." International biodeterioration & biodegradation **61**: 294-303.

Hughes, Montserrat, Zalts (2005). Evaluación de la exposición dérmica potencial a productos fitosanitarios de los trabajadores agrícolas de la zona de huertas de Moreno. Tesis presentada para optar al título de Magister en control de plagas y su impacto ambiental. Buenos Aires, Argentina.

Hussain, Saleem, Arshad, Khalid (2009). "Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes and biochemical reactions." Advances in agronomy **102**: 159-198.

Internal Institute for Sustainable Development (IISD), (2008). Summary of the fourth meeting of the persistent organic pollutants review committee of the Stockholm Convention: 13-17 October 2008". **15**.

Jin Fa, Jing-Yuan Wang, Xiao- Fei Hu, Fu-Sheng Chen (2014). "Seasonal dynamics of soil nitrogen availability and phosphorus fractions under urban forest remnants of different vegetation communities in Southern China". Urban forestry and urban greening **13**: 576-585.

Juraske, Francesc (2007). "Estimating half lives of pesticides in on vegetation for use in multimedia fate and exposure models." Chemosphere **70**.

Kah, B. y. B. (2007). "Factors influencing degradation of pesticides in soil." Journal of agricultural and food chemistry.

Gianfreda, (2011). The influence of pesticides on soil enzymes. 16. D. A. e. d. P. A. Departamento de ciencia del Suelo della Pianta. Napoles, Italia, Springer.

Gianotti, Croce, Frascarolo, Gosetti, Mazzucco, Bottaro, Gennaro (2008). "The use of clays to

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

sequesterate organic pollutants. Leaching experiments." *Chemosphere* **73**: 1731-1736.

Gonzalez, Aizpún, Isla, Aránzazu Peña (2010). "Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia)." *Chemosphere* **81**: 351-335.

Guía del emprendedor (2004). Extraído de www.guiadelemprendedor.com.ar/cultivo-de-frutillas.html.

Hans, (1994) *Factors of Soil Formation. A System of Quantitative Pedology*. Editorial: Dover. New York.

Huerga, (2004). El control de las plagas en la agricultura argentina. *Estudio sectorial agrícola mundial*, Banco Mundial/ Centro de inversiones FAO.

Li, Beibei Xue, Yingying Li, Xiang Peng, Jingshun Zhang, Yanchun Yan (2009). "Biodegradation and detoxification of endosulfán in aqueous medium and soil by *Achromobacter xylosoxidans* strain CS5." *Journal of Hazardous Materials* **167**(209-216).

Lian-Kuet Chai, Norhayati Mohd-Tahir, Hans Christian Bruun Hansen (2010). "Degradation and mineralization kinetics of acephate in humid tropic soils of Malaysia." *Chemosphere* **79**: 434-440.

Maila, C. (2005). "The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants- perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review." *International biodeterioration & biodegradation* **55**: 1-8.

Mitchell (2010). *Environmental microbiology*. Estados Unidos, Wiley-Blackwell.

Munees Ahemad, (2011). "Assessment of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under insecticide-stress." *Microbiology journal* **2**: 54-64.

Nannipieri (2007). "Functions of microbial communities and their importance to soil." *Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* **2**.

Nelson y Sommers: Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. *SSSA Book Series, Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods* 5.3:961-1010

Nicholson, H. (1998). "The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria." *Journal of applied microbiology* **84**: 551-558.

Niranjan Awasthi, Ashwani Kumar (2000). "Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfán isomers." *Soil biology & biochemistry* **32**: 1697-1705.

OECD/OCDE (2004). "OECD Guidelines for the testing of chemicals. Leaching in soil columns." **312**.

Pengthamkeerati, M., Kremer, Anderson (2005). "Soil carbon dioxide efflux from a claypan soil affected by surface compaction and applications of poultry litter." *Agriculture ecosystems & environment* **109**: 75-86.

Plaster, E.J. (1997) *La Ciencia del Suelo y su manejo*. Ed. Paraninfo. Madrid.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

Querejeta, Ramos, Flores, Hughes, Anita, Montserrat (2012): "Environmental pesticide distribution in small horticultural and floricultural production units in Argentina". Chemosphere **87**: 566-572

Querejeta, Ramos, Hughes, Vullo, Zalts, Montserrat (2014): "Environmental fate of trifluralin, procymidone and chlorpyrifos in small horticultural production units in Argentina". Water, Air Soil Pollut. **225**:1952

Ramos, Querejeta, Flores, Hughes, Zalts, Montserrat (2010). "Potential Dermal Exposure in greenhouses for manual sprayers: Analysis of the mix/load, application and re-entry stages". Science of the total environment **408**

Rauth, Garkinkel., Perera, Andrews, Hoepner, Barr, Whitehead, Tang and Whyatt (2006). "Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children." Pediatrics **118**: 1845-1859.

