UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Instituto de Agroindustria

"INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE PURINES DE ORIGEN BOVINO SOBRE LA PERSISTENCIA DE ATRAZINA EN SUELO DE USO AGRÍCOLA: ESTUDIOS DE ADSORCIÓN Y DEGRADACIÓN"

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

GABRIELA ELIZABETH BRICEÑO MUÑOZ

TEMUCO-CHILE

2009

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Instituto de Agroindustria

"INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE PURINES DE ORIGEN BOVINO SOBRE LA PERSISTENCIA DE ATRAZINA EN SUELO DE USO AGRÍCOLA: ESTUDIOS DE ADSORCIÓN Y DEGRADACIÓN"

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

GABRIELA ELIZABETH BRICEÑO MUÑOZ

TEMUCO-CHILE

2009

“INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE PURINES DE ORIGEN BOVINO SOBRE LA PERSISTENCIA DE ATRAZINA EN SUELO DE USO AGRÍCOLA: ESTUDIOS DE ADSORCIÓN Y DEGRADACIÓN”

Esta tesis es presentada bajo la supervisión de la directora de tesis**, Dra. Graciela Palma Cifuentes,** del Departamento de Ciencias Químicas para su aprobación por la comisión.

GABRIELA ELIZABETH BRICEÑO MUÑOZ

……
DRA. GRACIELA PALMA C.

……
DIRECTORA PROGRAMA DE POST GRADO EN CIENCIA DE RECURSOS NATURALES

……
DRA. MARÍA CRISTINA DIEZ J.

……
DRA. MARÍA BÁEZ C.

……
DR. ERICK ZAGAL V.

……
DIRECCIÓN DE POST GRADO
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

……
DRA. MARÍA DE LA LUZ MORA

……
Ing. Agrón. Especialista.
ROLANDO DEMANET F.

Con amor a mi Hijo Diego.

Dedico esta Tesis a José Luís, a mis Padres y Hermana
en agradecimiento por su gran amor, apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Expreso con mucho cariño los más sinceros agradecimientos a la Dra. Graciela Palma, por su gran apoyo, confianza, colaboración y dedicación durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco a la beca MECEFRO 0309 por el financiamiento para la realización de los estudios de Doctorado y al proyecto FONDECYT 1070568 por los recursos aportados para la realización de la Tesis Doctoral.

Agradezco especialmente a mi familia, pilar importante en mi vida, por su gran amor, alegría, motivación y comprensión durante el desarrollo de esta etapa.

Agradezco por todos los momentos compartidos a mis queridas compañeras y amigas; Bárbara Fuentes, María Paz Oyarzún y Paulina Etcheverría, quienes sin duda durante estos cuatro años llegaron a ser personas que quedan en el recuerdo y en el corazón.

Agradezco a los profesores de la comisión evaluadora por sus pertinentes observaciones, al Dr. Milko Jorquera por su apoyo en el trabajo de biología molecular, y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron y facilitaron la realización de esta tesis.

Agradezco a mis compañeros (as) de oficina por los momentos compartidos y por la amable colaboración cada vez que fue solicitada.

Finalmente, agradezco a los funcionarios del Departamento de Ciencias químicas por su amabilidad, colaboración y también por contribuir a amenizar las jornadas de trabajo.

RESUMEN

La aplicación de enmiendas orgánicas en suelos de uso agrícola contribuye a aumentar el contenido de nutrientes y a mejorar sus propiedades físico-químicas y biológicas. Sin embargo, estas modificaciones en el suelo pueden influir sobre los procesos de adsorción, lixiviación y degradación de herbicidas, y por lo tanto disminuir su eficiencia en el control de malezas y/o influir sobre el potencial para contaminar aguas superficiales y subterráneas.

El sur de Chile, se caracteriza por presentar una importante actividad lechera, la cual presenta a la vez, la generación de grandes cantidades de residuos, entre ellos, los purines de origen bovino. Los purines presentan serios problemas de disposición final, por lo que actualmente se aplican con fines de fertilización en suelos destinados al cultivo de maíz forrajero. Como parte del manejo agronómico del maíz se aplican diversos herbicidas siendo la aplicación de atrazina fundamental en la etapa de establecimiento del cultivo. La aplicación de purines en el cultivo de maíz forrajero, se ha relacionado con la emergencia de densas poblaciones de malezas, lo que ha llevado a realizar aplicaciones reiteradas de atrazina, herbicida caracterizado por presentar un alto potencial de contaminación.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la influencia de la aplicación de purines de origen bovino sobre los procesos de adsorción y degradación de atrazina en el suelo. El purín se aplicó en el suelo en las dosis de 0 L ha^{-1}, 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} lo que resultó en los tratamientos de suelos S-0, S-100, S-200 y S-300, respectivamente. La evaluación consideró un periodo de preincubación de 30 días de los suelos enmendados, durante el cual se realizó la caracterización química y biológica. Se evaluó la adsorción y porcentaje de desorción de atrazina en los suelos, además, de los mecanismos involucrados en la interacción suelo-atrazina. Atrazina se aplicó en los suelos en concentraciones de 0-3 mg kg^{-1} y se determinó su persistencia y la formación de residuos de los principales productos de degradación. Por su parte, se evaluó a través de técnicas biológicas y moleculares, el efecto de atrazina sobre los microorganismos del suelo enmendado con purines.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la aplicación del purín, modificó las características químicas y biológicas del suelo, pero luego de un periodo de incubación de

15 días el suelo enmendado tiende a alcanzar la estabilización. Los estudios con atrazina, realizados en los suelos enmendados preincubados por 30 días mostraron, que la adsorción de atrazina disminuyó al aplicar la mayor dosis de purín (S-300) debido al mayor contenido de CO disuelto presente en el suelo enmendado. La aplicación de purines no influyó sobre los mecanismos de interacción de atrazina, se identificó que atrazina interacciona con el suelo a través de puentes de hidrógeno y transferencia de carga. La aplicación de la mayor dosis de purín, aumentó la desorción de atrazina. Por su parte, al realizar una estimación del potencial de lixiviación, a través del índice de GUS, atrazina presentó un aumento del potencial de lixiviación en el suelo enmendado. El estudio de persistencia mostró que el purín no influyó sobre la disipación de atrazina en el suelo. Atrazina presentó un tiempo de vida media entre 15-19 días, no detectándose residuos luego de 80 días de su aplicación. Luego de 20 días de la aplicación de atrazina, se encontraron residuos de los metabolitos hidroxiatrazina, deetilatrazina y deisopropilatrazina, los cuales presentaron un aumento a medida que incrementó la dosis de aplicación de purines en el suelo. Finalmente, la aplicación de distintas concentraciones de atrazina, provocó una mayor respiración microbiana y actividad enzimática, además de cambios sobre la comunidad de bacterias. Luego de 10 días de la aplicación de atrazina, se estimularon bacterias pertenecientes al grupo de las Proteobacterias, sin embargo, luego de 20 días, la comunidad recuperó su condición previa.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se plantea necesario considerar la aplicación de elevadas dosis de purines (300.000 L ha^{-1}) debido a que podría favorecer la lixiviación de atrazina y por lo tanto la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Por su parte, la pérdida de eficiencia de atrazina para el control de malezas en cultivos de maíz, podría deberse a que el herbicida, aplicado en la dosis recomendada en el campo y el doble de ésta, presentan un efecto de estimulación en los microorganismos del suelo, lo que favorece su rápida degradación.

SUMMARY

The applications of organic amendments in agricultural soils increase the levels of nutrients and improve the physical, chemical and biological soil properties. However, these changes in soil can modify the processes of adsorption, leaching and degradation of herbicides and therefore reduce their effectiveness in controlling weeds or influence the potential to pollute superficial water and groundwater.

Southern Chile is characterized by present a dairy farm activity, which presents both the generation of large amounts of waste, including slurry of bovine origin. The slurry presents serious disposal problems, which currently apply for soil fertilization in the maize for fodder crops. The maize crops receive the application of various herbicides, being atrazine fundamental in the establishment of the crop. The application of slurry in growing forage maize has been associated with the emergence of dense populations of weeds, which has led to repeated applications of atrazine, a herbicide characterized by high pollution potential.

The aim of this study was to evaluate the influence of the application of bovine slurry on the atrazine adsorption process and degradation processes in soil. The slurry was applied on soil at rates of 0 L ha^{-1}, 100,000 L ha^{-1}, 200,000 L ha^{-1} and 300,000 L ha^{-1} resulting in treatments S-0, S-100, S-200 and S-300, respectively. During a pre-incubation period of 30 days were realized the chemical and biological characterizations of the amended soils. We evaluated the adsorption of atrazine and mechanisms involved in the interaction soil-atrazine. Atrazine was applied in the soil at concentrations of 0-3 mg kg^{-1}, then was evaluated their persistence and residues of the main degradation products. Moreover, were evaluated by biological and molecular techniques the atrazine effects on microorganisms in the amendment soil with increasing rates of slurry.

The slurry application changed the chemical and biological characteristics of soil, but after an incubation period of 15 days the amended soils to achieve stabilization. The atrazine adsorption was decreased in the amended soils with higher rate of slurry (S-300) due to higher content of dissolved organic carbon present in the amended soil. The amendment had no effect on atrazine adsorption mechanisms on soil (S-0) and amended soil S-300. The results obtained in these soils indicate that the mechanisms involved are both

hydrogen bonding and charge transfer. The atrazine desorption was higher in soil that received the highest rate of slurry. In this soil was observed an increase of atrazine leaching potential calculated through the GUS index. The persistence study showed that slurry had no effect on atrazine dissipation, atrazine presented a half-life between 15-19 days and no residues were detected after 80 days. After 20 days of atrazine application were detected the metabolites hydroxyatrazine, deethylatrazine and deisopropylatrazine, which showed an increase in the soils that received higher rates of slurry. Finally, the application of atrazine increased the microbial respiration and enzymatic activity, moreover, caused changes on the bacteria community. After 10 days of the atrazine application were stimulated bacteria belong to the Proteobacteria group, however, after 20 days, the community regained its previous conditions.

It is necessary to consider the application of high rates of bovine slurry (300,000 L ha^{-1}) because it could promote the atrazine leaching and therefore the contamination of surface water and groundwater. On the other hand, the lower effectiveness of atrazine in controlling weeds in corn crops could be due to stimulation effect of atrazine on soil microorganisms promoting its rapid degradation.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN…… 1

1.1 HIPÓTESIS…… 4

1.2 OBJETIVOS…….. 5

1.2.1. Objetivo general……..... 5

1.2.2. Objetivos específicos……..... 5

1.3 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS…… 6

1.3.1 Residuos animales utilizados como enmienda orgánica de suelos .. 6

1.3.2 Antecedentes generales del comportamiento ambiental de pesticidas……... 9

1.3.3 Evaluación del efecto de pesticidas sobre los microorganismos del suelo: Aspectos metodológicos…….. 10

1.3.4 Atrazina en el suelo: procesos de adsorción y degradación…….. 12

1.3.4.1 Antecedentes generales de atrazina…….. 12

1.3.4.2 Movilidad de atrazina en el suelo……. 13

1.3.4.3 Degradación de atrazina en el suelo……. 16

1.3.5 Influencia de la aplicación de residuos animales sobre los procesos de adsorción y biodegradación de pesticidas……. 18

2 MATERIALES Y MÉTODOS…… 22

2.1 Suelo…… 22

2.2 Purín de origen bovino utilizado como enmienda de suelo…… 22

2.3 Atrazina y productos de degradación…….. 22

2.4 Aplicación del purín en el suelo…….. 23

2.5 Aplicación de atrazina en los suelos enmendados…….. 24

2.6 Análisis químico del purín, suelo y suelo enmendado…… 25

2.6.1 Análisis químico del purín……. 25

2.6.2 Análisis químico del suelo y suelo enmendado……. 25

2.6.3 Análisis a través de espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT IR)…… 26

2.7 Análisis microbiológicos……. 26

2.7.1 Respiración microbiana…… 27

2.7.2 Actividad enzimática…… 27

2.7.3 Análisis Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis en Gel con Gradiente de Denaturalización (DGGE)……..... 29
2.7.3.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR……... 29
2.7.3.2 Análisis DGGE ……. 29
2.7.3.3 Secuenciación de los fragmentos DGGE……... 30
2.8 Estudio de adsorción y mecanismos de adsorción de Atrazina……..... 30
2.8.1 Estudio de adsorción …….…. 31
2.8.2 Análisis FT IR del mecanismo de adsorción de atrazina……... 32
2.9 Determinación de atrazina residual y formación de sus productos de degradación…….. 32
2.9.1 Aplicación de atrazina……... 32
2.9.2 Extracción y análisis de atrazina y de sus productos de degradación 33
2.10 Análisis de datos…….……..… 35
3 RESULTADOS…….. 36
3.1 Caracterización química del purín, suelo y suelo enmendado……..… 36
3.2 Análisis FT IR del purín, suelo y suelo enmendado……..... 39
3.3 Caracterización biológica del suelo y suelo enmendado……..… 41
3.3.1 Actividad respiratoria……..…… 41
3.3.2 Actividad enzimática……..…. 42
3.3.3 Cambios en la comunidad microbiana…….…... 44
3.4 Estudio de adsorción y mecanismos de adsorción de atrazina……..… 45
3.4.1 Adsorción de atrazina…….…. 45
3.4.2 Mecanismos de adsorción de atrazina……..... 48
3.5 Persistencia de atrazina y determinación de sus productos de degradación.... 50
3.6 Efecto de atrazina sobre los microorganismos del suelo……..… 54
3.6.1 Respiración microbiana……... 54
3.6.2 Actividad enzimática…….….. 56
3.6.3 Análisis de la comunidad microbiana a través de PCR- DGGE…..... 59
4 DISCUSIÓN…… 62
4.1 Efecto de la aplicación de dosis crecientes de purín sobre las características química y biológica del suelo……... 62
4.1.1 Efecto del purín sobre las caracterización química del suelo……. 62
4.1.2 Efecto del purín sobre las características biológicas del suelo…….. 63

4.2 Adsorción y mecanismos de interacción de atrazina en el suelo y suelo enmendado…….….. 66

4.2.1 Adsorción de atrazina…….…. 66

4.2.2 Mecanismos de interacción de atrazina en el suelo y suelo enmendado……... 68

4.3 Atrazina residual y formación de sus productos de degradación……. 69

4.4 Efecto de atrazina sobre los microorganismos del suelo y suelo enmendado.. 73

5 CONCLUSIONES…….. 78

6 PROYECCIONES…….. 79

7 BIBLIOGRAFÍA…….… 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Estructura química de atrazina……..…….	12
2	Ruta general de degradación de atrazina. Fuente: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Database)……	17
3	Diseño de la metodología de preparación de los tratamientos de suelo enmendado S-0, S-100, S-200 y S-300 y las evaluaciones químicas y microbiológicas contempladas para su caracterización…….	23
4	Diseño de la metodología de incubación y evaluaciones realizadas para S-0, S-100, S-200 y S-300 pre-incubados por 30 días y con aplicación de atrazina en concentraciones de 0 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1}, 2 mg kg^{-1} y 3 mg kg^{-1}……	24
5	Espectro cromatográfico de atrazina (ATR) y de los productos de degradación deisopropilatrazina (DIA) deetilatrazina (DEA) e hidroxiatrazina (HA). Detección realizada a través de HPLC……...	34
6	Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT IR) del purín de origen bovino secado a 70°C (a) y del filtrado acuoso del purín (b)….	39
7	Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT IR) para el suelo sin enmendar (S-0) (a), purín (b), suelo enmendado con una dosis de aplicación de purines de 100.000 L ha^{-1} (S-100) (c), 200.000 L ha^{-1} (S-200) (d) y 300.000 L ha^{-1} (e). Las fechas indican bandas presentes en el suelo debido a la aplicación del purín……...	40
8	Respiración microbiana del suelo (S-0) y de los suelos enmendados con una dosis de purín de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y las barras de error estándar de la media……..	41
9	Actividad FDA para el suelo (S-0) y suelos enmendados con una dosis de purín de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y el error estándar de la media……...	43
10	Actividad β-glucosidasa para el suelo (S-0) y suelos enmendados con una dosis de purín de 100.00 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y	

300.000 L ha^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y las barras del error estándar de la media…….. 43

11 Análisis DGGE del 16S ADNr para el suelo S-0 (A) y los suelos enmendados S-100 (B), S-200 (C) y S-300 (D) para los días 1, 15 y 30 posteriores a la aplicación del purín……. 44

12 Cinética de adsorción de atrazina para el suelo (S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) pre-incubados por 30 días. Atrazina se aplicó en una concentración de 1,5 mg L^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y las barras del error estándar de la media…….. 45

13 Isotermas de adsorción de atrazina para el suelo control (S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) pre-incubados por 30 días. Las isotermas se realizaron considerando el rango de solubilidad de atrazina (0-30 mg L^{-1}). Se presentan los valores medios (n=3) y las barras del error estándar de la media…….. 46

14 Espectro FT IR para el suelo control (S-0) (a), complejo S-0 con atrazina (b) y atrazina pura (c)……... 48

15 Espectro FT IR para el suelo enmendado con purín en una dosis de aplicación de 300.000 L ha^{-1} (S-300) (a), complejo S-300 con atrazina (b) y atrazina pura (c)……... 49

16 Atrazina residual en el suelo(S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (S-100, S-200 y S-300, respectivamente). Atrazina se aplicó en concentraciones de 1 mg kg^{-1} (A) y 2 mg kg^{-1} (B). La evaluación se realizó por 80 días. Se presentan los valores medios (n=3) y el error estándar de la media……... 50

17 Porcentaje de residuos extractables de atrazina y de sus productos de degradación deetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA) e hidroxiatrazina (HA) para el suelo (S-0) y suelos enmendados con purines (S-100, S-200 y S-300) luego de 20 y 40 días de la aplicación de atrazina en el suelo en las concentraciones de 1 mg kg^{-1} (A) y 2

mg kg^{-1} (B). Letras distintas indican diferencias significativas para la cantidad total de los productos de degradación, según análisis de Tukey (P<0.05)…….. 53

18 Respiración microbiana del suelo (S-0) y suelo enmendado con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300), con aplicación de atrazina en las concentraciones de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1), 2 mg kg^{-1} (D-2) y 3 mg kg^{-1} (D-3). Se presentan los valores medios (n=3) y el error típico de la media…….….. 55

19 Actividad Fluoresceína diacetato (FDA) del suelo (S-0) y suelo enmendado con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300), con aplicación de atrazina en las concentraciones de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1), 2 mg kg^{-1} (D-2) y 3 mg kg^{-1} (D-3). Se presentan los valores medios (n=3) y el error típico de la media. …….. 57

20 Actividad β-glucosidasa del suelo (S-0) y suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300), con aplicación de atrazina en las concentraciones de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1), 2 mg kg^{-1} (D-2) y 3 mg kg^{-1} (D-3). Se presentan los valores medios (n=3) y el error típico de la media……..…..... 58

21 Análisis DGGE de los fragmentos 16S ADNr amplificado del suelo (A) y suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (B, C y D, respectivamente) con aplicación de atrazina en concentraciones de 0 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1}, 2 mg kg^{-1} y 3 mg kg^{-1} (E, F, G y H, respectivamente). Análisis realizados para los días 1, 10, 20, 40 y 60 posterior a la aplicación del herbicida en los suelo……. 60

22 Árbol filogenético del Reino Bacteria para las bandas dominantes observadas en el análisis DGGE de las bacterias 16S ADNr para el suelo control (S-0) y los suelos con aplicación de purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (B, C y D, respectivamente) con aplicación de atrazina……. 61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Características químicas promedio de los purines de origen bovino, obtenidos de planteles lecheros del sur de Chile……...	6
2	Propiedades físico-químicas de atrazina y de sus principales productos de degradación……..	13
3	Características químicas del purín…….	36
4	Características químicas del suelo (S-0) y del suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (S-100, S-200 y S-300, respectivamente) para los días 1 y 30 posterior a la aplicación de la enmienda……	38
5	Parámetros de la ecuación del modelo de Freundlich (K_f y N_f), valores $K_{f\text{-}oc}$ y el porcentaje de desorción de atrazina para el suelo (S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) pre-incubados por 30 días……..	47
6	Valores de las constantes de degradación (k d^{-1}), tiempos de vida media ($t_{½}$) y coeficientes de correlación (r^2) para atrazina aplicada en concentraciones de 1 mg kg^{-1}(D-1) y 2 mg kg^{-1} (D-2) en el suelo (S-0) y suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300)…….	51
7	Asignación filogenética de las bandas dominantes observadas en los geles DGGE derivados de bacterias 16S ADNr extraído de las muestras de suelo S-0 y suelo enmendado S-100, S-200 y S-300 expuestos a diferentes concentraciones de atrazina……...	61

1. INTRODUCCIÓN

Chile, se ha caracterizado en los últimos años por presentar una actividad industrial lechera, que ha experimentado un crecimiento en todas sus fases del proceso productivo (INE, 2006). Si bien, la producción de leche es variable, se ha observado que en los últimos diez años ésta se ha duplicado, con respecto a lo anterior, se observó que en relación al año 2006 la elaboración de leche aumentó durante el año 2007 entre un 3,3% y un 6,8% (ODEPA, 2008). En la zona sur del país se concentra el mayor número de planteles lecheros, sin embargo, son las regiones de Los Ríos y de Los lagos las que contribuyen con la mayor producción y recepción de leche (INE, 2006).

Los planteles lecheros, debido al confinamiento de una gran cantidad de animales, se encuentran asociados a la generación de elevadas cantidades de residuos a nivel predial (Salazar *et al*., 2007). El principal residuo generado en las lecherías es el purín de origen bovino, el cual se encuentra formado por una mezcla de fecas, orina y agua proveniente del lavado de los establos. Se estima que un plantel de 100 vacas con un buen nivel de producción (sobre 25 L d^{-1} de leche) se generan alrededor de 1.800 t anuales de estiércol, lo que sumado a las aguas de lavado y aguas lluvias resulta en un volumen total de 3.6 millones de litros anuales (Salazar *et al*., 2003).

Los purines presentan serios problemas ambientales y de disposición si no se realiza un manejo adecuado (Salazar *et al*., 2003). Sin embargo, como una forma de minimizar esta problemática se propone, a través de los acuerdos de producción limpia y buenas prácticas agrícolas que se utilicen como enmienda de suelo, ya que debido al alto contenido de nutrientes (N y P) y materia orgánica (MO), los purines actúan como fertilizantes y contribuyen a mejorar las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (Balesdenta *et al*., 2000; Chantigny *et al*., 2002).

La aplicación de purines se realiza en suelos destinados a praderas para ensilaje y cultivos tales como cebada, remolachas y maíz forrajero, observándose una mayor producción (Demanet *et al*., 1999; Dumont, 2004). En el maíz forrajero es posible aplicar mayores dosis de purines que en las praderas, lo que ha significado un ahorro en fertilizantes y que el uso de purines este dirigido principalmente a cultivos de maíz forrajero, en los cuales se aplican dosis variables que van entre desde los 12.000 - 300.000 L ha^{-1} anuales (Salazar *et*

al., 2003). El maíz forrajero, ha presentado un incremento importante en los últimos años debido a que es el cereal más utilizado en la alimentación de vacas lecheras (Jahn *et al*., 2000; Salazar *et al*., 2003). Según un reciente estudio del Instituto Nacional de Estadísticas respecto de las intenciones de siembra (2008-2009), el cultivo de maíz podría aumentar en más de 15.000 ha, debido a la pujante industria láctea de la región del Bío- Bío (Bayern CropScience, 2008). Lo anterior podría contribuir a un aumento de la aplicación de purines en el suelo.

En los cultivos de maíz se aplican diversos grupos químicos de herbicidas (fenoxiacéticos, acetanilidas, triazinas, entre otros) los cuales se utilizan en aplicaciones de pre y post emergencia. Entre los productos más utilizados se encuentra atrazina, herbicida que se aplica en dosis de 3 a 4 L ha^{-1} para el control de malezas de hoja ancha y gramíneas (AFIPA, 2006).

El manejo agronómico realizado en cultivo de maíz forrajero, consistente en la aplicación de purines y herbicidas, se ha asociado con la emergencia de densas poblaciones de malezas que invaden a estos cultivos, lo que ha provocado realizar aplicaciones reiteradas de herbicidas, específicamente de atrazina, usada como herbicida de presiembra (Demanet, *com pers*). El aumento del uso de herbicidas se ha relacionado por una parte a un aumento en los costos de producción y por otra, a un posible impacto ambiental, considerando que atrazina es un herbicida con características químicas que lo hacen un potencial contaminante de aguas superficiales y subterráneas. Ambas consecuencias consideradas como aspectos negativos para una actividad agrícola moderna que busca una producción eficiente y con mínimos impactos sobre el medio ambiente.

La necesidad de realizar reiteradas aplicaciones de herbicidas se ha relacionado con una disminución de su biodisponibilidad para las malezas a controlar (Golovlena *et al*., 1990; China *et al*., 2004; Tao *et al*., 2004). Considerando que, la biodisponibilidad de herbicidas, así como los procesos de volatilización y lixiviación se encuentran determinados por el grado de adsorción del producto en el suelo, es que se ha dado gran importancia a evaluar los procesos de adsorción y degradación de herbicidas en suelos a los que se les ha adicionado MO proveniente de la aplicación residuos orgánicos (Albarrán *et al*., 2004; Blacksaw *et al*., 2005; Briceño *et al*., 2007), ya que es el tipo y contenido de MO uno de

los principales factores encargados de regular la interacción herbicida–adsorbente (Clausen & Fabricius, 2001; Thorstensen *et al*., 2001).

A través de diversas evaluaciones se ha observado que la aplicación de enmiendas orgánicas modifica la movilidad (adsorción y lixiviación) y degradación de herbicidas (Abdelhafid *et al*., 2000; Cox *et al*., 2001; Graber *et al*., 2001; Singh, 2003; Sánchez *et al*., 2004). Con la enmienda, se incorpora MO al suelo lo que contribuye a aumentar la adsorción de herbicidas. Se ha observado que herbicidas tales como simazina, atrazina, alaclor han presentado un aumento en la capacidad de adsorción en suelos enmendados (Sluszny *et al*., 1999; Senesi *et al*., 2001; Albarrrán *et al*., 2004). Sin embargo, a través de la enmienda se incorpora también MO disuelta la cual puede provocar el efecto contrario (Celis *et al*., 1998), por lo que una disminución de la adsorción y aumento de los residuos lixiviados se ha observado para simazina, atrazina, 2,4-D, clorpirifos y metolachlor (Cox *et al*., 2001; Graber *et al*., 2001; Huang & Lee, 2001; Li *et al*., 2005). Por otra parte, la enmienda puede acelerar o aumentar la biodegradación de herbicidas, producto de la estimulación de la actividad de los microorganismos del suelo, los cuales son expuestos a una mayor disponibilidad de nutrientes (Abdelhafid *et al*., 2000; Cox *et al*., 2001; Namkoong *et al*., 2002; Dungan *et al*., 2003b; Sánchez *et al*., 2004). Esta respuesta se ha observado para atrazina, fenitrotion, dimetoato y metolachlor (Moorman *et al*., 2001; Getenga, 2003; Sánchez *et al*., 2004). También se ha encontrado, que la aplicación de enmiendas orgánicas no ejerce modificaciones sobre los procesos de adsorción, lixiviación o biodegradación de pesticidas en general (Moorman *et al*., 2001; Sánchez *et al*., 2004). Considerando lo anterior, la respuesta de herbicidas en suelos enmendados es diversa y no fácil de predecir ya que se encuentra determinada por las características de la enmienda, herbicida y del suelo evaluado (Graber *et al*., 2001; Wanner *et al*., 2005; Briceño *et al*., 2007).

En general los residuos aplicados al suelo, se caracterizan por presentar altos contenidos de carbono orgánico (CO) y de nutrientes, entre ellos nitrógeno, fósforo y potasio. Sin embargo, los niveles de nutrientes van a estar determinados por el grado de estabilización y maduración de la enmienda (Briceño *et al*., 2007). Los purines de origen bovino, comúnmente, son almacenados en tanques abiertos, por lo que sus características físico-químicas y microbiológicas se ven afectadas por la pluviometría de la zona. En general, presentan altos contenidos de nutrientes y MO disuelta (Moral *et al*., 2005; Plaza *et al*.,

2007). Por su parte, atrazina es una base débil que presenta un alto potencial para llegar a cursos de aguas superficiales y subterráneas (Graber *et al*., 2001; Selim, 2003; Kovaios *et al*., 2006). Además se caracteriza por ser biodegradable por los microorganismos del suelo dando origen a diversos productos de degradación o su completa mineralización (Topp *et al*., 2001). Finalmente, los suelos Andisoles del Sur de Chile son suelos volcánicos que presentan un alto contenido de CO, baja densidad y saturación de bases, la presencia de arcillas amorfas y una alta carga variable.

La necesidad de reciclar los nutrientes a través de la aplicación de purines, en cultivos de maíz forrajero en los que además se aplican herbicidas, ha resultado en una disminución de la eficiencia de, por ejemplo, atrazina. La conducta de herbicidas y específicamente de atrazina ha sido estudiada extensivamente, pero no así en suelos volcánicos de importancia agrícola, a los que además se les ha incorporado alguna enmienda orgánica de suelo. Debido a lo anterior, se planteó la necesidad de evaluar los posibles factores tanto físico-químicos y microbiológicos que podrían estar involucrados en los procesos de adsorción y degradación de atrazina en un suelo andisol con aplicación de purines.

De acuerdo a los antecedentes mencionados la hipótesis planteada es:

1.1. HIPÓTESIS

La aplicación de purines de origen bovino, en suelos de uso agrícola, aumenta el contenido de nutrientes y materia orgánica, con estas modificaciones, contribuyendo a una disminución de la adsorción de atrazina debido a un efecto del material orgánico incorporado a través de la enmienda y por otra parte a una disminución de la persistencia debido a una acelerada degradación, resultado de un efecto de estimulación sobre los microorganismos del suelo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la influencia de la aplicación de distintas dosis de purín de origen bovino sobre la adsorción y degradación de atrazina en un suelo andisol del sur de Chile.

1.2.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación de distintas dosis de purín sobre las características química y biológica del suelo.

- Evaluar la adsorción de atrazina y los mecanismos de interacción involucrados en el suelo con aplicación de distintas dosis de purines.

- Evaluar la persistencia de atrazina y la formación de sus productos de degradación en los suelos enmendados con distintas dosis de purines.

- Evaluar el efecto de la aplicación de atrazina sobre los microorganismos del suelo y suelo enmendado con distintas dosis de purines.

1.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.3.1. Residuos animales utilizados como enmienda orgánica de suelos

En el sur de Chile, los residuos animales utilizados como enmiendas en suelos de uso agrícola, provienen principalmente de las lecherías. Los planteles lecheros generan purines (mezcla de fecas, orinas y aguas de lavados) en cantidades elevadas y variables dependiendo del manejo aplicado y de la pluviometría de la zona. Se estima que una vaca de un peso entre 400 a 600 kg, genera alrededor de 40 – 60 kg d^{-1} de estiércol, lo que sumado con el agua de lluvia y del lavado de los establos, puede alcanzar, en un plantel de 100 vacas lecheras, una cantidad aproximada a los 3.6 millones de L $año^{-1}$ (Salazar *et al*., 2003; Superintendencia de Servicios Sanitarios & Ministerio de Agricultura, 2006).

Grandes cantidad de purines, son almacenados en pozos al aire libre, con el fin de estabilizar el material y reducir las pérdidas de N por lixiviación y volatilización. Los purines son considerados una importante fuente de nutrientes, entre ellos, N, P, K, además de microelementos (Thomsen, 2000; Hirzel & Walter, 2008). La composición de los purines es variable y depende de factores tales como el estado fenológico del forraje, la alimentación del rebaño y la estación del año. Por otra parte, el contenido de materia seca y de nutrientes depende del manejo del pozo purinero y de la pluviometría de la zona (Demanet *et al*., 1999). En la Tabla 1 se muestran algunas propiedades químicas de los purines obtenidos de planteles lecheros de la zona sur del país.

Tabla 1. Características químicas promedio de los purines de origen bovino, obtenidos de planteles lecheros del sur de Chile.

Materia seca	Materia orgánica	N	P	K	Ca	Mg
%						
1-7	46-85*	1,5-9,0	0,6-2,0	1-4	1-3	0,5-0,8

Fuente: Dumont (2004); Salazar *et al*. (2006). * en base a materia seca

Los purines, además de nutrientes que pueden se volatilizados o lixiviados poseen diversos microorganismos patógenos (virus, bacteria y hongos), los cuales pueden afectar la salud humana y animal, es por ello que son considerados un subproducto de la actividad lechera que presentan un potencial contaminante, si no se les realiza un manejo adecuado y si su disposición se realiza en cursos de agua (Dumont, 2004; Superintendencia de Servicios Sanitarios & Ministerio de Agricultura, 2006). Específicamente, los efluentes de lecherías han sido comúnmente asociados con la contaminación de aguas superficiales, debido a la acumulación de nutrientes (eutrofización), a problemas de salud en humanos debido al incremento de nitratos en agua de bebida, contaminación biológica por patógenos y a la reducción del oxígeno en aguas superficiales y subterráneas (Salazar *et al*., 2003).

Una de las alternativas para minimizar los impactos ambientales de los purines, es someterlos a algún tipo de tratamiento y realizar una adecuada disposición. Tratar a los purines tiene por finalidad modificar las características del residuo de tal forma que su eliminación no presente riesgos para el medio ambiente y la salud de las personas. Entre los tratamientos se destacan; el tratamiento primario de purines, que consistente en la homogenización y separación del sólido, para posteriormente ser sometidos a un tratamiento secundario, en el cual se logre su degradación biológica mediante procesos físico-químicos y biológicos (Peralta, 2005).

En general, en los predios agrícolas no se realiza un buen manejo y disposición de los purines, menos aún se considera la realización de un tratamiento debido a los costos económicos involucrados (Salazar *et al*., 2003). Sin embargo, como una forma de disminuir las elevadas cantidades de estos residuos que se acumulan diariamente en los planteles lecheros y también de minimizar los problemas ambientales con los que se asocian, los agricultores paulatinamente han incorporado dentro de sus prácticas la utilización de los purines en suelos de uso agrícola, con fines de fertilización (Dumont, 2004).

El uso de residuos animales como enmienda de suelo se encuentra regulado en Europa por la "Animal by-products regulations" 1774/2002 (DEFRA, 2002), la que indica que, la aplicación se realice de acuerdo a los requerimientos de fertilización del cultivo (Amlinger *et al*., 2003). En Chile, no existe una normativa específica que regule la aplicación de residuos animales, sin embargo, se ha establecido su uso como fertilizante y biorremediador de suelos, en los programas de Buenas Prácticas Agrícolas y Producción

Limpia propuestos por el Ministerio de Agricultura (CONAMA, 1998; Superintendencia de Servicios Sanitarios & Ministerio de Agricultura, 2006).

Los purines en el suelo, contribuyen a aumentar el contenido de MO y de nutrientes, favoreciendo así una mayor productividad de los cultivos (Balesdenta *et al*., 2000; Chantigny *et al*., 2002; Plaza *et al*., 2004). Los residuos animales son aplicados en el suelo generalmente en estado fresco, por lo que se recomienda que el cultivo se establezca entre dos y cuatro semanas después de la aplicación de la enmienda, de tal forma de permitir su estabilización en el suelo, aunque en la mayoría de los casos no se cumple con lo propuesto y el establecimiento del cultivo se realiza incluso algunos días luego de realizada la aplicación de la enmienda (Chambers *et al*., 2001; Salazar *et al*., 2003). Cuando se realiza una aplicación de la enmienda en estado fresco o como purín, el N disponible se encuentra sujeto a lixiviación y volatilización (Neeteson, 2000; Moral *et al*., 2005). Otra forma de aplicación de la enmienda, es en estado estabilizado, el cual se obtiene a través de un proceso de almacenamiento, sin embargo, se estima que en general los residuos animales durante su almacenamiento pierden, entre un 20–40% de N (Sommer, 2001) y entre un 24–53% del C, por lo que disminuye su potencial de fertilización (Thomsen, 2000).

Se recomienda, que en suelos de uso agrícola, los purines se apliquen en los sectores utilizados para la producción de ensilaje y cultivos tales como maíz, cebada, remolacha forrajera, entre otros (Salazar *et al*., 2003; Dumont, 2004). Se destaca el uso de purines en praderas para ensilaje y en cultivos de maíz forrajero, debido a las altas dosis de aplicación que reciben, además por que se ha observado un importante incremento de la producción al aplicar el purín (Demanet *et al*., 1999; 2002; Salazar *et al*., 2003). La dosis recomendada de aplicación de purines, se encuentra determinada por el contenido de materia seca que éstos presentan, es decir, a mayor porcentaje de materia seca la dosis disminuye. Por ejemplo, con purines de 3,5% de materia seca, se recomiendan una dosis entre 80-100 t ha^{-1}, si se trata de aplicaciones de primavera, mientras que en otoño esta dosis se reduce a una de 10 - 20 t ha^{-1} (Dumont, 2004). Sin embargo, en la mayoría de los predios la aplicación se encuentra determinada por la disponibilidad del residuo y por la obtención de la completa eliminación del residuo almacenado en los pozos purineros. La época recomendada para la aplicación de los purines, es al inicio del crecimiento activo de las plantas, proceso que ocurre a principios de primavera. En praderas, los purines son asperjados al inicio de la ocurrencia de las lluvias de otoño hasta el comienzo del periodo

caluroso, mientras que en cultivos de maíz, se aplican de forma parcializada desde abril a septiembre, para finalizar antes de la siembra que comienza en octubre. Durante este periodo la carga final de purines corresponde a una aplicación aproximada de 300.000 L ha^{-1}, con lo que se logra el vaciado de los pozos purineros (Demanet *Com pers*; Salazar *et al*., 2007).

1.3.2. Antecedentes generales del comportamiento ambiental de pesticidas

El uso de pesticidas (herbicidas, fungicidas, nematicidas, etc) es indispensable en los sistemas agrícolas tradicionales para controlar diversos tipos de plagas. Sin embargo, muchos de estos compuestos luego de su aplicación directa o indirecta sobre el suelo pueden disipar aún hacia áreas no agrícolas (Briceño *et al*., 2007). Considerando que los pesticidas, dependiendo de sus características químicas, presentan diversos grados de toxicidad, existe especial interés en determinar la fase ambiental en que se encuentran luego de su aplicación y los impactos que pueden provocar en la salud humana y en el medio ambiente. Posterior a su aplicación, los pesticidas presentan diversos procesos, entre los que se encuentran, volatilización, biodegradación, absorción por las plantas, degradación química, adsorción en el suelo, escurrimiento hacia aguas superficiales y lixiviación hacia aguas subterráneas, cada uno de estos procesos en forma individual o a través de su interacción van a determinar el destino ambiental del producto (Semple *et al*., 2001).

Los principales problemas ambientales asociados con el uso de pesticidas en la agricultura, se relacionan con la contaminación de suelos y aguas tanto superficiales como subterráneas, debido a que algunos de estos productos son persistentes o presentan toxicidad aún a bajas concentraciones (Crecchio *et al*., 2001). La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por pesticidas, se encuentra determinada por las características físico-químicas del compuesto, por las propiedades del suelo y por otros factores tales como el régimen de lluvia y de viento, además de la topografía del lugar (Carabias-Martínez *et al*., 2000; Holland, 2004). Entre las propiedades físico-químicas importantes a considerar del pesticida son la solubilidad en agua, el coeficiente de adsorción CO (K_{oc}), el coeficiente de partición octanol agua (K_{ow}) y la tasa de degradación (Carabias-Martínez *et al*., 2000). En relación a lo anterior, se establece que valores de K_{oc} menores a 500 dan cuenta de un pesticida que tiende a permanecer en agua más que ser adsorbido en el suelo y valores de K_{ow} iguales o superiores a 4 indican que el producto es bio-acumulable.

Debido al interés público y privado que presenta la contaminación por pesticidas, se han desarrollado programas de monitoreo y vigilancia ambiental en Estados Unidos y países Europeos (Müller *et al*., 2002). En Chile son escasos los programas de monitoreo de pesticidas (Barra *et al*., 1999; Palma *et al*., 2004) debido a los altos costos involucrados. Sin embargo, a través de los escasos programas de monitoreo, ha sido posible confirmar la presencia de residuos de pesticidas, por ejemplo, estudios realizados en el río Aconcagua confirmaron la presencia de los productos lindano, diazinon y atrazina, entre otros (Baéz *et al*., 1996), además como parte de un programa de monitoreo realizado en el río Traiguén se detectaron residuos de los productos simazina, MCPA y carbendazim (Palma *et al*., 2004). Actualmente, se ha aumentado el interés por estudiar el comportamiento ambiental de pesticidas, debido a que los productos actuales presentan una mayor solubilidad en agua que los productos usados con anterioridad, lo que ha provocado un aumento de la probabilidad de que éstos productos sean transportados a aguas superficiales (Barra *et al*., 1999; Müller *et al*., 2002).

1.3.3. Evaluación del efecto de pesticidas sobre los microorganismos del suelo: Aspectos metodológicos

Los microorganismos del suelo responden rápidamente a los cambios ambientales, por lo que las variaciones de la población y actividad de los microorganismos son considerados un excelente indicador de la salud del suelo (Ros *et al*., 2006). Las evaluaciones de parámetros del suelo, como biomasa y actividad microbiana han sido de gran importancia por muchos años debido al importante rol que juega la microflora del suelo en el ciclo de los nutrientes, en la degradación de residuos orgánicos, en la síntesis de sustancias húmicas y en la degradación de contaminantes (Sánchez-Monedero *et al*., 2008).

Con relación a la exposición de pesticidas, es limitada la información de sus efectos en la abundancia, metabolismo y composición de los microorganismos del suelo, los cuales pueden fuertemente influenciar la productividad de los suelos agrícolas (Crecchio *et al*., 2001). Como una forma de contribuir al escaso conocimiento del efecto de pesticidas sobre los microorganismos del suelo, se han realizado evaluaciones que permitan identificar los cambios que se producen en respuesta a perturbaciones ambientales. Los métodos comúnmente utilizados, se basan en técnicas de cultivo de microorganismos o en mediciones de la actividad metabólica de éstos (Crecchio *et al*., 2001; Seghers *et al*., 2003; Ros *et al*., 2006). Entre los parámetros bioquímicos generales, es común la evaluación a

través de el C biomásico microbiano, actividad dehidrogenasa, respiración del suelo, mineralización de N, capacidad hidrolítica FDA o contenido de ATP, mientras que para evaluaciones de parámetros bioquímicos específicos, se utilizan mediciones de actividades enzimáticas, como la actividad fosfatasa, β-glucosidasa y ureasa, las cuales representan los ciclos del P, C y N, respectivamente (Gil-Sotres *et al*., 2005). Se ha observado, que los pesticidas en general, afectan la actividad microbiana del suelo. Por ejemplo, glifosato, paraquat, atrazina y carbaril, han provocado una disminución de la actividad enzimática invertasa, ureasa y fosfatasa en diversos suelos (Sannino & Gianfreda, 2001). La mineralización de C y N se ha visto influenciada por la adición de atrazina y glifosato, observándose que la aplicación de bajas dosis estimula la actividad microbiana y aumenta eventualmente la mineralización de estos compuestos (Haney *et al*., 2002). Por su parte Ros *et al*. (2006) observó que atrazina provoca un aumento del número de bacterias al aplicar altas concentraciones de este producto (100-1000 mg kg^{-1}), mientras que a bajas concentraciones el número de bacterias se mantiene similar al suelo sin aplicación del herbicida. Se ha observado además, que atrazina ha provocado un aumento de la respiración microbiana del suelo, un incremento del C biomásico microbiano luego de cierto tiempo de incubación, un aumento del contenido de ATP y finalmente un aumento de la actividad dehidrogenasa al aplicar altas concentraciones del herbicida, estos resultados se han relacionado a la presencia de microorganismos adaptados o con la capacidad para utilizar a atrazina como fuente de nutrientes (Moreno *et al*., 2006).

Como una forma de complementar los métodos bioquímicos y microbiológicos tradicionales y a la vez poder monitorear posibles cambios ya sean temporales y/o espaciales de la comunidad microbiana del suelo, se han desarrollado y aplicado otros métodos, como es el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Seghers *et al*., 2003). Este último ha ganado preferencia en diversos grupos de investigación, por lo que es utilizado con mayor frecuencia para evaluar cambios en la comunidad microbiana en muestras ambientales, ya que es un método efectivo que permite el análisis de varias muestras en forma simultanea y puede mostrar cambios en la estructura de la comunidad microbiana que no son detectados por los métodos tradicionales. Estudios de cambios en las comunidades microbiana a través de DGGE y su relación con la degradación de pesticidas se han realizado para diversos compuestos, en entre ellos, atrazina (Seghers *et al*., 2003; Martin-Laurent *et al*., 2004; Smith *et al*., 2005; Ros *et al*., 2006).

1.3.4. Atrazina en el suelo: procesos de adsorción y degradación

1.3.4.1. Antecedentes generales de atrazina

Atrazina [6-cloro-N-etil-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (Figura 1) es un herbicida que desde su introducción al mercado en el año 1950 se ha usado ampliamente a nivel mundial por tener un valor relativamente económico y un eficiente control de malezas.

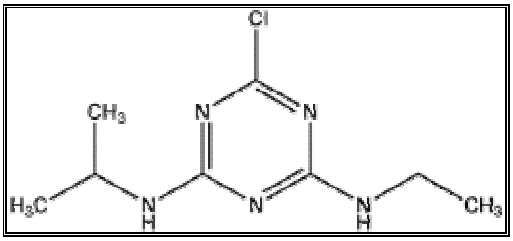

Figura 1. Estructura química de atrazina

Atrazina, es un herbicida sistémico, selectivo, absorbido principalmente a través de las raíces pero también por el follaje donde actúa a través de la inhibición del transporte de electrones y fotosíntesis (Tomlin, 1995; De Schrijver & De Mot, 1999; Topp *et al*., 2001). Atrazina se utiliza en diversos tipos de cultivos, entre ellos, maíz (*Zea mays* L.), específicamente para este cultivo la aplicación se realiza durante el periodo de pre y post emergencia para el control de malezas de hoja ancha y gramíneas, con una dosis recomendada de aplicación de 3,0 a 4,0 L ha^{-1} (AFIPA, 2006).

Atrazina debido a su amplio uso, vida media (entre 30 y 160 días) relativamente prolongada en suelos agrícolas y moderada adsorción (K_{oc} 100 mg L^{-1}) ha sido detectada, junto a sus productos de degradación, en cursos de agua superficiales y subterráneas (Abdelhafid *et al*., 2000; Carabias- Martínez *et al*., 2002; Patterson *et al*., 2002). En la tabla 2 se muestran algunas propiedades físico-químicas de atrazina y de sus principales productos de degradación, hidroxiatrazina [4-(etilamino)-2-hidroxi-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazina] (HA), deetilatrazina [6-cloro-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina] (DEA) y deisopropilatrazina [6-cloro-N-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina] (DIA). Para atrazina, se ha encontrado una frecuencia de contaminación del orden del 38 %, con concentraciones

variables desde 0,1 a 27 mg L^{-1} (Costa *et al*., 2004). Actualmente, en Chile a través de la Norma Secundaria de Calidad de Aguas, se admite una concentración máxima de 1 µg L^{-1} para atrazina y sus productos de degradación (CONAMA, 2004), debido a que a atrazina se le ha atribuido provocar efectos tóxicos agudos y crónicos en la fauna acuática (Kadian *et al*., 2008), por ejemplo, causar trastornos endocrino, tales como la feminización de ranas macho (Lesan & Bhandari, 2004).

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de atrazina y de sus principales productos de degradación.

Compuesto	Peso Molecular (g mol^{-1})	pKa[1]	Solubilidad [2] (mg L^{-1})	Log K_{ow} [3]
Atrazina*	215,6	1,6-1.7	33	2,2-2,7
Hidroxiatrazina	197,2	4,9-5,2	5,9	1,40
Deetilatrazina	187,6	1,3-1,7	3.200	1.52
Deisopropilatrazina	173,6	1,3-1,5	670	1.13

Fuente: Tomlin, 1995; PAN Pesticida Database. (1) Constante de disociación a 25 °C; (2) Solubilidad en agua a 20 °C; (3) Coeficiente de partición octanol-agua a 20 °C, pH 7,0. *pKb= 12, 3

Atrazina debido al uso dado, además de los problemas ambientales con los que se relaciona, es un producto que ha recibido gran atención y ha sido ampliamente estudiado, por lo que diversas evaluaciones se ha dirigido a evaluar por ejemplo, las técnicas más adecuadas de detección de atrazina en muestras ambientales (Loss & Nieesner, 1999; Jiang *et al*., 2005), la adsorción e interacción de atrazina en los constituyentes del suelo (Senesi *et al*., 1995; Selim, 2003; Ureña-Amate *et al*., 2005; Kovaios *et al*., 2006; Ling *et al*., 2006) además de su persistencia y mecanismos de degradación en el suelo (Houot *et al*., 2000; Abdelhafid *et al*., 2000; Topp, 2001; Rhine *et al*., 2003).

1.3.4.2. Movilidad de atrazina en el suelo

La movilidad y degradación de un herbicida está determinada por su adsorción en los constituyentes del suelo (Thorstensen *et al*., 2001; Sorensen *et al*., 2003; Boivin *et al*., 2005; Khna & Anjaneyulu, 2005). La adsorción de un herbicida va a depender de diversos factores, entre ellos, del contenido y tipo de la MO del suelo, contenido y tipo de arcillas,

pH, cantidad de producto aplicado y contenido de C en la solución del suelo. La MO de el suelo es considerada como el principal regulador en la interacción herbicida - adsorbente (Lesan & Bhandari, 2004). Sin embargo, se ha observado que en suelos con bajos contenidos de CO son las superficies de los minerales las que predominan en la interacción (Clausen *et al*., 2001; Thorstensen *et al*., 2001; Khna & Anjaneyulu, 2005).

La adsorción de atrazina en la MO y minerales de arcilla ha sido ampliamente estudiado. Atrazina ha mostrado alta afinidad de adsorción por minerales de arcilla y óxidos de hierro, principalmente en suelos con contenido de CO inferiores al 4% (Dousset *et al*., 1994). Estos constituyentes del suelo, favorecen la adsorción debido a la mayor área superficial, capacidad de intercambio catiónico y por la presencia de grupos como silanol y aluminol, los cuales se encuentran disponible para la adsorción de compuestos no cargados, como atrazina (Clausen & Fabricius, 2001; Clausen *et al*., 2001). Se ha observado, que esmectitas y kaolinitas, actúan como buenos adsorbente de atrazina (Clausen *et al*., 2001; Park *et al*., 2003). Por otra parte, atrazina presenta una baja adsorción en óxidos de hierro a pH cercanos a 4,6; lo anterior debido a que en estas condiciones, de acuerdo al pK_b de atrazina (12,3), se encuentra como un compuesto sin carga, no así en condiciones extremadamente ácidas donde se encontraría protonada (Clausen & Fabricius, 2001).

Si bien la adsorción de atrazina en el suelo es un proceso importante a considerar en relación a su movilidad, la desorción es igual de significativa ya que determina la cantidad que puede llegar a lixiviar y por lo tanto a contaminar. Atrazina se caracteriza por ser un herbicida que presenta una adsorción preferentemente reversible (Kovaios *et al*., 2006), en relación a lo anterior, se ha observado que, aproximadamente un 90% del producto puede llegar a ser desorbido (Boivin *et al*., 2005).

Se ha observado, que posterior a la aplicación de herbicidas y una vez que entran en contacto con el suelo, aproximadamente entre un 10 y un 25% del producto forma residuos no extractables (Kästner *et al*., 1999; Mordaunt *et al*., 2005), es decir, interacciones fuertes en las que participan grupos hidroxilos, carbonilos, nitro, amino y fosfatos, los cuales a través de enlaces del tipo covalente interaccionan con mayor fuerza a medida que aumenta el tiempo de contacto del herbicida con la MO del suelo (proceso conocido como "aging") (Barraclough *et al*., 2005). Entre los productos que pueden formar residuos no extractables se encuentra atrazina, por ejemplo, se ha observado que luego de 90 días aproximadamente un 25% de la cantidad de atrazina aplicada al suelo no pudo ser extraída (Mordaunt *et al*.,

2005) mientras que Lesan & Bhandari (2004) encontró que un 50% formó residuos no extractables en un suelo con 6% de MO luego de 80 días de su aplicación.

Para atrazina se han descrito diversos mecanismos de interacción con los constituyentes orgánicos del suelo, entre ellos, se destacan las interacciones del tipo hidrofóbica, interacciones a través de puentes de hidrógeno y mecanismos de transferencia de carga (Martin-Neto *et al*., 2001; Kah & Brown, 2006). Senesi (1992) encontró que atrazina interacciona con ácidos húmicos de la MO del suelo a través de enlaces covalentes, a este tipo de interacción a la vez se le a atribuido influir en sobre la menor desorción de atrazina en suelos con altos contenidos de MO humificada (Dosset *et al*., 1994; Selim, 2003).

Atrazina presenta su máxima adsorción en pH cercanos a tres en ácidos húmicos y ácidos fúlvicos del suelo, debido a que en pH ácidos del suelo, atrazina se encuentra protonada y puede interactuar con grupos con carga negativa presentes en la MO del suelo (OH y COOH) (Martin-Neto *et al*., 2001), mientras que presenta una disminución de la adsorción a medida que aumenta el pH del suelo, la misma respuesta se ha observado para su producto de degradación DEA (Kah & Brown, 2006). Los productos de degradación DIA y DEA son compuestos que presentan una mayor solubilidad en agua que atrazina, por lo que presentan una menor capacidad de adsorción y por lo tanto una mayor probabilidad de lixiviación y llegar a cursos de agua. Sin embargo, ésta alta movilidad ha sido disminuida al aumentar el contenido de CO del suelo (Krutz *et al*., 2003). Para el metabolito HA, caracterizado por presentar una baja solubilidad, es el producto que presenta una mayor capacidad de adsorción, aún en suelos con bajo contenido de CO, en los cuales los minerales de arcilla juegan un rol preponderante (Abate *et al*., 2004). Hidroxiatrazina presenta, al igual que otras s-triazina afinidad para adsorberse a través del mecanismo de transferencia de carga donde forma complejos con ácidos fúlvicos y húmicos del suelo, pero especialmente con el material que presenta un mayor grado de humificación (Martin-Neto *et al*., 2001). En general, los ácidos húmicos, juegan un rol importante en la adsorción de atrazina y de sus productos de degradación, debido a que todos ellos, presentan un incremento en la adsorción en suelos con altos contenidos de este tipo de material orgánico (Abate *et al*., 2004).

1.3.4.3. Degradación de atrazina en el suelo

Atrazina, es un producto que puede ser degradado a través de procesos abióticos y bióticos. Entre los procesos abióticos, se incluyen reacciones fotocatalíticas y reacciones vía oxidación con óxidos metálicos, particularmente con óxido de manganeso (Smith *et al*., 2005). La degradación de atrazina, se inicia a través del mecanismo hidrolítico que incluye los procesos de declorinación hidrolítica, N-dealquilación, deaminación, y rompimiento del anillo, con lo que se originan los productos de degradación HA, DEA y DIA (Figura 2 Tabla 2), además de algunos otros productos hidroxilados. Estos productos de degradación pueden originarse a través de procesos de degradación abióticos como bióticos (Rhine *et al*., 2003).