Rionda, Sabatte, Momo, Martínez, Bernava, Hughes, Ramos, Querejeta, Zalts, Montserrat (2008). "Efectos de los plaguicidas de uso hortícola sobre los microartrópodos del suelo". Presentado en el XXI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Potrero de Funes, Argentina.

Russell, S., Jackson, Pandey, PAndey, Taylor, Coppin, Wei Liu, Oakeshott (2011). "The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects." Evolutionary applications **4**: 225-248.

Sabine Beulke, C. B., Christopher Fryer, Wendy van Beinum (2004). "Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils." Chemosphere **57**: 481-490.

Saikia, D., Patel, Niwas, Singh y Madhuban (2005). "Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1." Biodegradation **16**: 581-589.

Schmit, Hapeman., Fettinger, Rice, Bilboulia (1997). "Temperature-dependent raman spectroscopic evidence of and molecular mechanism for irreversible isomerization of β - α -endosulfán to α -endosulfán." Agricultural and food chemistry **45**: 1023-1026.

Spark, S. (2002). "Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption." The science of the total environment **298**: 147-161.

Seyoum Yami Gebremariam, M. B., Markus Flury, James Harsh, David Yonge (2011). "Nonsingular adsorption/desorption of chlorpyrifos in soils and sediments: experimental results and modeling." Environmental science and technology **46**: 869-875.

Slonczewski, Gillen (2011). Microbiology. An evolving science. Canada, Norton & Company Inc.

Soil Science Society of America: Glossary of Soil Science Terms 1996 (1997). Editado por Soil Science Society of America Inc.

Sparling, G.P. (1997) Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. Biological indicators of soil health P97- 119. Pankhurst, C.E. CAB International.

Stainer R, Wheelis M, Painet P (1987). General Microbiology. Hong Kong, Prentice-Hall.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

Steenwerth, Jackson, Calderón, Stromberg, Scow. (2002). "Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California". Soil Biology and Biochemistry 34: 1599-1611.

Stoytcheva (2011). Pesticides in the modern world-risks and benefits. Croacia, InTech.

Tenesaca Campos. (2010). Dosis letales invitro de cuatro fungicidas químicos en el control de la pudrición basal de la lechuga producido por *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary. Ecuador, Universidad de Cuenca. **Ingeniería agrónoma**.

Wiesmann, Eva- Dombrowski (2007). Microbial Metabolism. Fundamentals of biological wastewater treatment. W.-V. v. G. C. KGaA. Weinheim.

Wilson, Sasal, Caviglia (2013). "Critical bulk density for a Mollisol and a Vertisol using least limiting water range: effect on early wheat growth". Geoderma **192**: 354-361

United States Environmental Protection EPA (1996). Reregistration eligibility decision (RED). Trifluralin.

United States Environmental Protection EPA (2002). Reregistration eligibility decision (RED). Endosulfán.

Van Elsas, T. y. W. (1997). Modern soil microbiology. New York, Marcel Dekker.

Vicente Andreu, Y. P. (2004). "Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods." Trends in Analytical Chemistry **23**(10-11): 772-789.

Vullo, Wachsmann, Alche (2000). Microbiología en práctica: manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica aplicada. Buenos Aires, Atlante s.r.l.

Voguel A. (1960). Química analítica cuantitativa Vol 1. Buenos Aires, Kapeluz.

Wackett, Sadawsky, Martinez, Shapir (2002). "Biodegradation of atrazine and related s-triazina compounds: from enzymes to field studies." Applied microbiology **58**: 39-45.

Whyatt, Rauh, Barr, Camann, Andrews, Garfinkel (2004). "Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort." Environmental health perspective **112**: 1125-1132.

Willey, S., Woolverton (2014). Prescott's microbiology. New York, McGraw Hill

Xie, Wei Tan, Shu-Guang Wang (2011). "A short-term study on the interaction of bacteria, fungi and endosulfán in soil microcosm." Science of the total environment **412-413**: 375-379.

Xing, B. (1997). "The effect of the quality of soil organic matter on sorption of naphthalene." Chemosphere **35**: 633-642.

Yanggen, C., Crissman, Sherwood (2004). "Pesticide use in commercial potato production: reflections on research and intervention towards greater ecosystems health in Northern Ecuador." Ecohealth journal consortium **1**: 72-83

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluated and accredited by the National Commission of Evaluation and Accreditation of Universities (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

Ying, W. (2000). "Dissipation of herbicides in soil and grapes in South Australian vineyard." Agriculture, ecosystems and environments **78**.

Yunlong, C. X., PAng Guohui, Xiang Yueqin, Fang Hua (2009). "Effects of repeated applications of fungicide carbendazim on its persistence and microbial community in soil." Journal of environmental sciences **21**: 179-185.

Zeng Y, Sweeney CL, Stephens S, Kotharu P. (2004). Atrazine Pathway Map. Wackett LP. Biodegradation Database.

http://www.laguasata.com/joomla/index.php?option=com_content&view=article&id=117:procimido-ne-&catid=43:principios-activos&Itemid=54