Atrazina, es un herbicida de persistencia moderada en el suelo que va de unos pocos días (7-35) a periodos de tiempo más prolongados (1 año), dependiendo de las condiciones ambientales e historia de aplicación del producto (Getenga, 2003; Hang *et al*., 2003; Rhine *et al*., 2003). Se considera que la degradación biológica es el principal mecanismo controlador de la disipación de atrazina en el suelo. Con relación a lo anterior, se han aislado diversas especies de hongos y bacterias que presentan la capacidad de transformar la molécula de atrazina a través de reacciones de dealquilación y declorinación dando lugar a diferentes productos de degradación. Sin embargo, también se han aislados microorganismos, con la capacidad de mineralizar completamente la molécula de atrazina (Topp, 2001). La degradación de atrazina puede seguir varias vías metabólicas, en donde pueden participar especies individuales o un consorcio de microorganismos (Smith *et al*., 2005).

Atrazina puede ser utilizada como fuente de C y de N por los microorganismos del suelo (Topp *et al*., 2000; Rhine *et al*., 2003). Sin embargo, la oxidación de la cadena alquílica de atrazina, proporciona la única fuente de C y energía disponible para los microorganismos, ya que los átomos de C del anillo están oxidados y por lo tanto no son incorporados dentro de la biomasa microbiana, mientras que los átomos de N presentes en el anillo y en las cadenas laterales se encuentran disponibles para ser utilizados como fuente de N (Rhine *et al*., 2003).

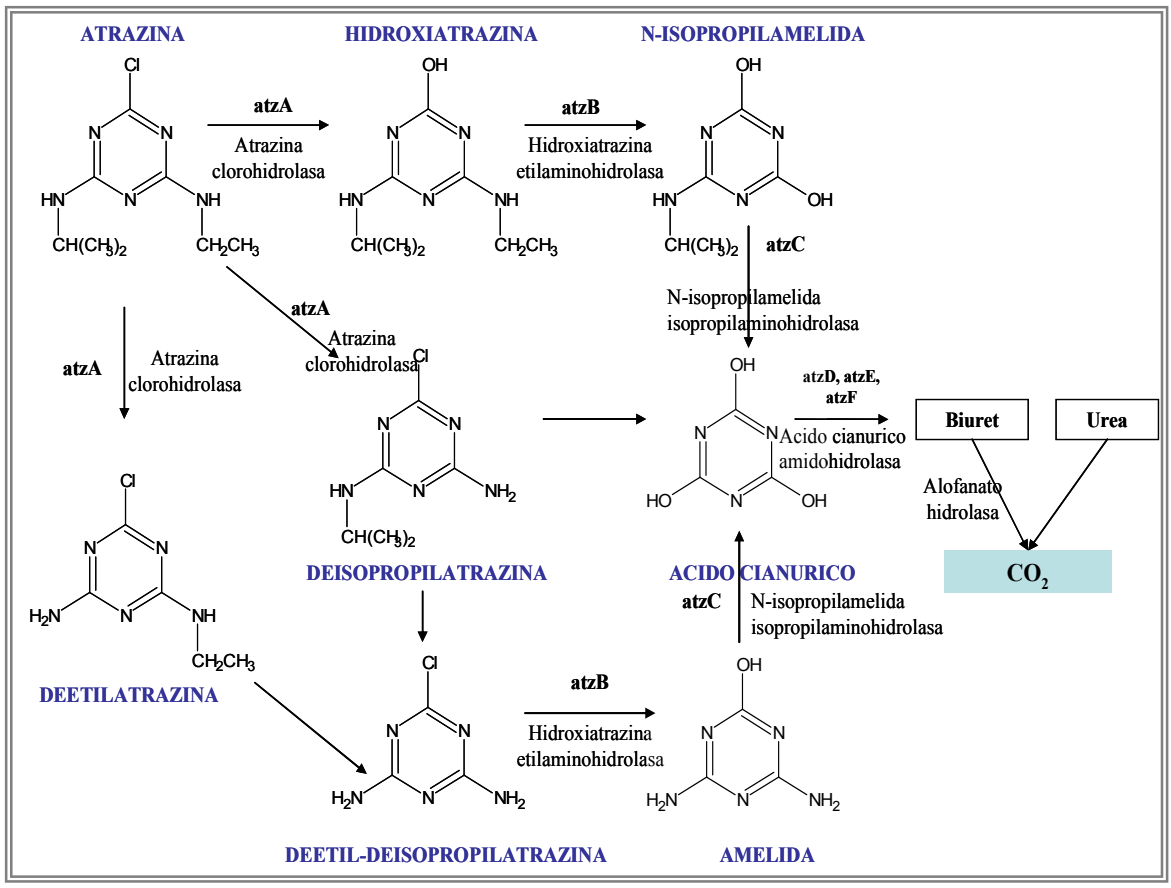

Figura 2. Ruta general de degradación de atrazina. Fuente: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Database).

Varias especies pertenecientes al género *Pseudomonas* utilizan, en general a *s*-triazinas como fuente de N para su crecimiento, ya que poseen una enzima hidrolasa que cataliza reacciones de deaminación del anillo triazínico (Kumar *et al*., 1996). Estas bacterias inician la degradación de atrazina a través de una declorinación hidrolítica, dando lugar al producto de degradación HA. Bacterias tales como *Pseudomonas* sp., cepa *ADP* y *Rhizobium* sp., presentan la capacidad para dealquilar la cadena etil de HA y formar N-isopropilamelida, mientras que *Nocardia* sp., a través de los genes t*rzN,* a*tzB* y a*tzC* dealquila HA para formar N-etilamelida (Smith *et al*., 2005). Existen varios genes que codifican una enzima atrazina clorohidrolasa (*atzA*) y dos reacciones aminohidrolíticas (a*tzB y atzC*), las cuales convierten a atrazina, a través del rompimiento del anillo, en el sustrato ácido cianúrico, el cual posteriormente es convertido por otras hidrolasas en los sustratos biuret y urea, además de CO_2 (Topp, 2001). También se ha asociado al gen a*trA* en la codificación de la enzima citocromo P-450 monooxigenasa, la cual causa la

espontánea N-dealquilación del grupo etil o isopropil después de la hidroxilación. Esta reacción se ha relacionado a la presencia de *Rhodococcus* sp. (Ostrofsky *et al*., 2002).Bacterias tales como *Pseudaminobacter* sp., y *Nocardiodes* sp., utilizan atrazina como única fuente de C y de N, mientras que *Pseudomonas* sp., pueden degradar altas concentraciones de atrazina bajo condiciones de crecimiento donde utilizan al herbicida como fuente de C y en algunos casos de N (Topp *et al*., 2000; Topp, 2001; Van Eerd *et al*., 2003). A través de la revisión bibliográfica realizada por De Schrijver & Mot (1999) se establece, que diversos microorganismos perteneciente al grupo de actinomycetes, entre ellos *Rhodoccocus* sp., *Nocardia* sp., y S*treptomices* sp., han sido capaces de degradar atrazina metabolizándola como fuente de C a través de procesos de dealquilación. También especies de hongos presentan la capacidad para degradar atrazina, entre ellos cabe mencionar a *Coriolus versicolor*, *Hypholoma fasciculare* y *Stereum hirsutum* (Bending *et al*., 2002).

Una de las principales causas que determina la persistencia de herbicidas en el suelo es, la falta de condiciones óptimas que favorezcan los procesos de biodegradación (Golovlena *et al*., 1990; Moorman *et al*., 2001). La degradación microbiana esta determinada por diversos factores, entre ellos los niveles de nutrientes, humedad, aireación, temperatura y pH (Awasthi *et al*., 2000; Peigné & Girardin, 2004; Khna & Anjaneyulu, 2005). La tasa de mineralización de atrazina, presenta una fuerte influencia por los factores antes mencionados (Getenga, 2003). Kumar *et al*. (1996) señala que la degradación de atrazina está determinada por el pH del suelo. Por su parte, Rhine *et al*. (2003) siguiere que la aplicación de MO influye en la mineralización de atrazina y no así la modificación en la relación C/N, mientras que Entry & Emmingham, (1995) observaron que altos niveles de N en el suelo pueden inhibir la mineralización de atrazina.

1.3.5. Influencia de la aplicación de residuos animales sobre los procesos de adsorción y biodegradación de pesticidas

El aumento de la aplicación de residuos orgánicos en suelos de uso agrícola, ha motivado que en los últimos años diversos trabajos de investigación se enfoquen a evaluar la conducta de adsorción y degradación de varios grupos químicos de pesticidas en el suelo (Briceño *et al*., 2007). Existen diversas tendencias y resultados del efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas sobre los procesos de adsorción-desorción, lixiviación y biodegradación de pesticidas en suelos enmendados. En general, la enmienda contribuye a

aumentar la adsorción de pesticidas (Sluszny *et al*., 1999; Senesi *et al*., 2001; Worrall *et al*., 2001; Albarrán *et al*., 2004; Said-Pullicino *et al*., 2004), disminuir la adsorción con un consecuente aumento de los lixiviados (Cox *et al*., 2001; Graber *et al*., 2001; Li *et al*., 2005), aumentar o acelerar la biodegradación (Moorman *et al*., 2001; Dungan *et al*., 2003a,b; Getenga, 2003; Sánchez *et al*., 2004) o simplemente no presentar efectos. Los factores involucrados en determinar la influencia de la enmienda sobre los procesos de pesticidas en el suelo son el tipo de suelo, características de los pesticidas y características de las enmiendas. En este sentido, las principales características de la enmienda, consideradas importantes en el proceso de adsorción son el contenido de C total, contenido de MO disuelta y grado de humificación de la MO.

Los estudios realizados con la finalidad de entender y aclarar la influencia de la aplicación de residuos orgánicos sobre los procesos de pesticidas en el suelo han considerado la utilización de residuos tales como compost, proveniente de distintas fuentes (Sluszny *et al*., 1999; Cox *et al*., 2001; Dungan *et al*., 2003a,b; Getenga, 2003; Getenga & Kengara, 2004; Said-Pullicino *et al*., 2004), biosólidos (Graber *et al*., 2001; Perrin-Ganier *et al*., 2001; Senesi *et al*., 2001; Albarrán *et al*., 2004; Sánchez *et al*., 2004) y residuos animales (Moorman *et al.,* 2001; Senesi *et al*., 2001; Worrall *et al*., 2001; Singh, 2003). Entre los residuos animales utilizados como enmienda de suelo, se encuentran los purines de cerdo y bovino, estiércol (bovino, caprino, etc) y fecas de aves (Briceño *et al*., 2007). Por su parte, los pesticidas evaluados, comprenden diversos grupos químicos, entre ellos, cloroacetanilina, organofosforados, sulfonilureas y triazinas (Briceño *et al*., 2007).

A través de evaluaciones realizadas, se ha observado, que la aplicación de enmiendas provenientes de origen animal modificó, por ejemplo, la adsorción de dos pesticidas de las familias química tiocarbamatos y organoclorados, ambos caracterizados por presentar una baja solubilidad. Para tiocarbamato se encontró un coeficiente de adsorción (K_d) de 12,6 comparado a un K_d de 7,2 en el suelo control, atribuyéndosele una interacción del tipo hidrofóbica con moléculas alifáticas y aromáticas presentes en la enmienda. Por otra parte, para el pesticida organoclorado, clordano, se observó una menor adsorción en el suelo enmendado con purines de cerdo, lo anterior debido a que a través de la enmienda se incorporó al suelo MO, pero principalmente ácidos fúlvicos (Senesi *et al*., 2001). Un aumento en la adsorción ha sido reportada para carbamatos (Worrall *et al*., 2001) y cloroacetanilidas, para este último también se ha observado una disminución de los

residuos lixiviados a medida que aumentó el contenido de MO disuelta (Singh, 2003). La MO disuelta es considerada como el principal factor que actúa modificando los procesos de adsorción-desorción de pesticidas en suelos enmendados (Celis *et al*., 1998). Sin embargo sus efectos pueden ser diversos dependiendo del suelo y pesticida evaluado, por lo que también se ha observado que altos niveles de MO disuelta han aumentado la lixiviación de pesticidas (Graber *et al*., 2001) y por lo tanto contribuido a la contaminación de aguas (Bolan *et al*., 2004). Para atrazina, se ha observado que forma complejos o asociaciones con la MO disuelta resultando en una disminución de la adsorción si la MO disuelta no es adsorbida por el suelo (Ben-Hur *et al*., 2003). Además, presenta un tipo de interacción hidrofóbica no específica con la MO disuelta debido a la presencia de grupos aromáticos o alifáticos del material disuelto (Ilani *et al*., 2005). Por su parte, se ha observado que bajas concentraciones de MO disuelta aumentan la adsorción de atrazina, mientras que altas concentraciones la disminuyen (Ling *et al*., 2006). Para triazinas en general, se ha observado que la aplicación de enmiendas orgánicas modifican los procesos de adsorción-desorción. La aplicación de biosólidos en un suelo (0,56% CO) provocó un aumento del contenido de CO que fluctúo entre un 2,20 y 3,62%. Esta modificación de las características químicas del suelo, contribuyó a que la adsorción de simazina aumentara, lo que se evidenció por un aumento del Coefiente Freundlich (K_f) de 0,94 en el suelo sin enmienda a un K_f de 2,34 en el suelo enmendado. Además, se observó que el aumento en la adsorción de simazina, directamente influyó sobre la lixiviación de sus residuos, siendo un 55% en suelo enmendado, comparado con una lixiviación de un 87% en el suelo sin enmienda (Albarrán *et al*., 2004). A través de la evaluación de la influencia de compost en suelos con diferentes contenidos de CO (0,40% y 1,55%), los resultados mostraron que atrazina, ametrina y terbutilazina, aumentaron su adsorción en un 74%, observándose claramente la influencia en el tipo de suelo. La mayor adsorción se presentó en el suelo enmendado que originalmente presentaba un menor contenido de MO (Sluszny *et al*., 1999).

La aplicación de enmiendas orgánicas al suelo, afecta la biodegradación de pesticidas a través de un aumento o acelerada degradación del producto (Houot *et al*., 1998; Abdelhafid *et al*., 2000; Kadian *et al*., 2008). Una acelerada degradación se ha asociado al aumento en el número, actividad o biomasa de los microorganismos, los cuales son estimulados por la aplicación de la enmienda a través de la incorporación de nutrientes y consorcio de microorganismos (Perrin-Ganier *et al*., 2001; Albarrán *et al*., 2004).

Se ha observado, que atrazina presenta una mayor degradación en suelos en los que se ha aplicado algún residuo orgánico (Hang *et al*., 2003). En suelos agrícolas enmendados con purines de origen bovino, atrazina presentó una mayor degradación y la fase de latencia antes de iniciarse la degradación fue menor, comparada al suelo sin enmendar, lo que se ha relacionado con el aumento del número de hongos y bacteria, además del contenido de MO disuelta (Entry & Emmingham, 1995; Topp *et al*., 1996). Por su parte, Moorman *et al*. (2001) observó que en un suelo (2,4% de CO) enmendado con residuos de bovinos compostado y luego de 245 días de la aplicación de atrazina, su concentración fue de 25 mg kg^{-1} en el suelo enmendado y de 125 mg kg^{-1} en el suelo sin enmienda, lo anterior, se explicó por una efecto de la enmienda en acelerar la degradación de atrazina, producto del incremento en un 200% de la actividad microbiana en el suelo con aplicación del residuo animal (Moorman *et al*., 2001). Finalmente, atrazina en un suelo (2,07%C) enmendado con compost mostró que la mineralización posterior a 112 días fue de un 55,1%, mientras que sólo un 30,7% fue mineralizado en el suelo original. Estos resultados fueron explicados por la contribución de microorganismos en el suelo, sumado a que atrazina permaneció preferentemente en estado no adsorbido lo que permitió una mayor disponibilidad para ser degradado (Getenga, 2003). Se ha observado, que la aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo aceleran la degradación de diversos grupos químicos de pesticidas, entre ellos, organofosforados (Sánchez *et al*., 2004), cloroacetamidas (Moorman *et al*., 2001), y el fungicida metil isotiocianato el cual presentó una persistencia de 1 día en suelo enmendado con fecas de ave comparado a una persistencia de 5 días en el suelo sin enmendar (Dungan *et al*., 2003a).

En conclusión, la incorporación de MO al suelo proveniente de enmiendas orgánicas, cualquiera sea su origen, puede presentar un efecto dual sobre el comportamiento de pesticidas en el suelo, ya que puede contribuir a modificar la capacidad de adsorción, en algunos casos disminuyendo los residuos lixiviados, y por lo tanto contribuir a una menor contaminación de aguas subterráneas (Sluszny *et al*., 1999; Singh, 2003; Albarrán *et al*., 2004), mientras que por otra parte, puede provocar un aumento o acelerar la biodegradación, producto de la bioestimulación a través de la incorporación de nutrientes y consorcio de microorganismos provenientes de la enmienda (Moorman *et al*., 2001; Dungan *et al*., 2003b; Getenga, 2003; Hang *et al*., 2003; Albarrán *et al*., 2004).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Suelo

Para la realización de las evaluaciones contempladas en este estudio se utilizó un suelo Andisol perteneciente a la serie Los Lagos, Mésica de los Typic Durudands (CIREN, 2003). El suelo se obtuvo de un predio agrícola ubicado en la localidad de Futrono (40° 03' 34''S; 72° 32' 46'' W), Región de los Ríos, Chile. Esta región se caracteriza por presentar un clima templado lluvioso con influencia mediterránea, su principal característica es que posee precipitaciones durante todo el año (2.000 mm) y temperaturas promedio anuales de 15°C. El suelo se muestreo de los primeros 0-20 cm de profundidad del perfil, desde un potrero colindante a uno con maíz. Este suelo, no presentaba aplicaciones previas de purines y de atrazina. En cuanto a fertilización inorgánica se estima que se realizó la aplicación de N, P y K en cantidades no definidas (Demanet *com pers*). Una vez obtenido el suelo, se transportó al laboratorio donde fue secado al aire, tamizado (< 0,02 mm) y almacenado hasta su utilización.

2.2. Purín de origen bovino utilizado como enmienda de suelo

La enmienda de suelo utilizada en el estudio correspondió a un purín de origen bovino obtenido de un pozo purinero ubicado en el fundo agrícola Santa Isabel. El purín fue almacenado en envases de plásticos y se transportó al laboratorio donde fue almacenado en congelador hasta su uso.

2.3. Atrazina y productos de degradación

El herbicida y los productos de degradación evaluados en el estudio fueron adquiridos de Chem Service. Estos correspondieron a los productos estándar de atrazina, HA, DEA y DIA cada uno con una pureza de 98%, 99,5%, 99,5% y 99,1%, respectivamente.

2.4. Aplicación del purín en el suelo

Como parte de la evaluación y con el objetivo de simular el tiempo que transcurre desde la última aplicación de purines en el campo y el inicio de la aplicación de herbicidas se consideró un periodo de pre-incubación de 30 días. Las dosis de purines utilizadas en el estudio fueron de 0 L ha^{-1}, 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1}, debido a que en este rango se encuentran las dosis aplicadas en el campo. En la Figura 3 se muestra un esquema resumen del diseño utilizado para la preparación de los tratamientos de suelo enmendado y para los estudios químicos y microbiológicos, los cuales son descritos a continuación.

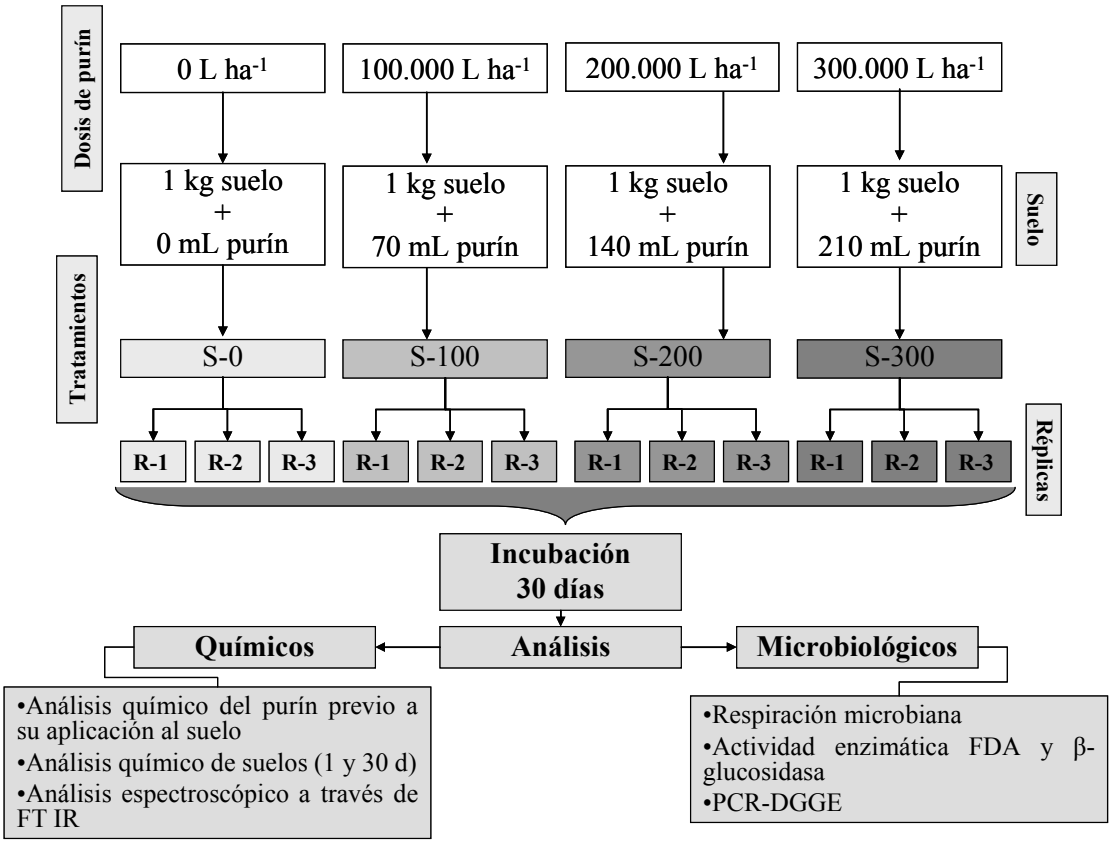

Figura 3. Diseño de la metodología de preparación de los tratamientos de suelo enmendado S-0, S-100, S-200 y S-300 y las evaluaciones químicas y microbiológicas contempladas para su caracterización.

Para la preparación de las mezcla suelo-purín, se pesó, en bolsas plásticas, 1 kg de suelo, posteriormente, y asumiendo una densidad promedio del suelo de 0,75 g cm^{-3} y que el

purín es incorporado en los primeros 20 cm de profundidad del perfil, se aplicó el purín en cantidades de 0 mL kg^{-1}, 70 mL kg^{-1}, 140 mL kg^{-1} y 210 mL kg^{-1}, lo que dio lugar a los tratamientos S-0, S-100, S-200 y S-300, respectivamente. Posterior a la aplicación del purín, se ajustó la humedad de los suelos al 70% de su capacidad de campo, luego las bolsas fueron agitadas para la homogenización de las mezclas, y puestas a incubar en una cámara bajo condiciones de oscuridad y temperatura controlada (20±1°C). Las bolsas con los respectivos tratamientos se mantuvieron abiertas y la humedad se controló periódicamente a través de la diferencia de peso, cada vez que fue necesario se agregó agua destilada para ajustar la humedad del suelo. El periodo de incubación de los suelos enmendados fue de 30 días. Todos los tratamientos se incubaron en triplicado.

2.5. Aplicación de atrazina en los suelos enmendados

Posterior a la pre-incubación por 30 días de S-0, S-100, S-200 y S-300 se iniciaron las evaluaciones con atrazina, la que fue utilizada en distintas concentraciones. En la Figura 4 se muestra un esquema que resume las distintas evaluaciones realizadas para los suelos enmendados pre-incubados por 30 días con aplicación de atrazina.

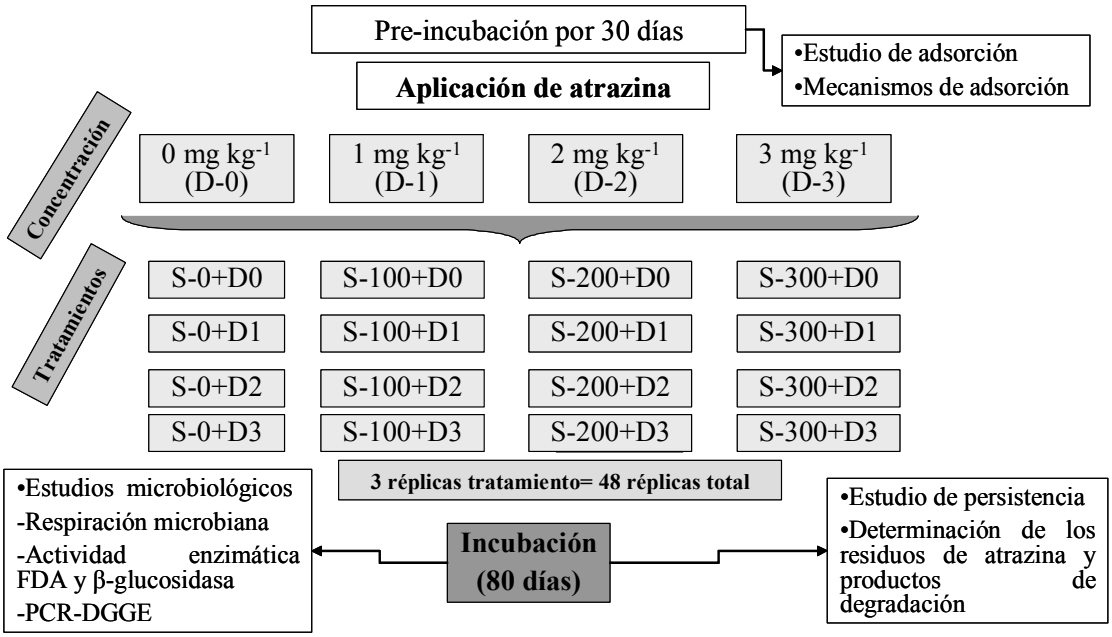

Figura 4. Diseño de la metodología de incubación y evaluaciones realizadas para S-0, S-100, S-200 y S-300 pre-incubados por 30 días y con aplicación de atrazina en concentraciones de 0 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1}, 2 mg kg^{-1} y 3 mg kg^{-1}.

Para el estudio de adsorción se trabajó con el rango de solubilidad en agua de atrazina (0-30 mg L^{-1}), mientras que para el estudio de incubación de aplicó en concentraciones de 0 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1}, 2 mg kg^{-1}y 3 mg kg^{-1} (D-0, D-1, D-2 y D-3), lo que representa las dosis sin atrazina, la dosis aplicada en el campo, el doble y la triple, respectivamente. Los detalles metodológicos de cada evaluación serán descritos con detalle posteriormente.

2.6. Análisis químico del purín, suelo y suelo enmendado

2.6.1. Análisis químico del purín

En la muestra líquida del purín se midió el pH y la conductividad eléctrica (CE) a temperatura ambiente. El análisis químico del purín se analizó de acuerdo a la metodología propuesta por Sadzawka *et al.* (2007). Para la determinación del contenido de materia seca se tomaron 100 mL de una submuestras de purín en triplicado y se secaron a 70°C hasta la obtención de peso constante. Posteriormente, las muestras secas y molidas se calcinaron por 4 h a 500°C en una mufla, se pesó las cenizas y se determinó por diferencia el contenido de MO. Las cenizas se disolvieron en HCl diluido (2 M) y luego se filtraron. En el filtrado se determinó la concentración de fósforo (P) a través del método de colorimetría con nitro-vanado-molibdato. La concentración de N total se determinó a través de la concentración de N-NH_4 por destilación de NH_3 y titulación manual. La relación C/N consideró los resultados obtenidos de la estimación del contenido de C total y el contenido de N total. El contenido de CO disuelto total del purín se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Li *et al*. (2005). Para ello, 40 mL de purín se agitaron por 1 h y luego se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min. El sobrenadante se filtró utilizando una membrana (Millipore) de 0,45 µm. Las soluciones filtradas se almacenaron a 4°C hasta ser liofilizadas. Una vez obtenido el extracto seco se pesó y se realizó el análisis del contenido de C utilizando un analizador elemental (EURO EA 3000) Se realizaron dos réplicas por tratamiento, los valores del análisis fueron obtenidos con el programa Callidius interface Versión 4.1.

2.6.2. Análisis químico del suelo y suelo enmendado

El análisis químico del suelo y de los suelos con aplicación de distintas dosis de purines se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Sadzawka *et al*. (2006). El pH se

determinó en una suspensión de suelo con cloruro de calcio (0,01 M), en una relación suelo: solución de 1:2,5. La CE se determinó en el extracto obtenido luego de preparar una pasta de suelo con agua y filtrar al vacío. El contenido de MO se determinó por combustión húmeda con una mezcla de dicromato de sodio (0,5 M) y ácido sulfúrico (96%), luego se midió por colorimetría el cromato reducido. El contenido de N se determinó por el método Kjeldahl de digestión-destilación. La suma de bases se calculó a partir de de la extracción de los cationes intercambiables (Ca, Mg, Na, K) con acetato de amonio (1 M) a pH 7,0. EL CO disuelto, de los suelos se extrajo con agua destilada utilizando una relación 1:10 (p/v) en base a peso húmedo. En envases plásticos se pesó 25 g de una muestra de suelo o de suelo enmendado y se agregó 250 mL de agua destilada. Luego, las muestras fueron agitadas a 180 rpm por 24 h a 20°C. Posteriormente, se realizó la centrifugación de las muestras a 10.000 rpm por 30 min, se filtró a través de membrana de 0,45µm y se liofilizaron hasta sequedad. Las muestras fueron pesadas y posteriormente se realizó la determinación del contenido de C como se describió anteriormente.

2.6.3. Análisis a través de espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT IR)

El purín, el filtrado acuoso del purín, S-0, S-100, S-200 y S-300 se analizaron a través de espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT IR). Se tomaron muestras de cada uno de ellos y se liofilizaron para eliminar el contenido de agua. Previo a su análisis las muestras liofilizadas se mantuvieron en disecador a temperatura ambiente. Para el análisis se pesó 1,0 mg de la muestra y se mezcló en un mortero de agata con 250,0 mg de KBr (grado espectrofotométrico), de esta mezcla se tomaron 25,0 mg para realizar el análisis. Las muestras fueron analizadas en un rango de 4.000 a 400 cm^{-1} en un espectrofotómetro infrarrojo Bruker Tensor 27 equipado con el programa OPUS.

2.7. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos considerados en el estudio se realizaron en el suelo y en suelos enmendados durante los 30 días del periodo de pre-incubación y durante 80 días de incubación, posterior a la aplicación de atrazina.

2.7.1. Respiración microbiana

La respiración microbiana de los suelos y suelos enmendados se evaluó a través de la evolución de CO_2 de acuerdo al método de Alef (1995). Se tomó una muestra de 100 g de cada tratamiento las que fueron puestas en envases de vidrio de 1 L. En el interior de cada envase se colocó un vial con 10 mL de NaOH 0,5 M para atrapar el CO_2 liberado y otro vial con 5 mL de agua para mantener la humedad del sistema, luego los envases fueron cuidadosamente cerrados. Para cada tiempo de evaluación, al envase con NaOH se agregó 1 mL de una solución de $BaCl_2$ 1,5 M para precipitar los carbonatos y 3 gotas de fenolftaleína como indicador ácido-base. Luego, el exceso de álcalis fue titulado con HCl 0,5 M. Los envases con contenido de NaOH fueron reemplazados en cada medición. Este estudio se realizó en triplicado y los datos se expresaron como µg C-CO_2 g^{-1} de suelo. Para obtener los valores de C-CO_2 se aplicó la siguiente ecuación:

$$\textbf{Respiración (µg C-CO}_2\textbf{ g}^{-1}\textbf{ suelo)} = ((B-S) \times M \times E \times 1000) / PS$$

Donde:

B = cantidad de ácido necesario para titular el NaOH remanente en el blanco (mL).

S = cantidad de ácido necesario para titular el NaOH remanente en las muestras que contienen suelo o suelo enmendado (mL).

M = Molaridad del HCl

E = 6 (peso equivalente para expresar los datos como C).

1000 = factor (g)

p.s = peso seco de 1 g de suelo

2.7.2. Actividad enzimática

La actividad fluoresceina diacetato (FDA) se determinó de acuerdo al método descrito por Adam & Duncan (2001). Para la evaluación, en un envase de 50 mL se pesó 1 g de muestra, luego se agregó 7,5 mL de buffer fosfato salino, pH 7,2. La reacción se inició con la adición de 0,1 mL de una solución de fluoresceína diacetato (1 mg mL^{-1}). Después de 20 min de incubación a 30°C y agitación a 100 rpm se agregaron 7,5 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para detener la reacción. Posteriormente, se tomaron submuestras y se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min. La absorbancia del líquido sobrenadante se midió en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2) a una longitud de

onda de 490 nm. En cada medición se consideró un control y un blanco correspondientes al suelo sin reactivo y los reactivos sin suelo, respectivamente. La evaluación se realizó en triplicado. La concentración de fluoresceína liberada se calculó a través de una curva de calibración preparada con el estándar de fluoresceína en el rango de 1- 5 µg mL^{-1}.

La actividad β-glucosidasa se evaluó de acuerdo al método descrito por Gianfreda *et al*. (2005). En envases de 15 mL se pesó 1 g de cada muestra se mezcló con 5 mL de la solución sustrato (0,025 M p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido en 0,1 M de Buffer Universal Modificado pH 6,0). Las muestras se incubaron por 1 hora a 30°C con agitación a 100 rpm. Para detener la reacción, a cada muestra se agregó 4 mL de NaOH 0,5 M y 1 mL $CaCl_2$ 0,5 M, luego fueron puestas por 10 min en un congelador a -20°C. Posteriormente, se tomó una submuestra y se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min. La concentración de p-nitrofenol fue determinada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm. Para cada tratamiento se consideró un control y un blanco, correspondientes al suelo sin reactivo y al reactivo sin suelo, respectivamente. La evaluación se realizó en triplicado.

Los cálculos para obtener los niveles de actividad FDA y β-glucosidasa se realizaron utilizando la fórmula:

$$\textbf{µg de la enzima } g^{-1}\ h^{-1} = \frac{E \times V \times Fd}{£ \times p.s \times t}$$

Donde:

E = Absorbancia de la muestra – (absorbancia del control-absorbancia del blanco)

V = Volumen

Fd = Factor de dilución

£ = Pendiente de la curva de calibración

p.s = Peso seco de la muestra

t = Tiempo de incubación (horas)

2.7.3. Análisis Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis en Gel con Gradiente de Denaturalización (DGGE)

2.7.3.1. Extracción de ADN y amplificación por PCR

Los cambios de la comunidad microbiana de bacterias fueron estudiada a través de la amplificación del gen 16S ADNr a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (PCR-DGGE). La comunidad de los distintos tratamientos de suelo se extrajo de 0,25 g de una muestra de suelo, con el kit de aislamiento Ultraclean Soil DNA (Mo Bio, FastDNA SPIN Kit for soil, Bio 101 Inc., USA) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La obtención y calidad del ADN extraído se evaluó en un gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 $\mu g\ mL^{-1}$).

La amplificación del ADN se realizó utilizando los cebadores GC-clamp-EUB f933 (5´-GC-clamp-GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G-3´) y EUB r1387 (5´-GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG-3´), los cuales son específicos para secuencias del gen 16S ADNr de bacterias (Kawai *et al*., 2002). Las amplificaciones del PCR se realizaron a través del uso de polimerasa GoTaq ® (Promega, Inc.). Las mezclas del PCR contenían 0,25 µL de GoTaq, 20 pmol de cada cebador, 6 µL de de una solución de $MgCl_2$ 25 mM, 5 µL de deoxiribunucleosido trifosfato 2 mM, 10 µL de buffer PCR 5X, 1 µL del extracto de ADN y agua destilada esterilizada con lo que se llegó a un volumen final de 50 µL. El PCR Touchdown se realizó a 95°C por 10 min, luego el reconocimiento se inicio a una temperatura de 66°C y fue disminuyendo por 0.5°C cada ciclo hasta llegar a 56°C, luego se realizaron veinte ciclos adicionales a 56°C. La desnaturalización se llevo a cabo a 94°C por 1 min. El reconocimiento de los cebadores se realizó por 1 min tal como se describió anteriormente, mientras que la extensión se realizó por 3 min a 72°C. La extensión final se realizó por 7 min a 72°C. El producto del PCR se revisó y visualizó en un gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 $\mu g\ mL^{-1}$) a través de un transiluminador UV.

2.7.3.2. Análisis DGGE

El análisis DGGE se realizó en un equipo DCode Universal Mutation Systems (Bio-Rad, Hercules, CA). El producto del PCR (20 µL) fue cargado en un gel de poliacrilamida 6,5%

(p/v) en Buffer 1X (Tris 40 mM, acido acético 20 mM, y EDTA 1 mM a pH 8,0). El gel poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 37,5:1) se preparó con un gradiente desnaturante de 45 a 65% para los fragmentos 16 S ADNr. El desnaturante (100%) contenía urea 7 M y formamida al 40%. La electroforesis se realizó a 55°C por 10 min a 20 V, y luego por 10 horas a 100V. Posterior a la realización de la electroforesis, los geles fueron teñidos por 30 min con SYBR Gold (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Finalmente, las imágenes de los geles DGGE fueron obtenidas bajo irradiación UV a través de un transiluminador, las imágenes digitales (5M pixeles) fueron tomadas con una cámara digital Kodak y procesadas en el software Photoshop (Adobe Systems).

2.7.3.3. Secuenciación de los fragmentos DGGE

Para identificar las especies de bacterias dominantes, las bandas que presentaron mayor intensidad fueron cortadas del gel poliacrilamida, enjuagadas con agua destilada, trituradas, puestas en 50 µL de buffer TE pH 8,0 y almacenadas a 4°C. Posteriormente, se tomó 30 µL del extracto y se agregó 0,6 µL de NaCl 0,5 M y 75 µL de etanol al 100%, y se incubó por la noche a -80°C. Una vez realizada la incubación, se centrifugó a 10.000 rpm por 45 min, el sobrenadante fue eliminado y el ADN se secó al vació, luego fue eluido con 10 mL de buffer TE a pH 8,0. La nueva solución de ADN se utilizó para realizar un nuevo PCR con los cebadores y condiciones descritas anteriormente. Después de realizado el PCR, se visualizó el producto en un gel agarosa al 2% y se confirmó a través de DGGE, teniendo cuidado que las bandas se encontraban y en igual posición respecto al gel original. El producto del PCR fue enviado a Macrogen Inc (Seoul, Korea) para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias estas fueron comparadas con la base de dato pública GenBank mediante el software Megablast con la finalidad de determinar su afiliación filogenética. Las secuencias también fueron depositadas en la misma base de datos.

2.8. Estudio de adsorción y mecanismos de adsorción de Atrazina

El estudio de adsorción de atrazina se realizó para el suelo (S-0) y suelos enmendados (S-100, S-200 y S-300) pre-incubados por 30 días luego de la aplicación del purín.

2.8.1. Estudio de adsorción

Se evaluó el tiempo necesario para la obtención del equilibrio entre atrazina y el suelo a través de un estudio en batch. Para su realización, se pesaron 5 g de muestra de S-0, S-100, S-200 y S-300 y fueron puestos en tubos de centrífuga de 50 mL, luego se agregó 10 mL de una solución de atrazina en $CaCl_2$ 0.01 M con una concentración inicial (C_i) de 1,5 mg L^{-1}. Luego las suspensiones fueron agitadas a 180 rpm y 20°C +/- 1ºC. Los tubos fueron retirados después de 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de aplicada la solución. En cada tiempo, las suspensiones fueron centrifugadas por 20 min, filtradas a través de membranas (Millipore) de 0,45 µm y analizadas para la determinación de la concentración de equilibrio (C_e) mediante HPLC (Merck Hitachi 3400).

Para los experimentos de adsorción se prepararon soluciones de atrazina en $CaCl_2$ 0,01 M con una C_i de 0,48; 1,20; 5,40; 10,80; 20,40 y 30,00 mg L^{-1}. Se pesaron en tubos de centrifuga de 50 mL muestras de 5 g de cada tratamiento de suelo y se agregó 10 mL de la solución de atrazina. Luego, las muestras fueron agitadas por 24 h a 180 rpm y 20°C ± 1°C. Las suspensiones fueron centrifugadas por 20 min a 3.000 rpm y filtradas. La concentración de equilibrio de atrazina se determinó por medio de HPLC a una longitud de onda de 220 nm. Se utilizó una columna Symmetry C18, 4,6x 250mm. La fase móvil fue 60% de acetato de amonio (1mM) y 40% de acetonitrilo a un flujo de 1 mL min^{-1}. El volumen inyectado fue de 20 µL. La diferencia entre C_i y C_e se consideró como la adsorción de atrazina en el suelo. Las isotermas de adsorción fueron explicadas de acuerdo a la expresión logarítmica de la ecuación de Freundlich: $\log C_s = \log K_f + N_f \log C_e$, donde C_s (mg L^{-1}) es la cantidad de producto adsorbido a la concentración de equilibrio (mg L^{-1}), mientras que K_f y N_f corresponden a la constante empírica de Freundlich. El K_f normalizado según el contenido de CO del suelo ($K_{f\text{-}OC}$) se calculó de la relación K_f*100/OC%. El estudio se realizó en triplicado. Posterior al estudio de adsorción se realizó inmediatamente el experimento de desorción de atrazina. Para ello, luego de tomado el sobrenadante de los tubos utilizados en el experimento de adsorción, se agregó un volumen de la misma cantidad de $CaCl_2$ 0,01 M y se agitó para logra la desorción del producto. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de desorción. Este procedimiento fue repetido 3 veces.

2.8.2. Análisis FT IR del mecanismo de adsorción de atrazina

El análisis FT IR del suelo S-0 y S-300 con atrazina se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Senesi *et al*. (2001). Para la evaluación, se pesaron en tubos de centrifuga 250,0 mg de una muestra de suelo obtenida de S-0 y S-300, luego se agregó 45 mL de una solución de atrazina con una concentración de 30 mg L^{-1}. Se trabajó con la máxima solubilidad de atrazina de tal forma de saturar el suelo con el producto. La mezcla de suelo-atrazina se agitó por 24 h bajo condiciones de oscuridad a 20°C, luego se centrifugó a 3.000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante. El material sólido centrifugado fue otra vez tratado con 20 mL de la solución de atrazina, se agitó por 24 horas, se centrifugó y el sobrenadante fue eliminado. Luego el producto se enjuagó con 20 mL de agua destilada, se centrifugó y liofilizó para la realización del análisis.

2.9. Determinación de atrazina residual y formación de sus productos de degradación

El estudio de persistencia de atrazina se realizó para los tratamientos de suelos enmendados (S-0, S-100, S-200 y S-300) pre-incubados por 30 días luego de la aplicación del purín.

2.9.1. Aplicación de atrazina

Atrazina se aplicó en distintas dosis de trabajo en los tratamientos de suelo S-0, S-100, S-200 y S-300. Las concentraciones de atrazina utilizadas fueron de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1) y 2 mg kg^{-1} (D-2), lo que corresponde a la dosis sin atrazina, la dosis de campo y el doble de ésta. En bolsas de polipropileno se pesaron 500 g de suelo de cada tratamiento y se aplicó atrazina, luego los suelos fueron agitados con la finalidad de obtener una distribución uniforme del producto. Posteriormente, se realizó la incubación de los distintos tratamientos de suelo enmendado con aplicación de atrazina. Las condiciones de incubación consistieron en colocar las bolsas abiertas en una cámara bajo condiciones de oscuridad y temperatura controlada (20°C±1°C), la humedad se controló periódicamente a través de la pérdida de peso, cada vez que fue necesario se adicionó agua destilada para recuperar su humedad inicial. Los muestreos se realizaron durante los días 1, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 posteriores a la aplicación de atrazina. Las muestras una vez tomadas fueron congeladas a -20°C hasta su extracción. El estudio se realizó en triplicado.

2.9.2. Extracción y análisis de atrazina y de sus productos de degradación

La extracción de los residuos de atrazina y de los productos de degradación HA, DEA y DIA se realizó luego de pesar 10 g de una muestra de suelo obtenida de cada tratamiento de suelo y suelo enmendado. Las muestras de suelo una vez pesada se pusieron en tubos de centrifuga de 50 mL, luego se agregó 15 mL de metanol y la mezcla se agitó a 200 rpm por una hora en condición de oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas por 30 min y centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min. Una vez tomado el sobrenadante desde las muestras, el procedimiento fue repetido. Una vez recogidos ambos sobrenadantes se centrifugó por 10 min a 5.000 rpm y se filtró a través de membrana (Millipore) de 0,45 µm. Los extractos filtrados fueron evaporados hasta sequedad con rotavapor a 50°C y 120 revoluciones. Luego los residuos fueron resuspendidos en 2 mL de metanol. La purificación de las muestras se realizó en columnas de vidrio con contenido de florisil (2 g) activado a 300°C por 12 horas. Las columnas se acondicionaron con 5 ml de metanol antes de pasar la muestra. El porcentaje de recuperación para atrazina y productos de degradación fue de un 80% luego de realizado el procedimiento de extracción. Los extractos purificados se llevaron a sequedad y fueron resuspendidos en 500 µL de metanol. La muestra se almacenó a -20°C hasta su análisis. Atrazina y los productos de degradación se cuantificaron a través de HPLC con una columna Symetry ® C 18, 4,6 x 250 mm. La fase móvil fue metanol/ acetato de amonio 50 mM a pH 7,4. La condición cromatográfica comenzó 60/40 agua/metanol (v/v) por 15 minutos, luego 80/20 agua/metanol (v/v) por 10 minutos y finalmente 60/40 agua/metanol (v/v) por 5 minutos. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL min^{-1} y la muestra inyectada fue de 20 µL. Los tiempos de retención fueron de 5, 9, 11 y 22 minutos para DIA, DEA, HA y atrazina respectivamente (Figura 5). El límite de detección para atrazina fue de 1 µg L^{-1} y para los productos de degradación HA, DEA y DIA fue de 10 µg L^{-1}. Las soluciones de trabajo para realizar las curvas de calibración de atrazina y los productos de degradación se prepararon a partir de las soluciones stock por dilución con metanol calidad HPLC. A partir de las soluciones de trabajo, se prepararon soluciones de cada uno de los compuestos, a una concentración de 5 mg L^{-1}. Igualmente, se preparó una solución de la mezcla de los compuestos a una concentración de 1 mg L^{-1}. De estas soluciones se tomaron 20 µL para inyectarlas en el sistema cromatográfico.

Del estudio de incubación y una vez conocidas las concentraciones de los residuos de atrazina, los datos obtenidos se ajustaron matemáticamente con la ecuación de primer orden propuesto por Walker (1987)

$$C_t = C_0 \, e - k_t$$

Donde:

C_t (mg kg^{-1}) = Concentración de atrazina al tiempo t

C_0 (mg/kg) = Concentración inicial de atrazina

K (d^{-1}) = Constante de velocidad específica, y

t (d^{-1}) = Tiempo al cual se mide C

El tiempo necesario para que la concentración de atrazina alcance el valor igual a la mitad de la concentración inicial, C_0, se denomina tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y se calculó a partir de la forma linealizada de la ecuación ln Ct= ln C0 – kt.

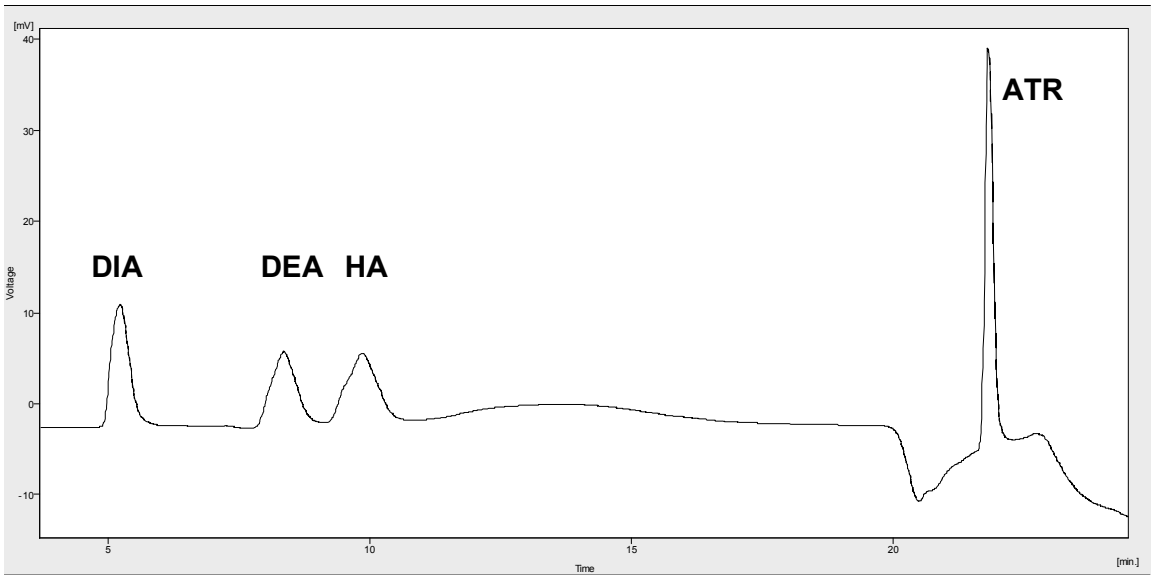

Figura 5. Espectro cromatográfico de atrazina (ATR) y de los productos de degradación deisopropilatrazina (DIA) deetilatrazina (DEA) e hidroxiatrazina (HA). Detección realizada a través de HPLC.

2.10. Análisis de datos

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 10.0. Se determinaron los valores medios y el error típico de la media o desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. La separación de grupos se determinó a través de la prueba Tukey ($P<0,05$). Las gráficas se realizaron con el programa Origin versiónPro 8.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización química del purín, suelo y suelo enmendado

Los resultados obtenidos para la caracterización química del purín se muestran en la Tabla 3. El purín de origen bovino, utilizado como enmienda de suelo, se caracterizó por presentar un contenido de materia seca (30,2 g L^{-1}) típico para un purín colectado en primavera (Demanet *et al*., 1999).

Tabla 3. Características químicas del purín

	Purín
Materia seca (g L^{-1})	30,2±4,4
Conductividad eléctrica (dSm^{-1})†	10,7±0,1
Materia orgánica (g kg^{-1})	0,74±0,01
Carbono disuelto total (mg L^{-1}) †	2.140±53
pH†	7,2±0,1
N total (g kg^{-1})	30,3±4,8
C/N	14
P (g kg^{-1})	8,0±0,1

Valores en base a peso seco (Purín secado a 70°C); †Valores en base a purín original en estado líquido; Se presentan los valores medios y desviación estándar de la media (n=3), carbono disuelto total (n=2).

En la Tabla 4 se presentan las características químicas del suelo (S-0) y de los suelos enmendados (S-100, S-200 y S-300) para los días 1 y 30 posterior a la aplicación del purín. El suelo utilizado en este estudio se caracterizó por presentar un pH ácido (4,7) y un alto contenido de MO (186,0 g kg^{-1}), típico para suelos andisoles.

La aplicación de dosis crecientes de purín modificó las características químicas del suelo. Luego de 1 día de la aplicación de la enmienda, en relación a las características presentadas en S-0, se observó un aumentó del pH de 4,7 (S-0) a 5,1 en el suelo que recibió la mayor dosis de aplicación de purines (S-300), mientras que la CE, aumentó aproximadamente 7, 11 y 14 veces en S-100, S-200 y S-300, respectivamente. El

contenido de MO del suelo no fue afectado por la aplicación del purín, no así, el contenido de CO disuelto, el cual presentó un contenido 10, 14 y 21 veces superior en S-100, S-200 y S-300, respectivamente. Los contenidos de N y P también fueron modificados, el contenido de N fue superior al de S-0 aproximadamente 1,7 veces en S-100, 3,2 veces en S-200 y 4,4 veces en S-300, mientras que el contenido de P incrementó entre 0,39 y 0,48 veces al aplicar el purín. La relación C/N de 13 obtenida para S-0, disminuyó a 10 al aplicar la dosis más alta de purín (S-300). Finalmente, la sumatoria de bases, incrementó de forma considerable en S-100, S-200 y S-300, los cuales presentaron valores superiores al de S-0, de 0,47, 0,59 y 0,91 veces, respectivamente. Luego de 30 días de incubación de los distintos tratamientos de suelos, los suelos enmendados presentaron una recuperación de los niveles de pH, relación C/N, N y P, presentando valores cercanos a los observados en el suelo control (S-0). La CE no presentó modificaciones luego de 30 días, mientras que el contenido de CO disuelto, si bien disminuyó considerablemente durante el periodo de incubación, presentó en S-300 una cantidad 2 veces superior, la misma tendencia se observó con la sumatoria de bases, la cual fue 0,31 y 0,54 veces superior en S-200 y S-300, respectivamente, comparado al suelo sin aplicación de purines.

Tabla 4. Características químicas del suelo (S-0) y del suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (S-100, S-200 y S-300, respectivamente) para los días 1 y 30 posterior a la aplicación de la enmienda.

	S-0	**S-100**	**S-200**	**S-300**	**S-100**	**S-200**	**S-300**
			Día 1			**Día 30**	
pH $CaCl_2$	4,7 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1
CE-1:5 (dS/m^{-1})	0,03 ±0,01	0,25 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,45 ± 0,01
MO (g kg^{-1})	186,0 ± 23,0	185,0 ± 7,1	175,0 ± 7,1	175,0 ± 7,1	182,5 ± 9,6	183,0 ± 10,4	175,0 ± 10,0
CO disuelto (mg kg^{-1})	23,0 ± 2	260 ± 25	360 ± 25	507 ± 50	31 ± 3	40 ± 4	71 ± 5
N disponible(mg kg^{-1})	33,0±5,0	90,0 ±10,0	140,0 ± 6,0	178,0 ± 20,3	33,0 ± 5,0	38,0 ± 4,0	35,0 ± 5,0
C/N	13	11	11	10	12	12	12
P (mg kg^{-1})	5,4 ± 0,2	7,5 ± 3,5	7,5 ± 3,5	8,0 ± 4,2	5,2 ± 0,5	5,2 ± 1,2	6,0 ± 0,8
∑ bases (mg kg^{-1})	1.035,6 ± 25,4	1.520,0 ± 28,9	1.650,8 ± 34,2	1.976,6 ± 37,6	1.103,6 ± 28,8	1.362,5 ± 22,9	1.602,6 ± 27,3

Se presentan los valores medios (n=3) y la desviación estándar de la media.

3.2. Análisis FT IR del purín, suelo y suelo enmendado

Los resultados obtenidos del análisis espectroscópico realizado a través de FT IR para el purín secado a 70°C y para el filtrado acuoso se muestran en la Figura 6. Las asignaciones de los grupos funcionales para las señales observadas se basaron en los trabajos realizados por Plaza *et al*. (2003); Kaiser & Ellerbrock (2005); Calderón *et al*. (2006); y Brunetti *et al*. (2007).

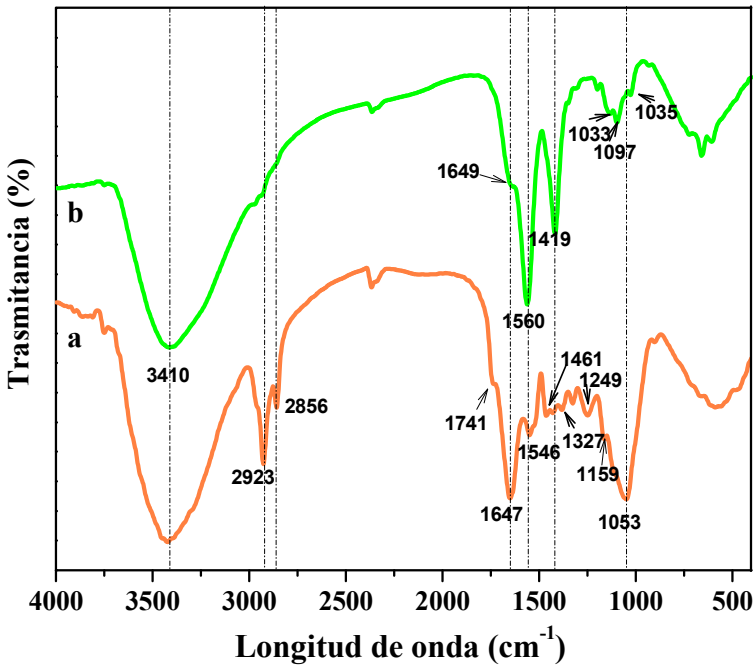

Figura 6. Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT IR) del purín de origen bovino secado a 70°C (a) y del filtrado acuoso del purín (b).

A través del análisis se observó que el purín presenta grupos funcionales tales como aminas y OH (3.410 cm^{-1}), grupos alifáticos C-H los que se atribuyen a las dos bandas intensas que se presentaron cercanas a los 2.923 cm^{-1} y 2.856 cm^{-1}, vibraciones de grupos en los que se encuentran C=C aromáticos y C=O de grupos amidas presentes en proteínas atribuido a la señal observada cercana a los 1.647 cm^{-1}. Además, el purín se caracterizó por presentar grupos COOH y C=O atribuidos a ésteres de carbohidratos (1.741 cm^{-1}), deformaciones NH y C=N (1.546 cm^{-1} y 1.327 cm^{-1}) y C-H alifáticos (1.461 cm^{-1} y 1.159

cm^{-1}). El espectro FT IR de la fracción acuosa del purín se caracterizó, en comparación al purín seco, por presentar una menor intensidad de las bandas atribuidas a C-H alifáticos (2.928- 2956) y a la señal atribuida a vibraciones de grupos en los que se encuentran C=C aromáticos y C=O de grupos amidas presentes en proteínas (1.647). Sin embargo, se observó una gran banda (1.560 cm^{-1}) que caracteriza la presencia de grupos funcionales con contenido N, deformaciones NH y alargamientos C=N, una banda intensa cercana a los 1.419 cm^{-1} generalmente asignada a deformaciones alifáticas C-H y finalmente una pequeña señal cercana a los 1.097 cm^{-1} atribuida a C-C, C-OH, C-O-C típicos de celulosa.

A los distintos tratamientos de suelo incubados por un periodo de 30 días se les realizó el análisis espectroscópico. Los espectros obtenidos para S-0, S-100, S-200 y S-300 se muestran en la Figura 7.

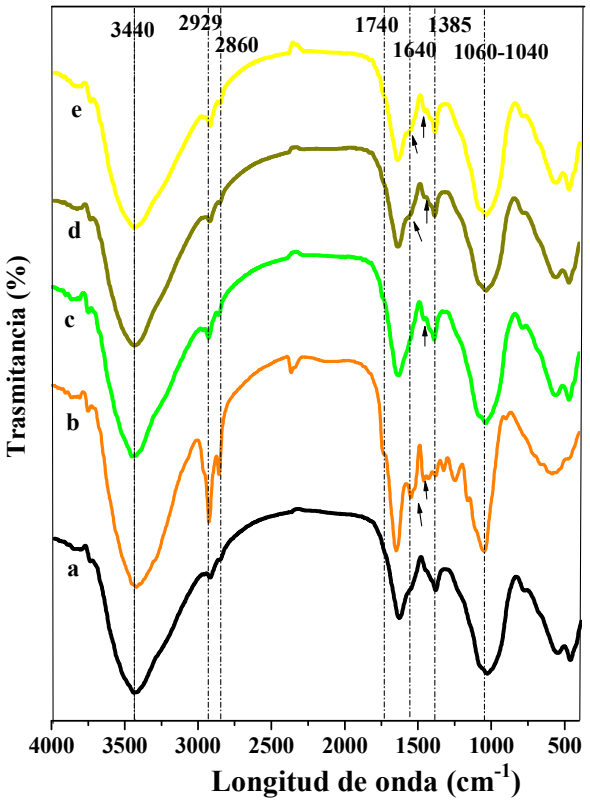

Figura 7. Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT IR) para el suelo sin enmendar (S-0) (a), purín (b), suelo enmendado con una dosis de aplicación de purines de 100.000 L ha^{-1} (S-100) (c), 200.000 L ha^{-1} (S-200) (d) y 300.000 L ha^{-1} (e). Las fechas indican bandas presentes en el suelo debido a la aplicación del purín.

Se observó que todos los tratamientos de suelo enmendados presentaron similares características. Los resultados obtenidos mostraron, que la aplicación del purín contribuyó a aumentar, en relación a S-0, la intensidad de las bandas atribuidas a grupos alifáticos C-H (2.929 cm^{-1} y 2860 cm^{-1}), principalmente al aplicar la dosis más alta de purín (S-300). Por su parte, para todos los suelos enmendados se observó la aparición de bandas atribuidas a grupos con contenido de N, tales como deformaciones NH y C=N (1.550 cm^{-1}) y deformaciones de grupos alifáticos C-H (1.450 cm^{-1}).

3.3. Caracterización biológica del suelo y suelo enmendado

3.3.1. Actividad respiratoria

Los resultados obtenidos de la evolución de C-CO_2 presentada por S-0, S-100, S-200 y S-300 durante el periodo de 30 días posteriores a la aplicación del purín se muestran en la Figura 8.

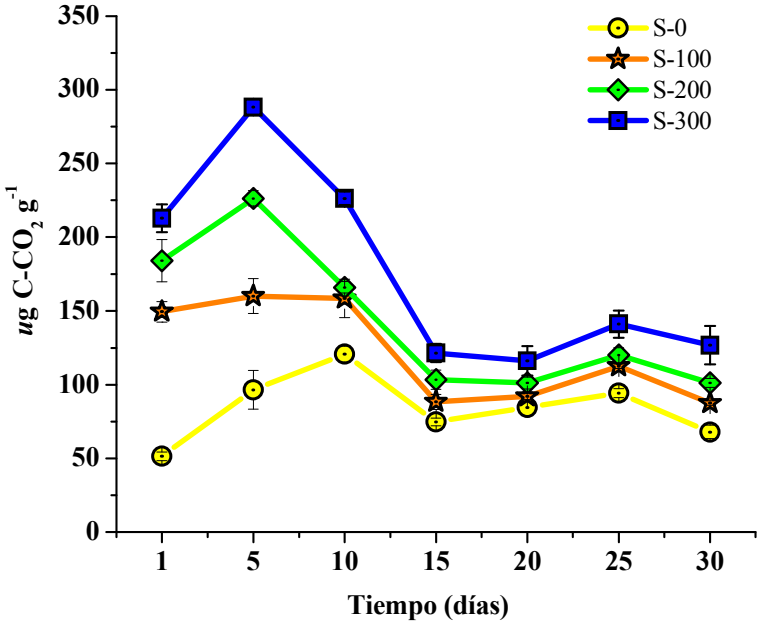

Figura 8. Respiración microbiana del suelo (S-0) y de los suelos enmendados con una dosis de purín de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y las barras de error estándar de la media.

Los resultados mostraron que la aplicación de dosis crecientes de purín aumentó significativamente ($P<0.05$) la respiración microbiana del suelo. Los mayores niveles de respiración se presentaron durante los primeros 5 días luego de ser aplicada la enmienda, para este tiempo de evaluación, se observó que S-100, S-200 y S-300 presentaron un nivel de $C\text{-}CO_2$ 1,6, 2,3 y 2,9, respectivamente, superior a la de S-0. Luego de 10 días, la respiración microbiana comenzó a disminuir, hasta observar en el día 15 una evolución de la respiración con una tendencia a presentar niveles cercanos a la de S-0. Finalmente, para el día 30 de incubación, los niveles de $C\text{-}CO_2$ fueron de 68 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1}, 88 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1}, 101 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1} y 126 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1} para S-0, S-100, S-200 y S-300, respectivamente, por lo que aún fue posible evidenciar la influencia de la aplicación de dosis crecientes de purín ($P< 0.05$) sobre la mayor actividad respiratoria del suelo enmendado.

3.3.2. Actividad enzimática

El estudio de respiración se complementó con evaluaciones de la actividad enzimática FDA y β-glucosidasa. La actividad FDA es utilizada para estimar la actividad microbiana, ya que da cuenta de un índice global de la capacidad hidrolítica del suelo (D'Ascoli *et al*., 2006). Los resultados obtenidos para la actividad FDA evaluada durante los días 1, 5, 10, 15, 20 y 30 posterior a la aplicación del purín se muestran en la Figura 9. La aplicación del purín aumentó significativamente ($P<0.05$) luego de 10 días la actividad FDA en todos los tratamientos de suelo enmendados (S-100, S-200 y S-300). En el día 5 y 10 posterior a la aplicación del purín, S-300 presentó los mayores niveles de actividad con valores superiores a 700 µg fluoresceína g^{-1} h^{-1}. Luego de 15 días los suelos enmendados comenzaron a disminuir en actividad hasta alcanzar niveles similares al de S-0.

La actividad β-glucosidasa fue seleccionada en este estudio por que actúa en reacciones de catálisis involucradas en la transformación biogeoquímica de C y por lo tanto es considerada una herramienta esencial para la evaluación de la actividad microbiana del suelo y mineralización de sustratos (Taylor *et al*., 2002). Los resultados obtenidos para la actividad β-glucosidasa evaluada durante los días 1, 5, 10, 20 y 30, posterior a la aplicación del purín en el suelo se muestran en la Figura 10. Como se observó la actividad β-glucosidasa no fue afectada por la aplicación del purín, no encontrándose diferencias significativas entre los suelos. Los valores de actividad en los distintos tratamientos de suelo se encontraron entre 2,0 y 3,2 µmol pNP g^{-1} h^{-1}.

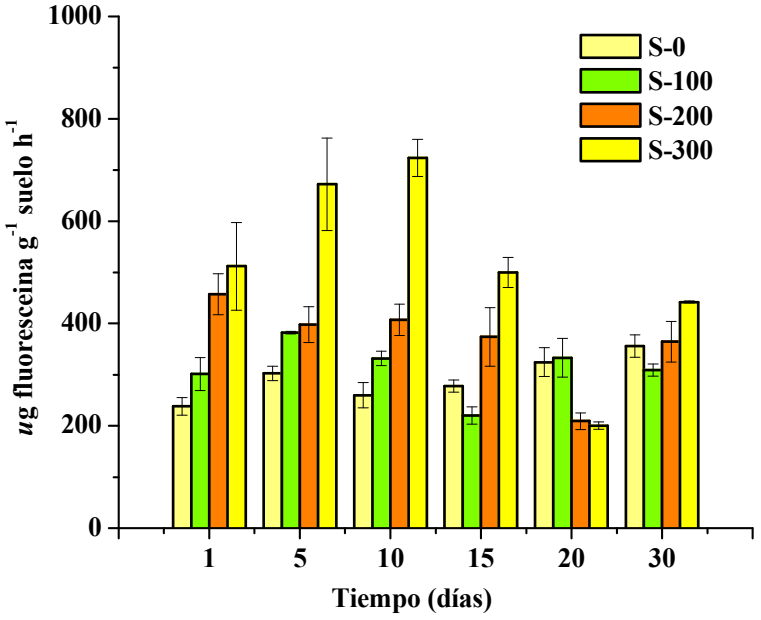

Figura 9. Actividad FDA para el suelo (S-0) y suelos enmendados con una dosis de purín de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y el error estándar de la media.

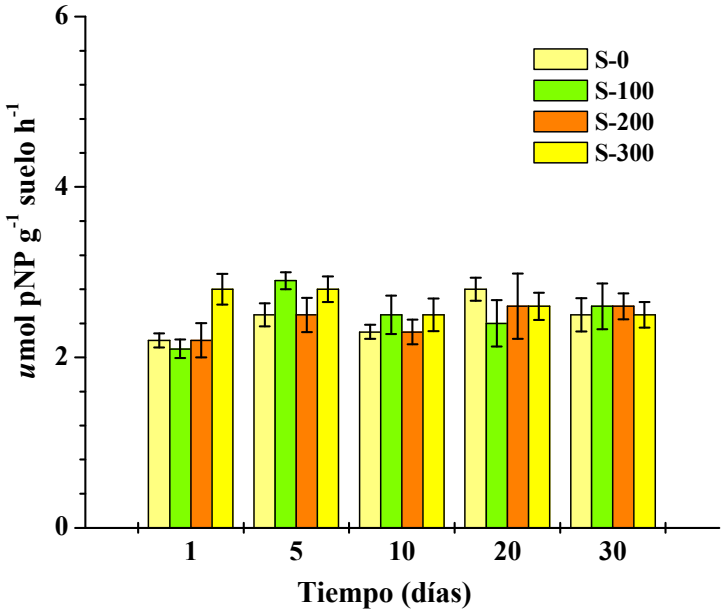

Figura 10. Actividad β-glucosidasa para el suelo (S-0) y suelos enmendados con una dosis de purín de 100.00 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y las barras del error estándar de la media.

3.3.3. Cambios en la comunidad microbiana

Se utilizó la técnica de PCR-DGGE para evaluar el efecto de la aplicación de purines sobre la comunidad microbiana del suelo. Los resultados obtenidos para el análisis realizado durante los días 1, 15 y 30 en S-0, S-100, S-200 y S-300 se muestran en la Figura 11. Se observó, que la aplicación de purines no modificó la estructura de la comunidad de bacterias del suelo, pero sí estimuló a un grupo de bacterias, lo que se evidenció por la aparición de una banda (Banda 1) luego de 15 días en los suelos que recibieron las mayores dosis de purín (S-200 y S-300). Luego de 30 días, la banda permaneció, presentando una mayor intensidad en S-300. Al realizar la comparación de las secuencia 16S ADNr de las bacterias aisladas (Figura 11 Banda 1) con secuencias disponibles en la base de datos GenkBank se identificó que las bacterias que fueron incorporadas o estimuladas a través de la enmienda pertenecen al Phylum Bacteroidete.

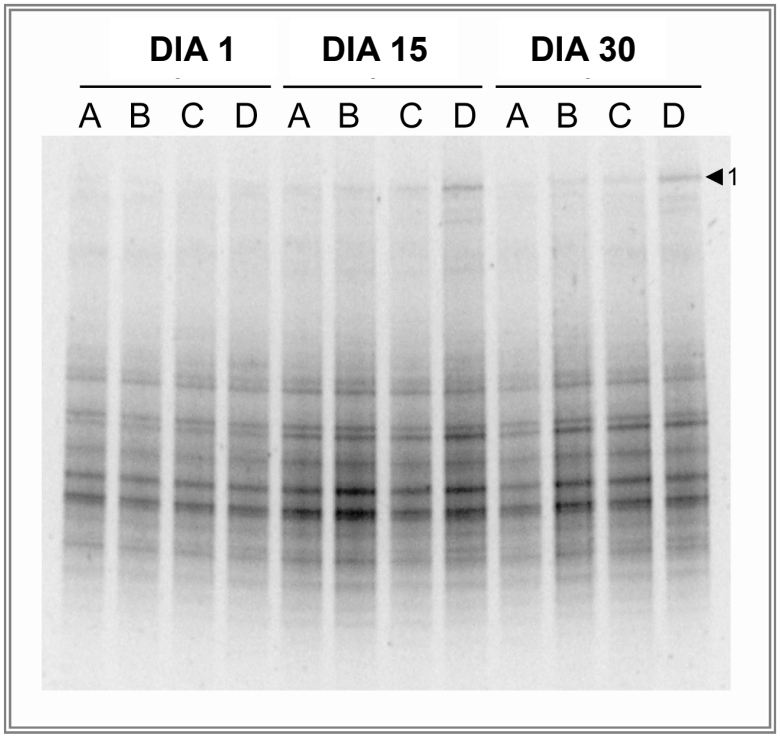

Figura 11. Análisis DGGE del 16S ADNr para el suelo S-0 (A) y los suelos enmendados S-100 (B), S-200 (C) y S-300 (D) para los días 1, 15 y 30 posteriores a la aplicación del purín.

3.4. Estudio de adsorción y mecanismos de adsorción de atrazina

3.4.1. Adsorción de atrazina

El estudio de adsorción se inició con una cinética que permitiera conocer el tiempo requerido por atrazina para obtener el equilibrio de adsorción en el suelo y suelo enmendado con purines pre-incubados por 30 días. La concentración de atrazina utilizada fue de 1,5 mg L^{-1}. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12. Como se observó, atrazina alcanzó el equilibrio de adsorción en S-0, S-100, S-200 y S-300 luego de 12 h de su aplicación.

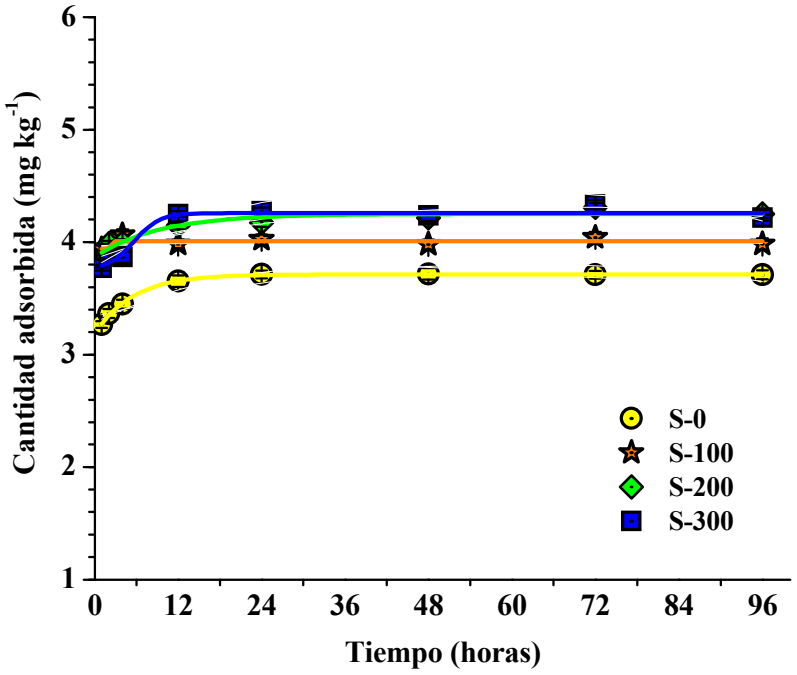

Figura 12. Cinética de adsorción de atrazina para el suelo (S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) pre-incubados por 30 días. Atrazina se aplicó en una concentración de 1,5 mg L^{-1}. Se presentan los valores medios (n=3) y las barras del error estándar de la media.

Una vez conocido el tiempo en que atrazina alcanzó el equilibrio de adsorción en el suelo y suelos enmendados, se realizó la isoterma de adsorción, sin embargo, para este estudio se seleccionó un tiempo de 24 h para asegurar la condición de equilibrio. Los resultados

obtenidos para la adsorción de atrazina en S-0, S-100, S-200 y S-300 se muestran en la Figura 13.

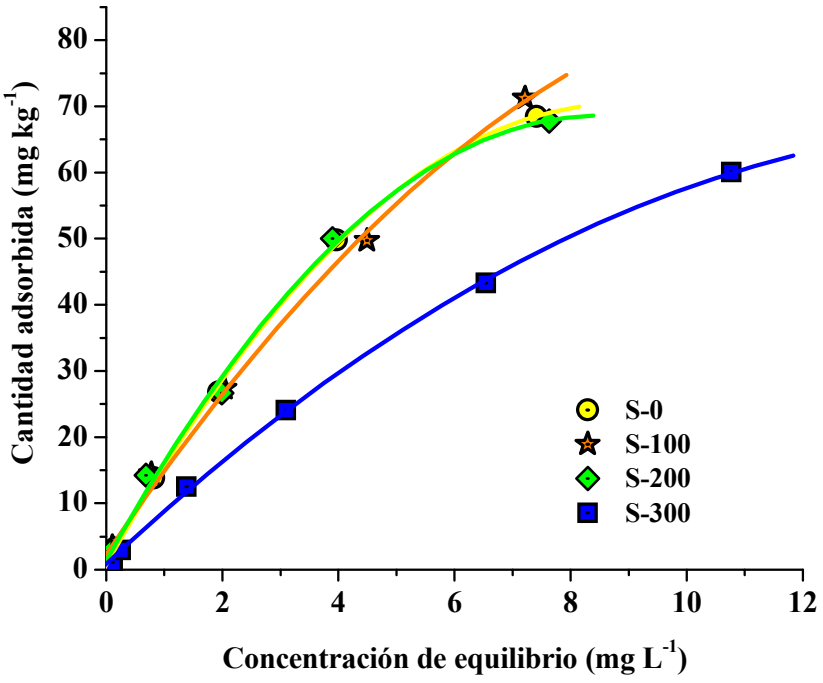

Figura 13. Isotermas de adsorción de atrazina para el suelo control (S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) pre-incubados por 30 días. Las isotermas se realizaron considerando el rango de solubilidad de atrazina (0-30 mg L^{-1}). Se presentan los valores medios (n=3) y las barras del error estándar de la media.

La adsorción de atrazina no presentó diferencias significativas para S-0, S-100 y S-200, mientras que se observó una disminución de la adsorción en S-300. Al linealizar las curvas representativas de la adsorción de atrazina a través de la ecuación del modelo de Freunlich se obtuvieron los parámetros K_f y N_f. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros de la ecuación del modelo de Freundlich, además se incluyen el coeficiente $K_{f\text{-}oc}$ y el porcentaje de desorción de atrazina obtenidos para S-0, S-100, S-200 y S-300.

Se observó a través de los altos valores de los coeficiente de correlación ($r^2 > 0.98$), que el modelo de Freundlich explica satisfactoriamente la adsorción de atrazina tanto para el suelo como en los suelos enmendados con purines (Singh, 2003).

Tabla 5. Parámetros de la ecuación del modelo de Freundlich (K_f y N_f), valores $K_{f\text{-}oc}$ y el porcentaje de desorción de atrazina para el suelo (S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) pre-incubados por 30 días.

Tratamientos	pH	CO	CO disuelto	K_f	N_f	r^2	$K_{f\text{-}oc}$	Desorción
	$CaCl_2$	%	mg kg^{-1}	mg $^{(1-N)}$ L^N kg^{-1}				%
S-0	4,7	10,8	23,2	1,19 ±0,02	0,78	0,98	11,02	72
S-100	4,7	10,6	31,0	1,18 ± 0,05	0,78	0,99	11,13	72
S-200	4,7	10,6	40,0	1,20 ± 0,01	0,80	0,99	11,32	70
S-300	4,7	10,2	71,0	0,96 ±0,01 *	0,81	0,99	9,51*	83 *

Se presentan los valores medios de K_f con su desviación estándar. El símbolo * indica diferencia significativa de acuerdo al análisis de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los parámetros K_f y N_f corresponden a constantes empíricas del modelo de Freundlich que caracterizan la capacidad de adsorción de pesticidas es general. Específicamente, K_f expresa la capacidad adsorbente del suelo para un rango de concentración de pesticidas y N_f es una medida de la intensidad de adsorción y por lo tanto refleja el grado en el cual la adsorción es una función de la concentración (Flores-Céspedes *et al*., 2002). A través de la linealización de las curvas de adsorción, se observó que no hubo diferencias significativas en la capacidad de adsorción de atrazina entre los tratamientos de suelos S-0, S-100 y S-200, en los cuales los valores de K_f se encontraron entre 1,18 y 1,20. Por otra parte, se obtuvo una menor capacidad de adsorción de atrazina en S-300 (K_f 0,96). Con respecto a la constante N_f, no se observó diferencias significativas entre los tratamientos de suelo, para los cuales se obtuvieron valores entre 0,78 y 0,81. El coeficiente $K_{f\text{-}oc}$, que expresa la adsorción como una función del contenido de CO del suelo, presentó valores entre 11,02 y 11, 32 para S-0, S-100 y S-200, mientras que S-300 presentó diferencias significativas con un valor de $K_{f\text{-}oc}$ igual a 9,51. Finalmente, a través del análisis de desorción se observó, que atrazina presentó una desorción en relación a la cantidad adsorbida, de un 70 - 72% en S-0, S-100 y S-200 y de un 83% en S-300.

3.4.2. Mecanismos de adsorción de atrazina

Los mecanismos involucrados en la adsorción de atrazina en el suelo y suelo enmendado se evaluaron a través de espectroscopía FT IR. El estudio se realizó para S-0 y S-300, ya que, S-100 y S-200 no presentaron diferencias en la capacidad de adsorción de atrazina respecto al suelo sin aplicación de purines. Se utilizó como diagnóstico para la identificación de los mecanismos involucrados en la interacción de atrazina con S-0 y S-300, los estiramientos correspondientes a la absorción que representa la vibración del anillo triazínico (1.618 cm^{-1}), deformación N-H (1.548 cm^{-1}) y N-aromático (1.348 cm^{-1}) de atrazina pura. Los resultados obtenidos correspondientes a la interacción de atrazina se muestran en la Figura 14 para S-0 y en la Figura 15 para S-300.

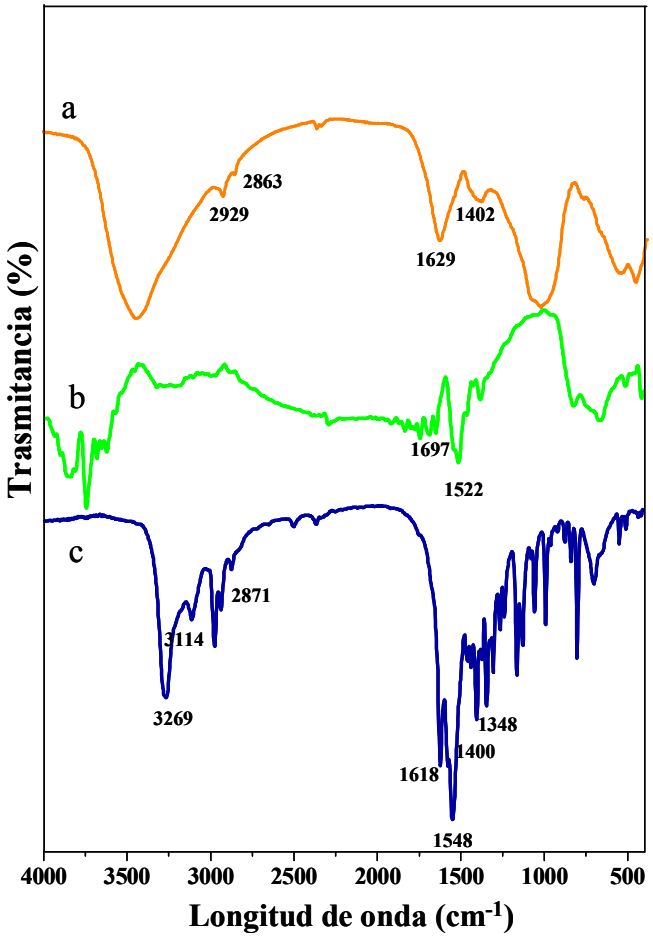

Figura 14. Espectro FT IR para el suelo control (S-0) (a), complejo S-0 con atrazina (b) y atrazina pura (c).

Atrazina presentó las mismas interacciones en S-0 y S-300. Se observó, que una banda correspondiente a una deformación NH (1.548 cm^{-1}) fue traslada hacia una menor longitud de onda, comparado a la absorción presentada en el espectro de atrazina pura, para S-0 se encontró cercana a los 1.522 cm^{-1} y para S-300 en los 1.534 cm^{-1}. Del mismo modo, se observó en S-0 y S-300 un corrimiento en la localización de la banda asociada con vibraciones del anillo triazínico, presentada originalmente en 1.618 cm^{-1} para atrazina pura, este corrimiento se encontró en 1.697 cm^{-1} para S-0 y 1.634 cm^{-1} para S-300.

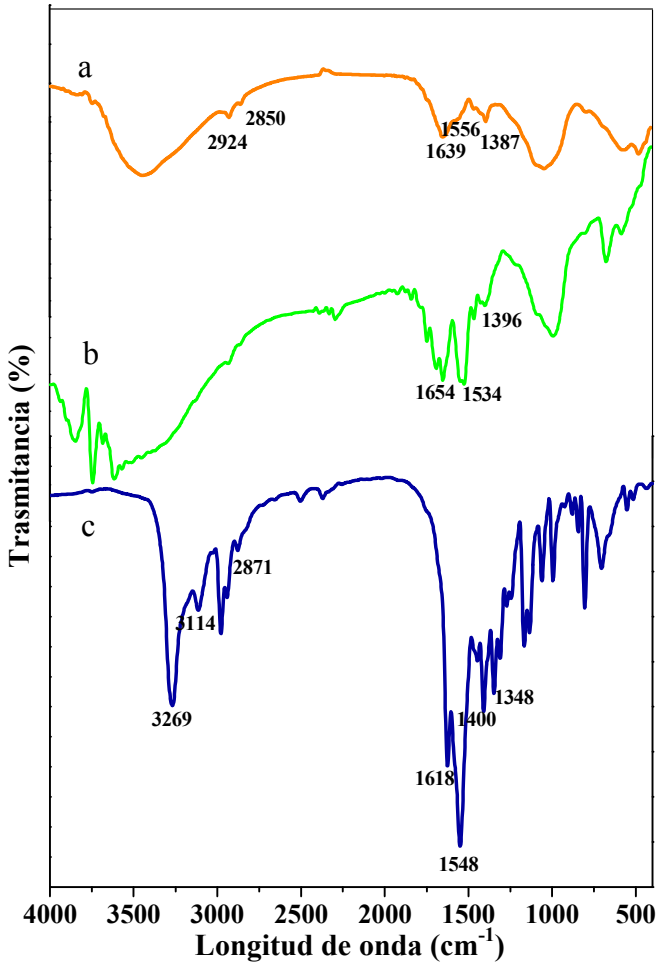

Figura 15. Espectro FT IR para el suelo enmendado con purín en una dosis de aplicación de 300.000 L ha^{-1} (S-300) (a), complejo S-300 con atrazina (b) y atrazina pura (c).

3.5. Persistencia de atrazina y determinación de sus productos de degradación

Los resultados obtenidos del estudio de incubación, realizado para S-0, S-100, S-200 y S-300 con aplicación de atrazina en concentraciones de 1 mg kg^{-1} (D-1) y 2 mg kg^{-1} (D-2) se muestran en la Figura 16.

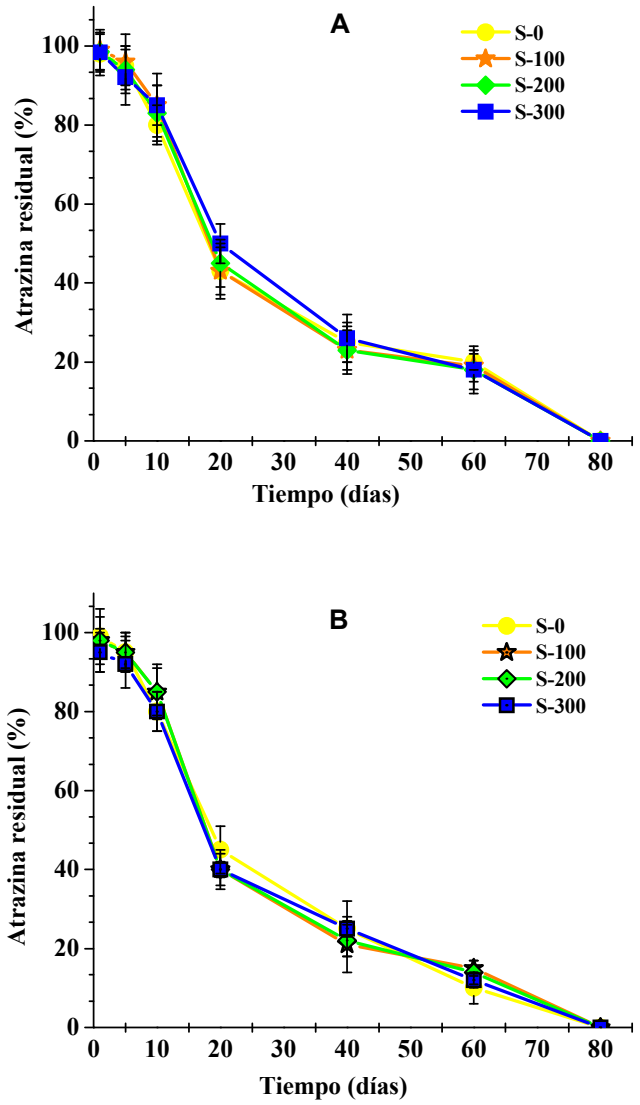

Figura 16. Atrazina residual en el suelo(S-0) y suelos enmendados con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (S-100, S-200 y S-300, respectivamente). Atrazina se aplicó en concentraciones de 1 mg kg^{-1} (A) y 2 mg kg^{-1} (B). La evaluación se realizó por 80 días. Se presentan los valores medios (n=3) y el error estándar de la media.

El análisis de los residuos de atrazina en el tiempo, mostró que la aplicación de las dosis D-1 y D-2 de atrazina en el suelo y suelos enmendados con purines no presentaron diferencias significativas respecto a la cantidad de residuos. En relación a la cantidad aplicada de atrazina, luego de 10 días se encontró aproximadamente un 80% de residuos, luego de 20 días entre un 40 y un 50%, en el día 40 entre un 20 y un 30% y en el día 60 se encontraron entre un 15 y 20% de atrazina residual, finalmente luego de 80 días, no se detectaron residuos del herbicida en los suelos evaluados.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos a través del modelo cinético de primer orden en su forma logarítmica $\ln (C_t/C_0) = -kt$ utilizado para estimar la vida media ($t_{1/2}$) y tasa de degradación de atrazina. De acuerdo a los resultados obtenidos para los coeficientes de correlación ($r^2 \geq 0.94$), se observó que el modelo cinético utilizado refleja satisfactoriamente la tasa de degradación de atrazina en los suelos evaluados.

Tabla 6. Valores de las constantes de degradación (k d^{-1}), tiempos de vida media ($t_{1/2}$) y coeficientes de correlación (r^2) para atrazina aplicada en concentraciones de 1 mg kg^{-1}(D-1) y 2 mg kg^{-1} (D-2) en el suelo (S-0) y suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100), 200.000 L ha^{-1} (S-200) y 300.000 L ha^{-1} (S-300).

Atrazina (mg kg^{-1} suelo)	**Suelo**	***k*** d^{-1}	**$t_{1/2}$**	**r^2**
1	**S-0**	0,047 (0,002)	15	0,98
	S-100	0,046 (0,005)	15	0,97
	S-200	0,040 (0,003)	17	0,99
	S-300	0,040 (0,002)	19	0,98
2	**S-0**	0,041 (0,008)	17	0,99
	S-100	0,045 (0,003)	15	0,99
	S-200	0,042 (0,000)	16	0,94
	S-300	0,045 (0,001)	15	0,96

Se presentan los valores medios y en paréntesis la desviación estándar de la media.

El tiempo de vida media observado para atrazina al aplicar la dosis de campo (D-1) en el suelo (S-0) y suelos enmendados (S-100, S-200 y S-300) se encontró entre 15 y 19 días, presentado el siguiente orden: S-0 (15) = S-100 (15) < S-200 (18) < S-300 (20), mientras que al aplicar el doble de la dosis de campo (D-2), el tiempo de vida media se encontró entre 15 y 17 días en el siguiente orden: S-0 (17) >S-200 (16)>S-100 (15)= S-300 (15).

Durante el tiempo que duró la incubación (80 días), se determinaron los residuos de HA, DEA y DIA, los cuales corresponden a los principales productos de degradación de atrazina. Sin embargo, sólo se detectaron residuos durante los días 20 y 40 posterior a la aplicación de atrazina en el suelo y suelos enmendados. Los residuos extractables de atrazina y de sus metabolitos al aplicar D-1 y D-2 se muestran en la Figura 17 A y B, respectivamente. Luego de 20 días de aplicar D-1 de atrazina en el suelo y suelo enmendado, se observó que el porcentaje total de los metabolitos fue de aproximadamente 1%, 6%, 7% y 14% para S-0, S-100, S-200 y S-300, respectivamente. Para S-0 y S-100 los productos encontrados fueron DIA e HA, no observándose residuos del metabolito DEA, por su parte, en S-200 y S-300 se encontraron residuos de los tres metabolitos evaluados. Se observó, que HA presentó una mayor cantidad de residuos a medida que aumentó la dosis de aplicación de purín en el suelo, las cantidades encontradas fueron de 0,3% (S-0), 1,9% (S-100), 3,2% (S-200) y 10,1% (S-300). El producto de degradación DIA se encontró en todos los tratamientos de suelo, en S-0 fue donde se obtuvo la menor cantidad (0,7%), mientras que en los suelos enmendados los residuos fueron de 3,6% (S-100), 1,8% (S-200) y 1,0% (S-300). El producto DEA sólo se encontró en S-200 y S-300 en cantidades de 1,6% y 3,4%, respectivamente. Luego de 40 días de incubación, se encontraron residuos de los tres productos de degradación en cantidades de 3,2%, 5,0%, 4,9% y 5,9% en S-0, S-100, S-200 y S-300, respectivamente. Se observó, que en S-0 predominó la formación de los productos DEA (1,0%) y DIA (1,6%), en S-100 el producto DIA (2,2%) y en S-200 y S-300 fueron los productos DIA e HA, los cuales presentaron entre un 2% y un 3% de residuos en relación a la cantidad de atrazina aplicada al suelo.

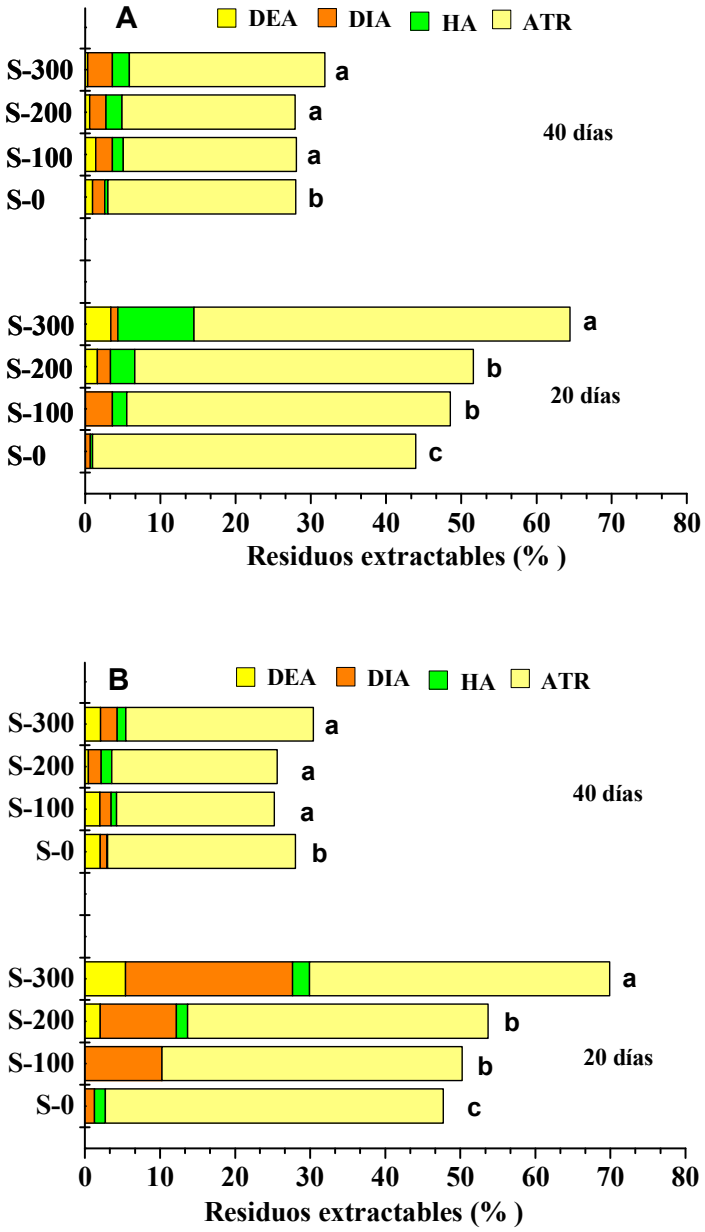

Figura 17. Residuos extractables de atrazina y de sus productos de degradación deetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA) e hidroxiatrazina (HA) para el suelo (S-0) y suelos enmendados con purines (S-100, S-200 y S-300) luego de 20 y 40 días de la aplicación de atrazina en el suelo en las concentraciones de 1 mg kg^{-1} (A) y 2 mg kg^{-1} (B). Letras distintas indican diferencias significativas para la cantidad total de los productos de degradación, según análisis de Tukey ($P<0.05$).

A través de la aplicación de D-2 de atrazina (Figura 17 B), se observó luego de 20 días de incubación, que la cantidad de residuos de los productos DEA, DIA e HA aumentó a medida que se aplicó una mayor dosis de purín en el suelo, en relación a la cantidad de atrazina, los productos de degradación presentaron un 2,7%, 10,3%, 13,7% y 29,9% en S-0, S-100, S-200 y S-300, respectivamente. En S-0, sólo se encontraron los productos DIA (1,3%) e HA (1,4%), mientras que en los suelos enmendados el principal producto encontrado fue DIA en cantidades de 10,3%, 10,1% 22,3% en S-100, S-200 y S-300, respectivamente. Posterior a 40 días de incubación, la cantidad de atrazina residual y de sus productos de degradación fue de aproximadamente un 30% de la cantidad inicialmente aplicada. En S-0 se observó la presencia de residuos de los productos DIA e HA (3,0%), mientras que en los suelos enmendados se encontraron los tres productos de degradación en cantidades de 4,2%, 3,6% y 5,4% en S-100, S-200 y S-300, respectivamente. Posterior a este tiempo de incubación no se detectaron residuos de los metabolitos de atrazina.

3.6. Efecto de atrazina sobre los microorganismos del suelo

3.6.1. Respiración microbiana

Una vez realizada la pre-incubación por 30 días del suelo enmendado con purines y conocer el tiempo en que la actividad microbiana tiende a recuperar los niveles cercanos al suelo, se aplicó atrazina y se evaluó la evolución de CO_2 por un periodo de 60 días. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos para S-0, S-100, S-200 y S-300 expuestos a 0 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1}, 2 mg kg^{-1} y 3 mg kg^{-1} de atrazina (D-0, D-1, D-2 y D-3, respectivamente). Se observó que la respiración microbiana en el suelo y en el suelo enmendado aumentó significativamente ($P<0.05$) luego de 5 días posteriores a la aplicación de atrazina. En S-0 sin atrazina (D-0) la actividad fue de aproximadamente 25 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1}, sin embargo, al aplicar atrazina la actividad aumentó significativamente. Los niveles más altos de respiración (275 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1}) observados en S-0 se presentaron el día 25 al aplicar D-1 y el día 30 al aplicar D-2 y D-3. En S-100, S-200 y S-300 sin atrazina (D-0) la actividad fue similar a la observada en S-0, sin embargo, al aplicar atrazina, los niveles de respiración aumentaron significativamente, presentando los niveles más altos de respiración los tratamientos que recibieron la dosis más alta de atrazina (D-3). Al aplicar D-1 y D-2 de atrazina la respiración presentó niveles de $C\text{-}CO_2$ cercanos a 300 µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1} en todos los suelos enmendados y al aplicar D-3 los niveles observados superaron los

400 µg C-CO_2 g^{-1}. En los suelos enmendados, los mayores niveles de respiración se presentaron durante el día 20 al aplicar D-1 y D-2 y el día 25 al aplicar D-3.

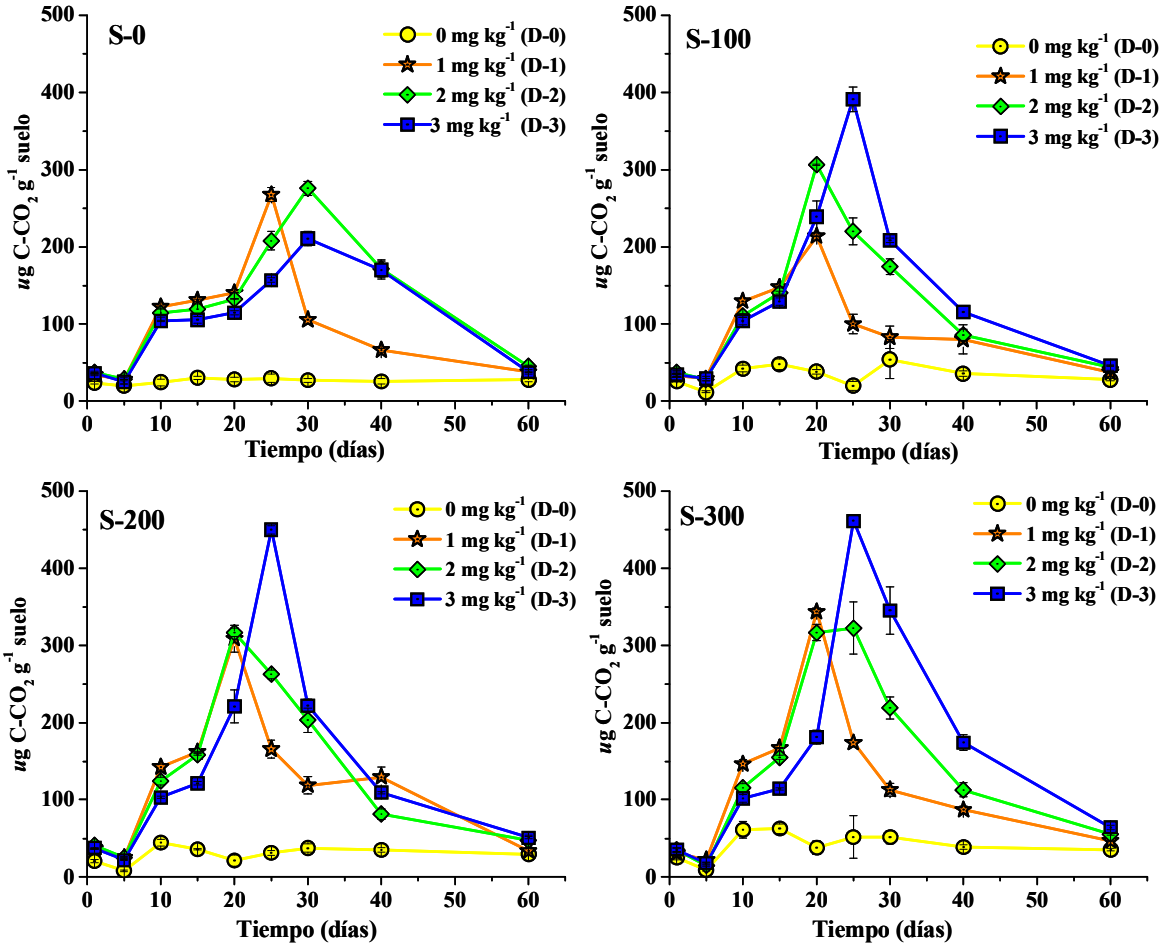

Figura 18. Respiración microbiana del suelo (S-0) (A) y suelo enmendado con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100) (B), 200.000 L ha^{-1} (S-200) (C) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) (D), con aplicación de atrazina en las concentraciones de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1), 2 mg kg^{-1} (D-2) y 3 mg kg^{-1} (D-3). Se presentan los valores medios (n=3) y el error típico de la media.

Se observó, que todos los tratamientos de suelos expuestos a atrazina presentaron la estabilización de la actividad respiratoria luego de 60 días de aplicado el herbicida, no

existiendo diferencias significativas respecto a los suelos sin aplicación de atrazina. Finalmente, al realizar un análisis de la respiración acumulada al día 60 de incubación (datos no mostrados), se observó, una mayor respiración en los suelos que recibieron una mayor concentración de atrazina, excepto en S-0, en el cual al aplicar D-3 la respiración fue menor que al aplicar D-2. Además, se observó una mayor respiración en los suelos que recibieron una mayor aplicación de purines.

3.6.2. Actividad enzimática

El efecto de atrazina sobre la actividad enzimática FDA y β-glucosidasa se evalúo durante 60 días. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos para la actividad FDA. La aplicación de atrazina en distintas dosis modificó la actividad en S-0 luego de 10 días de su aplicación, no observándose un efecto de la dosis del herbicida, los niveles de actividad aumentaron alcanzando niveles cercanos a los 800 µg fluoresceína g^{-1} h^{-1}. Atrazina no afectó la actividad FDA de S-100, S-200 y S-300, se observó, un nivel de actividad aproximada a 400 µg fluoresceína g^{-1} $h^{-}1$, la cual se mantuvo casi constante por el periodo que duró la incubación.

Por su parte, la actividad β-glucosidasa (Figura 20) fue modificada ($P<0.05$) por la aplicación de atrazina en S-0, S-100, S-200 y S-300, no observándose un efecto de la dosis de aplicación del herbicida. En S-0 la actividad aumentó luego de 10 días de la aplicación de atrazina alcanzando niveles entre 6-8 µmol pNP g^{-1} h^{-1}, luego de 20 días la actividad se recuperó y se mantuvo así por el periodo que duró la evaluación. A diferencia de S-0, S-100 presentó un aumento de la actividad luego de 20 días de la aplicación de atrazina, mientras que en S-200 y S-300 se observó luego de 10 días. Para todos los suelos enmendados los altos niveles de actividad (5-8 µmol pNP g^{-1} h^{-1}) al aplicar atrazina se mantuvieron hasta el final del periodo de incubación.

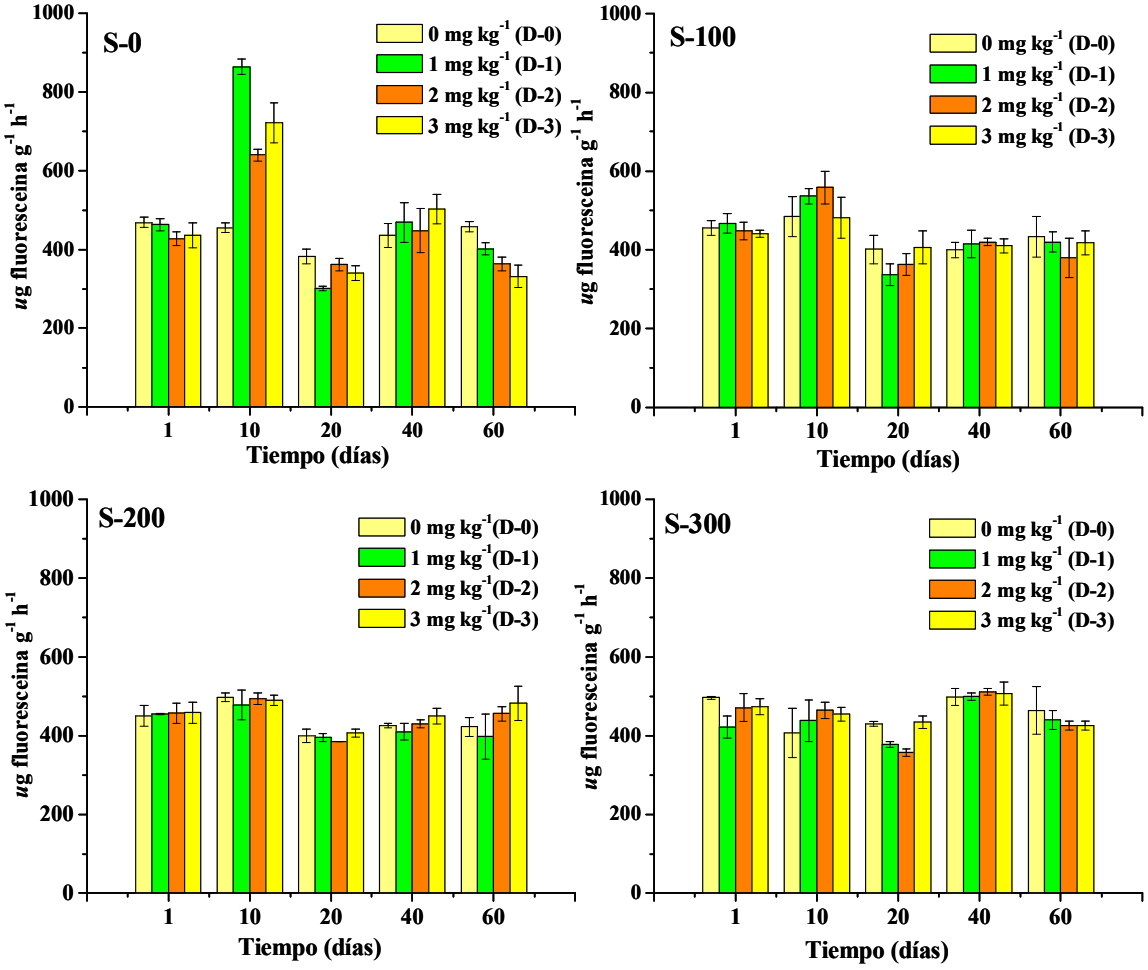

Figura 19. Actividad Fluoresceína diacetato (FDA) del suelo (S-0) (A) y suelo enmendado con purines en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100) (B), 200.000 L ha^{-1} (S-200) (C) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) (D), con aplicación de atrazina en las concentraciones de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1), 2 mg kg^{-1} (D-2) y 3 mg kg^{-1} (D-3). Se presentan los valores medios (n=3) y el error típico de la media.

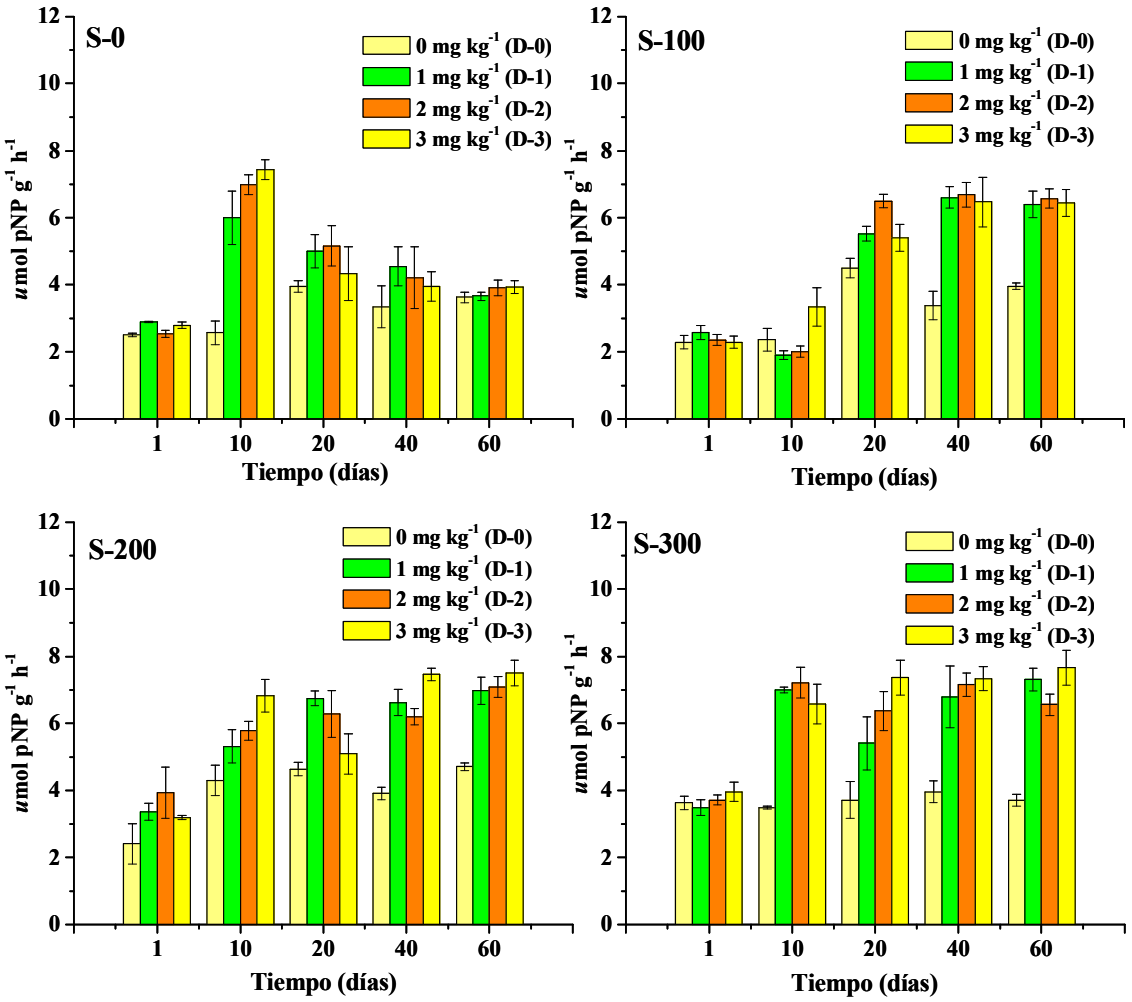

Figura 20. Actividad β-glucosidasa del suelo (S-0) (A) y suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1} (S-100) (B), 200.000 L ha^{-1} (S-200) (C) y 300.000 L ha^{-1} (S-300) (D), con aplicación de atrazina en las concentraciones de 0 mg kg^{-1} (D-0), 1 mg kg^{-1} (D-1), 2 mg kg^{-1} (D-2) y 3 mg kg^{-1} (D-3). Se presentan los valores medios (n=3) y el error típico de la media.

3.6.3. Análisis de la comunidad microbiana a través de PCR- DGGE

A través de la técnica molecular PCR-DGGE se evaluaron los efectos de la aplicación de atrazina sobre la comunidad microbiana del suelo y suelos enmendados. En la Figura 21 se muestra el gel obtenido del DGGE que muestra los cambios sobre la comunidad de bacterias. Se observó, que luego de 1 día de la aplicación de distintas concentraciones de atrazina, la estructura de la comunidad no fue afectada. Sin embargo, luego de 10 días aparecieron bandas (3, 4 y 5) que variaron en intensidad en S-0, S-100, S-200 y S-300. Las bandas 3 y 4 presentaron mayor intensidad en S-100 y S-300 al aplicar D-3. Por su parte, la banda 5 se observó en todos los tratamientos de suelo, pero con mayor intensidad en aquellos que recibieron mayores dosis de atrazina. Durante el día 10 se observó una banda (banda 2) en S-0, la cual se manifestó en el suelo sin aplicación de atrazina y aplicar D-1 y D-2. Además, se observó una banda (Banda 6) en S-100, S-200 y S-300, la cual fue más intensa en S-200 con aplicación de D-2 y D-3 de atrazina. Finalmente, se observó que luego de 20 días de la aplicación de atrazina, la comunidad de bacterias recuperó la condición presentada previamente a la aplicación del herbicida.

Al realizar la identificación de las bacterias dominantes a través de la comparación de las secuencias 16S ADNr con secuencias de la base de datos GenkBank (Figura 23), se observó, que las bacterias dominantes presentaron similitud con bacteria representantes de los grupos Bacteroidetes (Bandas 8 y 9), Beta Proteobacteria (Bandas 3, 5 y 6) y Gama Proteobacteria (Bandas 2 y 7), la banda 4 se asoció al grupo de las Beta Proteobacteria, sin embargo, fue la que presentó una menor similitud comparado a lo obtenido para las bandas 3, 4 y 5. Al realizar la identificación con mayor detalle al realizar la comparación con la base de datos NCBI (Tabla 7) se obtuvo que las bandas 3, 4, 5 y 6 pertenecen al Phylum Proteobacteria, y específicamente a la Clase Betaproteobacteria, mientras que las bacterias dominantes representadas por las bandas 2 y 7 pertenecen a la Clase Gammaproteobacteria, Género Acinetobacter. Las bacterias representadas por las bandas 8 y 9 corresponden a las identificadas como pertenecientes al Phylum Bacteroidetes las cuales fueron incorporadas o estimuladas a través de la aplicación del purín y que para este tiempo de incubación (60 días) permanecieron en los suelos enmendados. En general, luego del día 20 hasta el final de la evaluación se observó que la comunidad se manifestó de forma estable.

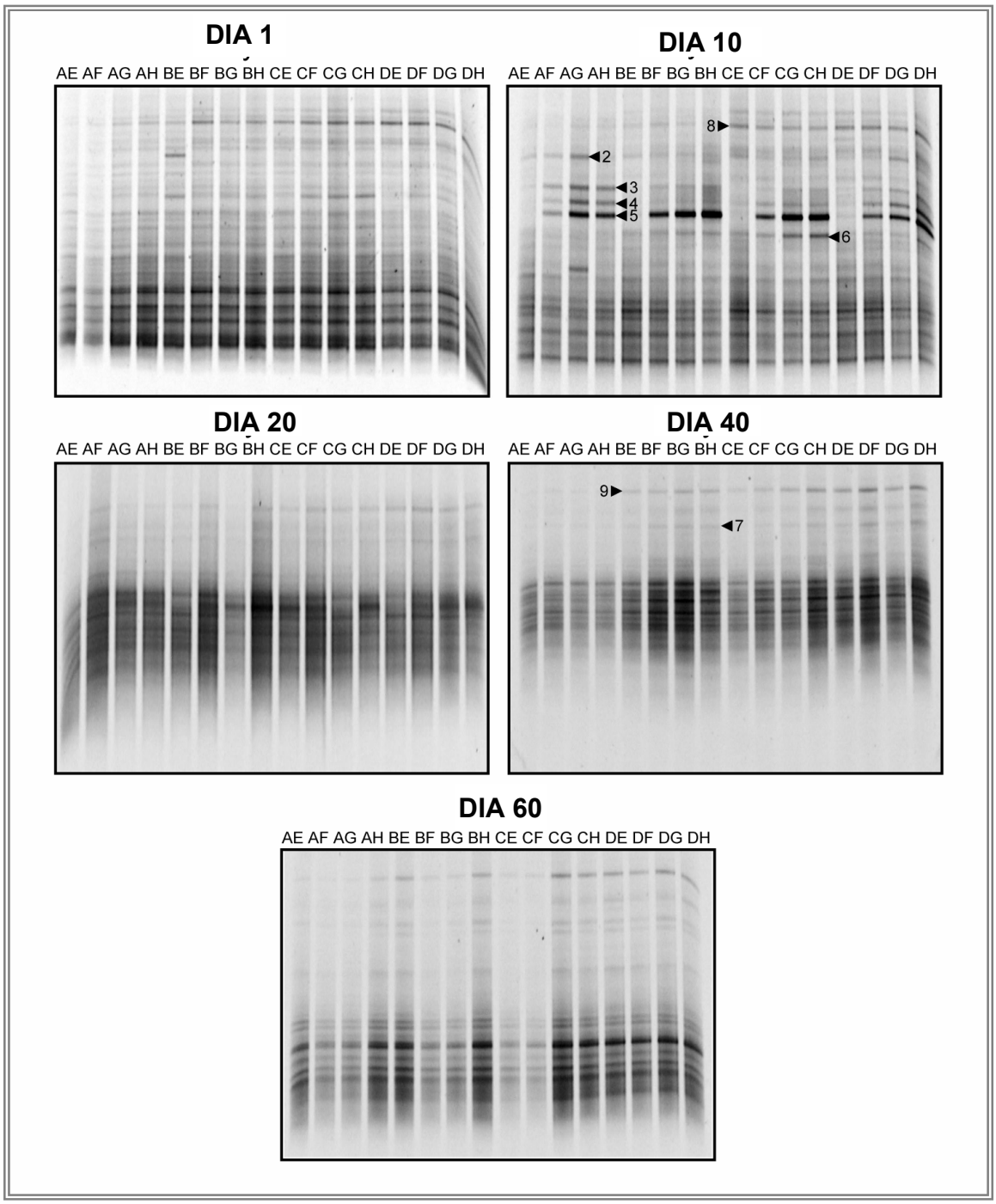

Figura 21. Análisis DGGE de los fragmentos 16S ADNr amplificado del suelo (A) y suelo enmendado con purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (B, C y D, respectivamente) con aplicación de atrazina en concentraciones de 0 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1}, 2 mg kg^{-1} y 3 mg kg^{-1} (E, F, G y H, respectivamente). Análisis realizados para los días 1, 10, 20, 40 y 60 posterior a la aplicación del herbicida en los suelo.

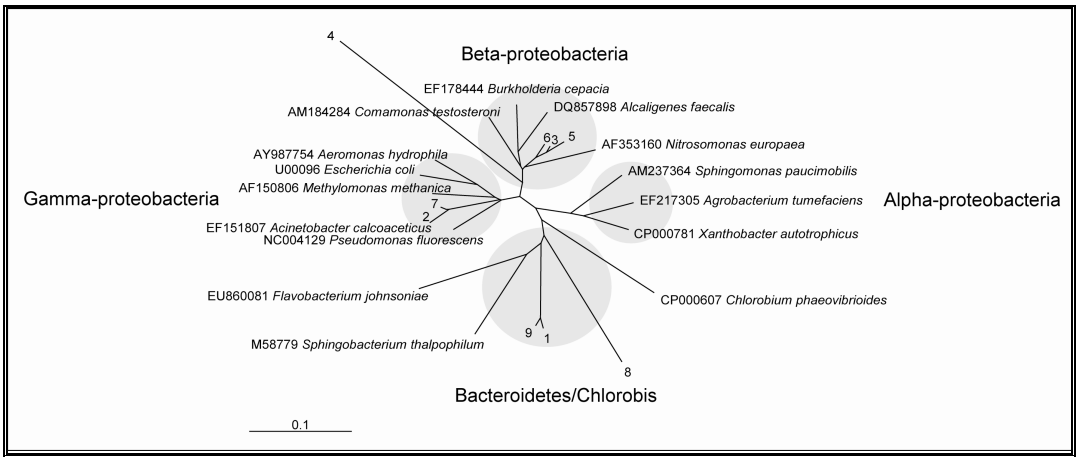

Figura 22. Árbol filogenético del Reino Bacteria para las bandas dominantes observadas en el análisis DGGE de las bacterias 16S ADNr para el suelo control (S-0) y los suelos con aplicación de purín en las dosis de 100.000 L ha^{-1}, 200.000 L ha^{-1} y 300.000 L ha^{-1} (B, C y D, respectivamente) con aplicación de atrazina.

Tabla 7. Asignación filogenética de las bandas dominantes observadas en los geles DGGE derivados de bacterias 16S ADNr extraído de las muestras de suelo S-0 y suelo enmendado S-100, S-200 y S-300 expuestos a diferentes concentraciones de atrazina.

Banda[a]	Phylum/Clase/Género[b]	N° accesión
1	Bacteroidete	FJ395193
2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Acinetobacter	FJ395194
3	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	FJ395195
4	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	FJ395196
5	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	FJ395197
6	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	FJ395198
7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Acinetobacter	FJ395199
8	Bacteroidete	FJ395200
9	Bacteroidete	FJ395201

[a] Bandas obtenidas a través del análisis DGGE mostrado en la fig. 18.

[b] Basado en la secuenciación de bacterias 16S ADNr y comparación con la base de datos NCBI.

4. DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la aplicación de dosis crecientes de purín sobre las características química y biológica del suelo.

4.1.1. Efecto del purín sobre las características química del suelo

La aplicación en el suelo de dosis crecientes de purín, provocó inicialmente un aumento del pH, CE, CO disuelto, N, P y ∑ de bases. Sin embargo, luego de 30 días la mayoría de estos parámetros se recuperaron hasta presentar valores cercanos o iguales al suelo (S-0). El inicial aumento del pH y CE en los suelos enmendados, atribuido a la acción ejercida por el gran contenido de $CaCO_3$ y sales solubles que caracterizan en general a los purines, producto de la alimentación animal (Plaza *et al*., 2004), fue recuperado para el pH luego de 30 días, lo anterior debido probablemente a la ocurrencia inicial de un proceso de amonificación luego de la aplicación de la enmienda, el cual fue seguido por un proceso de nitrificación con una consecuente liberación de H^+ (Amlinger *et al*., 2003). La aplicación del purín en el suelo, enmienda caracterizada por presentar una MO de carácter alifático con alto contenido de N y polisacáridos (Plaza *et al*., 2003; Calderón *et al*., 2006), contribuyó a aumentar los contenidos de CO disuelto, sin embargo, procesos tales como la estabilización del C, proceso que comienza luego de la aplicación de la enmienda en el suelo (Moral *et al*., 2005), la mineralización del C por parte de los microorganismos del suelo (Kalbitz *et al*., 2003) o la adsorción del CO disuelto en los constituyentes del suelo (Said- Pullicino *et al*., 2004), podrían estar influyendo en la disminución de sus contenidos luego de 30 días de incubación de los suelos enmendados. Una disminución en los contenidos de N y P se observó luego de 30 días de incubación de los suelos enmendados, lo cual para N puede deberse, al proceso de amonificación, ya que gran cantidad del nitrógeno agregado con la enmienda es volatizado (Amlinger *et al*., 2003), mientras que para P puede ser explicado por un efecto de retención en el suelo estudiado, el que se caracteriza por presentar una alta retención de este nutriente y por lo tanto una baja disponibilidad (Fuentes *et al*., 2006). Luego de 30 días de aplicado el purín, se observó que los cationes intercambiables (Ca, Mg, Na, y K) expresados como la ∑ de bases presentaron una disminución en S-100, S-200 y S-300 respecto a los valores presentados inicialmente, aunque de igual forma, fue superior a la de S-0. Finalmente, la aplicación de dosis crecientes de purín, no modificó los contenidos de MO del suelo, para ninguno de los

tiempos evaluados (1 y 30 días), debido a la baja contribución de MO estable y madura presente en el purín. Resultados previos obtenidos por Plaza *et al*. (2004) mostraron que al aplicar purín de cerdo, de características similares al purín utilizado en este estudio, la enmienda no presentó un aumento del contenido de MO, lo cual fue atribuido a las características del suelo. Una estimación del aporte de MO por parte del purín, esta fue de 1,6 mg kg^{-1}, 3,1 mg kg^{-1} y 4,5 mg kg^{-1} para S-100, S-200 y S-300, respectivamente, lo cual no fue significativo para el suelo utilizado en este estudio, caracterizado por presentar un alto contenido de MO (18%).

El análisis realizado para S-0, S-100, S-200 y S-300, a través de FT IR, demostró que la aplicación del purín en el suelo influyó sobre la composición y presencia de grupos funcionales. En general, la aplicación de dosis crecientes de purín, aumentó la alifaticidad y presencia de grupos con contenido de N y moléculas de polisacáridos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Brunetti *et al*. (2007) para suelos enmendados, en los cuales se observó que la composición, función y estructura son afectados de diferentes formas y extensión como una función de la naturaleza, origen y dosis de aplicación de la enmienda. La aplicación de purines en el suelo, contribuye a aumentar el reciclado de nutrientes. Sin embargo, es necesario prestar atención a las modificaciones que esta práctica puede provocar, especialmente relacionadas a la acumulación de sales, las cuales pueden causar un deterioro en la estructura del suelo si el purín se aplica por periodos prolongados (Assefa *et al*., 2004). Además, las sales que se acumulan en el suelo pueden lixiviar a aguas subterráneas principalmente durante eventos de lluvia, pudiendo de esta forma presentar un grave problema de contaminación (Diez *et al*., 2001). Por su parte, altas dosis de purines se han asociado a presentar problemas ambientales debido a su contribución de una MO no estabilizada como es el CO disuelto, el cual puede interferir de forma negativa en diversos procesos reactivos del suelo, como por ejemplo, en la adsorción y lixiviación de diversos compuestos químicos, entre ellos, herbicidas (Plaza *et al*., 2003).

4.1.2. Efecto del purín sobre las características biológicas del suelo

La adición de enmiendas orgánicas aumenta la actividad microbiana del suelo, lo que en la mayoría de los casos se ha observado a través de un incremento de la evolución de CO_2 y de la actividad enzimática (Debosz *et al*., 2002; Sánchez-Monedero *et al*., 2008). Para el suelo enmendado con purines de origen bovino, se observó un aumento significativo de la

respiración microbiana y la actividad FDA, lo anterior, debido al efecto de estimulación en los microorganismos por parte del purín, el cual aportó al suelo CO disuelto y nutrientes disponibles para su mineralización (Peacock *et al*., 2001).

Se ha observado que la actividad en suelos enmendados aumenta durante las dos primeras semanas, obteniéndose los máximos niveles luego de 5 días de aplicada la enmienda (Sánchez-Monedero *et al*., 2008). Por su parte, Plaza *et al*. (2007) observó que en un suelo con aplicación de dosis crecientes de purines de cerdo, la estabilización de la actividad microbiana se obtuvo luego de 14 días. Considerando lo anterior, se confirman los resultados obtenidos para el suelo estudiado y la enmienda utilizada, ya que los suelos enmendados tendieron a la estabilización luego de 15 días de aplicado el purín, tal como se observó a través del análisis de respiración y actividad FDA. El tiempo necesario para la obtención de la estabilización en los suelos enmendados se encuentra determinado por la disponibilidad de nutrientes (Plaza *et al*., 2007; Sánchez-Monedero *et al*., 2008). La aplicación del purín en el suelo, contribuyó a aumentar principalmente los contenidos de N y de CO disuelto del suelo, sin embargo, luego de 30 días los suelos presentaron niveles cercanos a los observados en el suelo sin enmendar, lo que estaría indicando que luego de 15 días los suelos presentaron un agotamiento de los nutrientes, limitando mantener los altos niveles de actividad por un periodo de tiempo más prolongado.

La actividad β-glucosidasa no actuó como un índice adecuado de la actividad, lo cual podría deberse a los altos contenidos de N presentados por los suelos posterior a la aplicación del purín. Los purines en general, presentan altos contenidos de N en la forma de nitrato. Considerando, que la rápida asimilación microbiana de nitrato y la subsiguiente liberación de amonio tiene el potencial de reprimir la actividad de hongos, debido a la inhibición de sus enzimas degradadoras (DeForest *et al*., 2004) y que uno de los principales productores de la enzima β-glucosidasa en el suelo son especies de hongos (Plaza *et al*., 2004) se cree que la aplicación del purín pudo inhibir a la enzima y por lo tanto que no se viera manifestado su potencial hidrolítico para catalizar β-glucósidos como es la celulosa (Plaza *et al*., 2004).

Se ha observado, que la aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo, provoca cambios sobre la comunidad microbiana (Sun *et al*., 2004; Chu *et al*., 2007; Sekiguchi *et al*., 2007). La aplicación de purines en el suelo no modificó la estructura de la comunidad microbiana, excepto por la activación del grupo de bacterias pertenecientes al Phylum Bacteroidetes.

Los Bacteroidetes, corresponden a un grupo de bacterias que han sido utilizadas como indicadores de contaminación fecal (Lamendella *et al*., 2006), debido a que se encuentran en el tracto digestivo de animales (Cotta *et al*., 2003). Además, se las encuentra en efluentes de lecherías (McGarbey *et al*., 2004), como también, en suelos de diferentes ambientes (Ailabie *et al*., 2006; Liebner *et al*., 2008) entre ellos, suelos enmendados (Sun *et al*., 2004).

El efecto del purín sobre la comunidad de bacterias fue evidente luego de 15 días de su aplicación, indicando que los Bacteroidetes, requirieron de este tiempo para su activación en los suelos que recibieron las mayores dosis de purín. La estimulación de este grupo de bacterias, se debería, a la utilización del CO disuelto para su crecimiento. El CO disuelto, constituye un factor importante para la actividad y abundancia de los Bacteroidetes en el suelo, debido a que éstos, forman un grupo importante dentro del ciclo del C al utilizar diversos carbohidratos como fuente nutrientes (Wexler, 2007; Liebner *et al*., 2008). La inactivación de los Bacteroidetes observada inmediatamente posterior a la aplicación del purín en el suelo, podría deberse a factores ambientales como es el cambio de pasar de una condición anaeróbica del purín a una aeróbica del suelo, debido a que diversas especies de este grupo de bacterias se desarrollan de preferencia en ambientes con mínimos niveles de oxígeno (Wexler, 2007; Liebner *et al*., 2008). Sin embargo, también podría estar involucrado un efecto de inhibición de estas bacterias, debido a que a varias de ellas se le asocian diversas enzimas, entre ellas, la β-glucosidasa (Wexler, 2007) por lo que no se descarta como se mencionó anteriormente un efecto inhibidor originado por los altos contenidos de N en los suelos enmendados.

Se ha observado, que frente a la presencia de una comunidad microbiana estable del suelo, la aplicación de enmiendas de origen animal no provoca cambios significativos sobre la estructura de las comunidades (Sun *et al*., 2004). Por otra parte se ha observado, que las comunidades son modificadas luego de realizar una aplicación reiterada de la enmienda de a lo menos 5 años, debido a los cambios que provocaría sobre la MO del suelo, la cual requeriría de este tiempo para presentar características de estabilidad y madurez, favoreciendo así, la proliferación de una comunidad capacitada para su utilización (Peacock *et al*., 2001; Sun *et al*., 2004). Con la finalidad de poder observar mayores cambios sobre la comunidad microbiana del suelo producto de la incorporación del purín, se propone la utilización de cebadores específicos y que se relaciones con grupos

bacteriales que actúen en el ciclo del N (Sekuguchi *et al*., 2007), de tal forma de diferenciar grupos de bacterias que pudieran verse afectadas en el suelo por la incorporación de una enmienda rica en C y N como es el purín utilizado en este estudio.

4.2. Adsorción y mecanismos de interacción de atrazina en el suelo y suelo enmendado

4.2.1. Adsorción de atrazina

El estudio de adsorción realizado para atrazina, se inició con una cinética que mostró que atrazina alcanzó su equilibrio de adsorción en S-0, S-100, S-200 y S-300 luego de 12 horas de su aplicación, lo que concuerda con lo informado en la literatura (Kovaios *et al*., 2006). Las isotermas de adsorción de atrazina realizada para el suelo y suelo enmendado con dosis crecientes de purines (S-0, S-100, S-200 y S-300) mostró que todos los adsorbentes presentaron isotermas no-linear tipo L (Nf < 1) (Giles *et al*., 1960) y una distribución de atrazina sólido-solución dependiente de la concentración. Esta respuesta, estaría influenciada por la composición y estructura heterogénea de los suelos, de la enmienda, y por la diversidad de mecanismos de adsorción que se encuentran involucrados (Cox *et al*., 2001; Said-Pullicino *et al*., 2004). Las isotermas observada para la adsorción de atrazina en el suelo y suelos enmendados, sugiere que el adsorbente tiene una baja afinidad por el soluto (atrazina) a una concentración final alta, debido a la saturación de los sitios de adsorción (Said-Pullicino *et al*., 2004; Boivin *et al*., 2005).

El parámetro K_f es una constante empírica del modelo de Freundlich, y expresa la capacidad adsorbente del suelo para un rango de concentración de pesticidas. Para este estudio, atrazina presentó valores de K_f entre 1.19 y 0.96, observándose una menor capacidad de adsorción al aplicar la mayor dosis de purines. En suelos con características diversas en relación al contenido de CO y pH se han observados valores de K_f para atrazina entre 0,11 y 6,3 L kg^{-1} (Celis *et al*., 1998; Spongberg & Ganliang, 2000; Boivin *et al*., 2005; Ling *et al*., 2006). En el suelo y suelos enmendados evaluados, atrazina presentó bajos valores de K_f, comparado a lo observado para otros productos (ej. Trifluralin K_f 46-75), lo que estaría indicando que atrazina presenta una baja capacidad de adsorción debido a la mayor afinidad para permanecer en la solución del suelo y por lo tanto disponible para ser biodegradada o bien lixiviar por el perfil del suelo y contaminar aguas superficiales y

subterráneas (Albarrán *et al*., 2004; Said Pullicino *et al*., 2004; Boivin *et al*., 2005). Al realizar una estimación del potencial de lixiviación de atrazina en S-0, S-100, S-200 y S-300, a través del índice de GUS (log $t_{1/2}$ x (4-log Koc), el cual se basa en la aplicación de una función obtenida a partir de valores de pesticidas detectados en aguas subterráneas, se obtuvo que los suelos evaluados presentaron un índice de GUS de 3,5 (S-0; S-100), 3,7 (S-200) y 3,9 (S-300), lo cual indica que atrazina es un herbicida con un alto potencial de lixiviación (GUS > 2,8) (Gustafson, 1989) y que este potencial aumenta al aplicar altas dosis de purines.

El contenido de MO del suelo ejerce un importante efecto sobre la adsorción de atrazina (Boivin *et al*., 2005). En este estudio, al relacionar la adsorción de atrazina con el contenido de CO del suelo y suelos enmendados, se obtuvo que S-0, S-100 y S-200 presentaron un $K_{f\text{-}OC}$ entre 11,0 y 11,3, mientras que S-300 presentó un $K_{f\text{-}OC}$ de 9,5, lo que indicaría que en S-300 no estaría influyendo el contenido de CO del suelo, si no que algún factor adicional, como por ejemplo, el CO disuelto, el cual en S-300 presentó un contenido 2 veces superior al del suelo control. En relación a lo anterior, Ling *et al*. (2006) encontró luego de una evaluación realizada para 10 suelos, que la adsorción de atrazina aumentó en aquellos que presentaron un menor contendido de CO disuelto (0–62 mg L^{-1}), mientras de la adsorción disminuyó en el suelo cuando a éstos se agregó entre 119 y 256 mg L^{-1} de CO disuelto. Similares resultados fueron observados por Li *et al*. (2005) para chlorpyrifos y 2,4-D en suelos con 78 g kg^{-1} de CO. La menor adsorción de atrazina en suelos con mayor contendido de CO disuelto, podría estar dada por la reacción de complejación entre atrazina y el CO disuelto o por un efecto de competición entre ambos por sitios de adsorción, lo que favorecería que atrazina permanezca en la solución del suelo (Cox *et al*., 2001; Graber *et al*., 2001; Said Pullicino *et al*., 2004). Un mayor contenido de CO disuelto en el suelo, ha provocado una mayor movilidad de herbicidas y por lo tanto un aumento de los residuos lixiviados (atrazina, terbutilazina, 2,4-D) (Cox *et al*., 2001; Graber *et al*., 2001). A través del estudio de desorción realizado para el suelo y suelos enmendados, se obtuvo, que en relación a la cantidad de atrazina adsorbida, el suelo (S-0) y los suelos enmendados S-100 y S-200 presentaron una similar desorción (70-72 %), mientras que la desorción en S-300 fue de un 83%, lo que indicaría, que la aplicación del purín en altas dosis ejerce también un efecto sobre el proceso de desorción de atrazina. Una mayor desorción en suelos enmendados, se ha atribuido a la posible adsorción del CO disuelto en el suelo, lo cual contribuiría a bloquear sitios de mayor energía, limitando así a atrazina a

adsorberse en sitios que requieren fuerzas de retención débiles y por lo tanto de fácil desorción (Celis *et al*., 1998).

La influencia de la aplicación de enmiendas orgánicas, sobre el comportamiento de atrazina en el suelo no es fácil de predecir, especialmente cuando se trata de enmiendas líquidas con alto contenido de CO disuelto (Cox *et al*., 2001). Sin embargo, con este estudio, se puede sugerir que la aplicación de una dosis de purín de 300.000 L ha^{-1} en el campo contribuye a disminuir la adsorción y a aumentar la desorción de atrazina. Con estos resultados se plantea la necesidad de evaluar la aplicación de purines en dosis tan altas como la utilizada en S-300, ya que podría favorecer la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por lixiviación de atrazina.

4.2.2. Mecanismos de interacción de atrazina en el suelo y suelo enmendado

Atrazina interacciona en los constituyentes del suelo a través de diversos mecanismos. Evaluaciones realizadas con el objetivo de conocer los mecanismos a través de los cuales atrazina interacciona con ácidos húmicos del suelo o con el material orgánico en general, han concluido, que los principales mecanismo involucrados son: puentes de hidrógeno y fuerzas Van del Waals (Abate *et al*., 2004), sin embargo, también se ha identificado la participación de interacciones hidrofóbicas, intercambio iónico y el mecanismo de transferencia de carga (Senesi, 1992; Senesi *et al*., 1995; Kah & Brown, 2006). Los métodos espectroscópicos comúnmente utilizados para la determinación del los mecanismos de interacción de atrazina en el suelo son infrarrojo con transformada de fourier, resonancia magnética nuclear, resonancia de spin electrónico y UV-visible (Kah & Brown, 2006).

En este estudio, realizado a través de FT IR, se observó que en S-0 y S-300 se presentaron los mismos desplazamientos de las señales consideradas como patrón. El desplazamiento observado hacia una menor longitud de onda de la señal correspondiente a una deformación NH, se ha atribuido, a una interacción entre atrazina y la MO del suelo, a través de puentes de puentes de hidrógeno (Alayof *et al*., 1997), donde participarían los grupos amino de atrazina con varios grupos carbonilos y carboxílicos del suelo (Senesi *et al*., 1995). Atrazina, al ser una base de carácter débil, tiene la tendencia a presentar una protonación parcial en sus grupos NH en suelos ácidos, lo cual favorecería una adsorción a

través de puentes de hidrógeno (Piccolo *et al*., 1992; Alayof *et al*., 1997; Kulinova *et al*., 2002). Por su parte, el desplazamiento en la localización de la banda asociada con vibraciones del anillo triazínico observado en S-0 y S-300, puede ser explicado por la participación del anillo aromático de atrazina, el cual puede tomar parte en interacciones pi (π) debido a la aceptación de un par de electrones de átomos de O presentes en la MO del suelo. La interacción entre atrazina y la MO del suelo ha sido ampliamente estudiada, pero los mecanismos involucrados no están del todo claros (Kah & Brown, 2006). Piccolo *et al*. (1992) indicó que atrazina es principalmente adsorbida a través del mecanismo de transferencia de carga, lo cual confirma los resultados aquí obtenidos. Si este mecanismo es el que actúa en la adsorción de atrazina en los suelos estudiados, se sugiere que el grupo amino y/o los átomos de N heterocíclicos de s-triazina actuarían como donador-aceptor de electrones de grupos estructurales de ácidos húmicos (Senesi, 1992; Kah & Brown, 2006).

Los mecanismos de interacción de atrazina fueron los mismos en S-0 y S-300, los cuales se caracterizan por presentar diferentes contenidos de CO disuelto, lo que indicaría, que la aplicación de altas dosis de purín en el suelo (S-300) no modifica los mecanismos de interacción de atrazina con la MO del suelo estudiado.

4.3. Atrazina residual y formación de sus productos de degradación

El estudio de incubación realizado por 80 días para S-0, S-100, S-200 y S-300 con aplicación de atrazina en las concentraciones de 1 mg kg^{-1} y 2 mg kg^{-1}, mostró que luego de 60 días había en los suelos un 20% y 10%, respectivamente de atrazina residual. En suelos con aplicación de enmiendas de origen animal (bovino y ave) luego de 60-70 días se encontró un 10% de atrazina (Kadian *et al*., 2008), lo que concuerda con estos resultados. Luego de 80 días, tiempo que duró la incubación no se detectaron residuos de atrazina.

La aplicación en el suelo de diferentes dosis de atrazina no mostró diferencias entre los suelos evaluados. En general, se ha observado que la disipación de atrazina en el suelo no es afectada por la concentración del herbicida, mas aún cuando las diferencias de concentración son bajas (Shaner *et al*., 2007). La persistencia de atrazina en el suelo y suelos enmendados se encontró entre 15 y 19 días al aplicar D-1 y entre 15 y 17 días al aplicar D-2, lo que concuerda con lo observado en suelos que no han recibido aplicaciones previas de atrazina (Shaner & Henry, 2007). El tiempo de vida media obtenido para

atrazina fue similar al de un Andisol, Serie Osorno ($t_{1/2}$ = 17 días), de similares características a las del suelo aquí evaluado (pH 4,7; MO 18%), pero sin aplicación de purines. Sin embargo, a través de evaluaciones realizadas en suelos correspondientes a las series Vilcún, Piedra Negras y Metrenco, caracterizados por presentar un pH aproximado a 5,6, se ha observado que atrazina presenta un tiempo de vida media superior ($t_{1/2}$ entre 23 a 56 días) (Palma *et al*., 2009), indicando que la disipación de atrazina estaría influenciada por las características del suelo (Li *et al*., 2008). La persistencia de atrazina en el suelo es considerada como moderada (35-75 días), sin embargo, ésta puede variar debido a diversos factores, entre ellos, la presencia de microorganismos con la capacidad para degradarla (Topp, 2001). En el suelo, se han aislado diversas especies de hongos y bacterias capacitadas para degradar a atrazina (Bending *et al*., 2002; Smith *et al*., 2005). El suelo evaluado, caracterizado por presentar un alto contenido de MO, estaría albergando una comunidad microbiana activa, considerando que la MO del suelo ejerce influencias significativas sobre la mayor actividad microbiana de los suelos (Zagal *et al*., 2001), lo que probablemente estaría favoreciendo que atrazina presentara una rápida disipación.

La aplicación de enmiendas orgánicas en suelos ejerce diversas influencias sobre los procesos de herbicidas. Se ha observado, que las enmiendas orgánicas pueden aumentar o disminuir la adsorción de pesticidas favoreciendo un aumento o disminución, respectivamente, de la disponibilidad del producto para su degradación, sin embargo, también se ha observado ninguna influencia de la enmienda (Said-Pullicino *et al*., 2004). Por otra parte, se establece que la aplicación de enmiendas orgánicas tienen un efecto de estimulación en los microorganismos del suelo producto de la incorporación a través de la enmienda de nutrientes y microorganismos, lo que favorece la degradación de herbicidas (Houot *et al*., 1998; Briceño *et al*., 20007).

En suelos sin enmendar, con cultivos de maíz y pre-tratados con atrazina se ha observado que ésta presenta una disipación de un 70% luego de 10 días, con una vida media de 5 días, mientras que en suelo que no ha recibido atrazina con anterioridad se ha observado una vida media de 63 días, indicando que existe una acelerada disipación en suelos con repetida aplicación de atrazina, en los cuales existen genes que codifican una enzima involucrada en su mineralización (Marchand *et al*., 2002; Piutti *et al*., 2002). También, se ha observado una rápida disipación de atrazina en suelos cultivados con maíz, previamente tratados con purines. Sin embargo, Biwaneza *et al*. (2003) observó que no había un efecto

de la dosis de aplicación del purín debido a una adaptación de los microorganismos del suelo, el cual estaba siendo enmendado casi por 20 años.

A través del análisis de los residuos de los principales productos de degradación de atrazina, se observó la presencia en el suelo de DEA, DIA e HA, los cuales fueron detectados luego de 20 y 40 días posteriores a la aplicación de atrazina en el suelo, para los 1, 5, 10, 60 y 80 no fue posible detectar residuos para ninguno de los metabolitos evaluados. La no detección de los metabolitos dealquilados (DIA y DEA) y dehalogenado (HA) podría deberse a que las cantidades de estos compuestos son tan bajas que no alcanzan a ser detectadas mediante el método seguido, o a que los metabolitos no serían los principales productos de degradación en este caso (Fuentes *et al*., 2003) y estarían predominando otros productos de degradación, por ejemplo, N-etilamelida y N-isopropilamelida los cuales son acumulados temporalmente durante el proceso de degradación de atrazina (Smith *et al*., 2005), y que para este caso no fueron evaluados.

La ruta metabólica de atrazina considera dos principales vías de degradación, estas son a través de la dealquilación de los grupos alquilamino que dan origen a los productos DEA y DIA, pero que se encuentra asociada a una mineralización lenta de atrazina, y la vía originada a través de una dehalogenación que da origen a HA, la cual se considera como la ruta rápida de mineralización de atrazina (Huout *et al*., 2000). En S-0 al aplicar D-1 y D-2 de atrazina luego de 20 días de incubación, se identificaron los productos HA y DIA, mientras que en los suelos enmendados se identificaron DIA, DEA e HA, lo que indica que la degradación de atrazina es realizada simultáneamente a través de reacciones de dealquilación y dehalogenación, tal como ha sido reportado en diversas investigaciones (Houot *et al*., 1998; Abdelhafid *et al*., 2000; Topp *et al*., 2000; Li *et al*., 2008). A través de los resultados obtenidos, se observó en el día 20 de incubación, que la cantidad de productos de degradación fue mayor en los suelos que recibieron mayores dosis de purines. Se ha observado, que posterior a la aplicación de atrazina en suelos ácidos de zonas húmedas se favorece la formación tanto de los productos dealquilados como dehalogenados (Mahía *et al*., 2008), los cuales a la vez tienden a acumularse en el suelo (Houot *et al*., 2000), específicamente, HA presenta una fuerte adsorción en suelos ácidos, siendo incluso superior a la de atrazina y de los metabolitos DIA y DEA (Fuentes *et al*., 2003; Abate *et al*., 2004). Por su parte, una fácil capacidad de desorción se ha observado para estos productos en suelos agrícolas a pesar de ser evidente la influencia de los ácidos

húmicos del suelo en aumentar su adsorción (Krutz *et al*., 2003; Abate *et al*., 2004). Considerando que la aplicación de purines, influyó sobre la menor adsorción y mayor desorción de atrazina, no se descarta la posibilidad de que la MO incorporada con el purín esté favoreciendo que los metabolitos permanezcan en solución y por lo tanto fueran fácilmente extraídos del suelo enmendado.

Se ha observado, que la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo ejerce un efecto sobre la aceleración de la degradación de atrazina a través de la estimulación de microorganismos con la capacidad para degradarla (Houot *et al*., 1998; Moorman *et al*., 2001). En este estudio, no se observó un efecto del purín sobre la tasa de disipación de atrazina, probablemente debido a que los suelos enmendados, cuando se aplicó atrazina presentaban niveles de actividad biológica casi estables.

La biodegradación es el mecanismo dominante de la fragmentación de atrazina en el suelo y se debe a que diversos hongos y bacterias presentan la capacidad de realizar reacciones de dealquilación y declorinación dando como resultado, la completa mineralización de atrazina (Topp *et al*., 1996; Houot *et al*., 2000; Topp *et al*., 2000; Mahía *et al*., 2008). Atrazina se degrada en el suelo a través de procesos químicos y biológicos (Mahía *et al*., 2007), los cuales dan origen a la formación de metabolitos como los aquí encontrados. A través de la aplicación de D-1 y D-2 de atrazina, se observó al día 20 de incubación, un predominio del metabolito dehalogenado y dealquilado, respectivamente, lo cual podría estar originado por la estimulación de distintos microorganismos, los cuales participaron por distintas rutas en la degradación de atrazina (Smith *et al*., 2005), indicando una posible modificación en la ruta de degradación al aplicar distintas concentraciones de atrazina.

Luego de 40 días de incubación del suelo y suelos enmendados la cantidad de productos de degradación disminuyó en comparación a lo observado para el día 20, debido a que la disponibilidad de atrazina fue menor, y por que la disipación ocurrió de forma lenta comparado a lo observado luego de 10 días de aplicación de atrazina, tiempo en el cual se observó una drástica caída de los residuos de atrazina en el suelo, probablemente debido al aumento de la actividad y cambios en la comunidad de bacterias del suelo.

4.4. Efecto de atrazina sobre los microorganismos del suelo y suelo enmendado

La aplicación de atrazina modificó la actividad microbiana y provocó cambios en la comunidad de bacterias del suelo y del suelo enmendado pre incubado. La respiración microbiana y actividad enzimática mostraron un incremento de sus niveles en relación a los suelos sin aplicación de atrazina. La comunidad de bacterias aumentó, apreciándose la aparición de bandas que variaron en intensidad al aplicar distintas dosis de atrazina en el suelo. Similares resultados se han encontrado para suelos y suelos enmendados con residuos orgánicos, lo que indicaría, que el herbicida ejerce un efecto de estimulación sobre los microorganismos del suelo (Moorman *et al*., 2001; Perucci *et al*., 2000; Seghers *et al*., 2003; Martin-Laurent *et al*., 2004; Ros *et al*., 2006), debido a la utilización de atrazina como fuente de carbono y nitrógeno por microorganismos que pueden vivir en un ambiente que presenta diferentes concentraciones del herbicida (Ros *et al*, 2006). A través de evaluaciones realizadas para atrazina, se ha observado, que los microorganismos del suelo requieren entre 5 y 14 días para comenzar la mineralización de atrazina en el suelo (Barriuso & Houot, 1996; Houot *et al*., 2000). En este estudio, el efecto de estimulación de atrazina sobre los microorganismos del suelo se presentó luego de 10 días de su aplicación, previo a este periodo la actividad y la comunidad no presentaron modificaciones, lo anterior, estaría de acuerdo con lo informado previamente para atrazina, por lo que se puede señalar, que para el suelo evaluado, los microorganismos requirieron de este tiempo para activarse y degradar con mayor rapidez atrazina, para su utilización como fuente de nutrientes (Topp *et al*., 1996; Houot *et al*., 1998).

El efecto de atrazina sobre los microorganismos del suelo se observó a través del aumento de los flujos de C-CO_2 en el suelo y suelos enmendados y por que la comunidad de bacterias presentó cambios a través de la aparición de bacterias pertenecientes al grupo de Proteobacterias. Solo para S-0 fue evidente el aumento de la actividad FDA y β-glucosidasa luego de 10 días de aplicar atrazina, para posteriormente recuperar sus niveles previos. Para S-100, S-200 y S-300 la actividad FDA no fue alterada y la actividad β-glucosidasa aumentó luego de 20 días en S-100 y luego de 10 días en S-200 y S-300. De acuerdo a los resultados obtenidos se confirma la necesidad de que este tipo de evaluaciones considere la realización de análisis biológicos y moleculares debido a que existen diversos factores que se encuentran determinando las respuestas de

microorganismos en un suelo enmendado con aplicación de herbicidas (Seghers *et al*., 2003; Ros *et al*., 2006).

Los resultados obtenidos a través de la respiración microbiana permitieron observar que la evolución de C-CO_2 aumentó cuando se aplicó atrazina en distintas dosis respecto a los tratamientos de suelo que no recibieron atrazina, lo que estaría indicando que atrazina estaría siendo mineralizada (Haney *et al*., 2002; Moreno *et al*., 2007), lo anterior, se confirmaría con la detección en el suelo y suelos enmendados de los productos de degradación HA, DEA y DIA, considerados como precursores de la mineralización de atrazina (Topp *et al*., 2001). Además se observó, que los flujos de C-CO_2 fueron mayores en los suelos cuando se aplicó dosis crecientes de atrazina, lo que estaría influenciado por una mayor disponibilidad del producto para su utilización por los microorganismos del suelo. Con el análisis acumulado de respiración, se observó que sólo el tratamiento S-0 luego de 60 días no mostró la misma tendencia al aplicar la dosis más alta de atrazina, lo que podría estar evidenciando un leve efecto de toxicidad por el aumento de la concentración de Cl^- (Haney *et al*., 2002), pero que es minimizado por la aplicación de la enmienda (Dungan *et al*., 2003b) por lo que en los tratamientos de suelo enmendados la respiración aumentó con la aplicación de dosis crecientes del herbicida.

La respiración microbiana fue mayor en los suelos enmendados, lo anterior estaría indicando que para el periodo de evaluación los niveles de CO disuelto se encontrarían sobre los niveles de S-0 (Rhine *et al*., 2003). A las enmiendas de suelo se les atribuye el efecto de acelerar de degradación de herbicidas (Dungan *et al*., 2003b; Moorman *et al*., 2001; Sánchez *et al*., 2004), por lo que los mayores niveles de respiración observados 5 días antes en el suelo enmendado respecto a S-0 podrían estar indicando que la mineralización de atrazina podría estar siendo acelerada, tal como se ha observado en suelos enmendados con purines de origen bovino (Entry & Emmingham, 1995; Topp *et al*., 1996; Moorman *et al*., 2001). Sin embargo, para este suelo no se observó un efecto de la enmienda sobre la disipación de atrazina. La evolución de C-CO_2 ha sido utilizado como un indicador de la actividad microbiana heterotrófica total (Houot *et al*., 1998), y por ser un método efectivo para estimar la mineralización de herbicidas en el suelo (Haney *et al*., 2002), sin embargo, se considera estrictamente necesario complementar estos resultados a través de evaluaciones que consideren el uso de atrazina marcada C^{14} de tal forma de

asegurar que atrazina esta siendo mineralizada y que no hay otros interferentes como es para este caso la enmienda aplicada al suelo.

El efecto de la aplicación de distintas concentraciones de atrazina sobre la comunidad de bacterias del suelo (S-0) y suelos enmendados (S-100, S-200 y S-300) no presentó efectos sobre la estructura de la comunidad de bacterias, sin embargo, se observó que luego de 10 días se estimularon bacterias pertenecientes al Phylum Proteobacteria. Se han aislado diversas especies de bacterias pertenecientes al Phylum Proteobacteria que participan en la ruta metabólica de atrazina, entre ellas cabe mencionar, *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Rhizobium* sp., y *Agrobacterium tumefaciens,* las cuales actúan en la mineralización de atrazina a través de la ruta de HA a ácido cianúrico (Smith *et al*., 2005). Específicamente, las bacterias identificadas en este estudio pertenecen a la Clase Betaproteobacterias, grupo del cual se han aislado bacterias con capacidad para utilizar a atrazina como fuente de N y de C (Iwasaki *et al*., 2007). Específicamente las bacterias *Methylobacillus flagelatus* y *Nitrosomona eutropha* participan en la ruta de degradación de atrazina trasformándola a HA y ácido cianúrico, respectivamente (KEGG, 2008), mientras que *Variovorax paradoxus* participa en la degradación de ácido cianúrico a urea, este último precursor directo de la mineralización de atrazina y consecuente liberación de amonio. En S-0 y en los tratamientos enmendados se observó la presencia del grupo de bacterias perteneciente a las Gamaproteobacterias, específicamente *Acinetobacter* sp., género de bacterias al cual se le ha atribuido la capacidad de degradar altas dosis de atrazina (Singh *et al*., 2004) transformándola a HA y DEA. Lo anterior explicaría, que representantes de este grupo de bacterias fueran encontradas al aplicar dosis crecientes de atrazina en el suelo.

Efectos negativos de atrazina sobre los microorganismos del suelo se han observado al aplicar concentraciones entre 100 y 1.000 mg kg^{-1} (Moreno *et al*., 2006; Ros *et al*., 2006), las cuales corresponden a concentraciones que no son utilizadas en el campo. En S-0 al aplicar atrazina se estimularon más bacterias que en los tratamientos de suelos que fueron enmendados con purines, lo que se observó a través de la mayor intensidad presentada por las bandas 3 y 4 asociadas a bacterias pertenecientes a la clase Betaproteobacterias. La mayor estimulación en S-0 a la vez se vio reflejada en el aumento de la actividad enzimática FDA y β-glucosidasa, lo que estaría indicando que ambas actividades se relacionan bien con los efectos de los microorganismos del suelo expuesto al herbicida

(Sannino & Gianfreda, 2001; Gianfreda *et al*., 2005). Los niveles de actividad β-glucosidasa observados en S-100, S-200 y S-300 confirmarían que esta enzima es activada luego de 15 días de la aplicación del herbicida en el suelo (Klose *et al*., 2006). Sin embargo, los altos niveles de actividad presentados en el suelo enmendado, los cuales fueron observados hasta el final del periodo de evaluación estarían indicando que existirían otros factores además de la aplicación de atrazina, como por ejemplo, la presencia de bacterias que para este tiempo aún se encontrarían activas, probablemente por la disponibilidad de nutrientes. Lo anterior podría indicar que en S-0 se estimularon bacterias que específicamente están utilizando atrazina como fuente de C, mientras que en S-100, S-200 y S-300 la activación estaría dada por atrazina y por la disponibilidad de CO disuelto, para bacterias como los Bacteroidetes que se incorporaron a través de la enmienda, para este grupo de bacterias se han identificados especies del género *Flavobacterium* que presentan genes involucrados en la degradación de atrazina (Smith & Crowley, 2006).

El uso reiterado de atrazina provoca que ésta sea degradada con mayor facilidad en suelos de uso agrícola con o sin aplicación de enmiendas orgánicas (Huout *et al*., 2000; Ostrofsky *et al*., 2002; Rhine *et al*., 2003). Además se ha observado, el desarrollo de una microflora activa con capacidad para degradar a atrazina (Barriuso & Houot, 1996; Moorman *et al*., 2001). En el suelo estudiado, no existen antecedentes de aplicación previa de atrazina, sin embargo, no se descarta que este herbicida fuera utilizado con anterioridad, considerando que atrazina fue mineralizada y que los microorganismos del suelo fueron estimulados rápidamente luego de la aplicación de distintas concentraciones del herbicida. En suelos cultivados con maíz se ha encontrado que luego de 10 años sin aplicar atrazina fueron necesarias sólo dos aplicaciones para que los microorganismos se activaran y atrazina fuera mineralizada (Piutti *et al*., 2002).

Con estos resultados, se confirma que atrazina presenta un efecto de estimulación sobre los microorganismos del suelo, los cuales presentan la capacidad de degradarla, independiente a que el suelo reciba aplicación de purines de origen bovino, lo que explicaría la ineficiencia de atrazina en el control de malezas en suelos cultivados con maíz.

5. CONCLUSIONES

- La aplicación de dosis crecientes de purín modificó las características químicas del suelo. Sin embargo, luego de 30 días los suelos enmendados presentaron similitud con el suelo control, para este tiempo, sólo la CE, CO disuelto y la $\sum$ de bases presentaron contenidos superiores al suelo sin enmendar.

- La aplicación de purines en el suelo incrementó la actividad respiratoria y actividad FDA de los suelos enmendados, además estimuló a bacterias del Phylum Bacteroidetes.

- Posterior a la aplicación de dosis crecientes de purines, los suelos enmendados tendieron a la estabilización luego de 15 días, siendo evidente a través de la recuperación de los niveles de actividad y parámetros químicos.

- La aplicación de purines en una dosis de 300.000 L ha^{-1} disminuyó la adsorción de atrazina en el suelo, debido al efecto del CO disuelto incorporado con la enmienda. El purín no interfirió sobre los mecanismos de interacción de atrazina con la materia orgánica del suelo. Se identificó que atrazina interacciona con el suelo a través de puentes de hidrógeno y el mecanismo de transferencia de carga.

- Atrazina fue completamente degradada en el suelo y suelo con aplicación de dosis crecientes de purín luego de 80 días de su aplicación. El tiempo de vida media para atrazina se encontró entre 15 y 20 días, no evidenciándose un efecto del purín sobre su disipación.

- Se identificaron los tres principales productos de degradación de atrazina y precursores de su mineralización, luego de 20 días de su aplicación. La aplicación de dosis crecientes de purín aumentó la formación de productos de degradación. Por su parte, al aplicar la dosis de campo de atrazina predominó la formación del metabolito declorinado (HA), mientras que al duplicar la dosis, fue el metabolito dealquilado (DIA).

- La aplicación de distintas dosis de atrazina en el suelo y suelo enmendados luego de 10 días de su aplicación, aumentó la actividad microbiana, actividad enzimática y provocó cambios en la comunidad de bacterias. Se identificó que atrazina estimuló a bacterias pertenecientes al Phylum Proteobacteria, grupo del cual se han aislado diversas especies involucradas en su degradación.

- Es necesario considerar la aplicación de elevadas dosis de purines (300.000 L ha^{-1}) debido a que puede favorecer la lixiviación de atrazina y por lo tanto la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Por su parte, la pérdida de eficiencia de atrazina para el control de malezas en cultivos de maíz, se debe a que el herbicida aplicado en la dosis recomendada en el campo y el doble de ésta es degrado por los microorganismos del suelo.

6. PROYECCIONES

- A través de este estudio, se entregan los primeros antecedentes de la influencia de la aplicación de enmiendas de origen animal sobre los procesos de herbicidas (atrazina) en un suelo Andisol del Sur de Chile. La respuesta observada sobre la influencia de la aplicación de altas dosis de purines, en la disminución de la adsorción de atrazina, como también de la mayor desorción, plantea la necesidad de realizar futuros estudios dirigidos a evaluar la lixiviación de este herbicida en suelos enmendados, ya que altas dosis de purines podrían estar favoreciendo su lixiviación y por lo tanto la contaminación de aguas superficiales y subterráneas.

- Futuras evaluaciones con el uso de atrazina marcada (^{14}C) permitirían conocer claramente los procesos (adsorción, formación de residuos no extractables, mineralización y lixiviación) que este herbicida presenta en el suelo.

- El uso de técnicas moleculares, como PCR-DGGE es una herramienta esencial para entender la respuesta de microorganismos del suelo expuestos a herbicidas. Se propone ampliar este tipo de evaluaciones, a través del aislamiento e identificación de especies bacterianas capacitadas para degradar herbicidas, de tal forma de conocer el metabolismo que pueden presentar en el suelo y su eventual influencia sobre el control de malezas y en el ambiente.

- La futura realización de este tipo de evaluaciones, se plantea necesaria debido a que contribuiría a generar información relevante para la realización de un mejor manejo agronómico respecto al uso de purines y de herbicidas en el suelo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abate, G., Penteado, J., Cuzzi, J., Vitti, G., Lichtig, J., & Masini, J. 2004. Influence of humic acid on adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine onto a clay-rich soil sample. J. Agric. Food Chem. 52: 6747-6754.

Abdelhafid, R., Houot, S., & Barriuso, E. 2000. Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. Soil Biol. Biochem. 32: 389-401.

Adam, G., & Duncan, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using Fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Soil Biol. Biochem. 33: 943-951.

AFIPA. 2006. Manual Fitosanitario. Asociación de Distribuidores de Plaguicidas, Santiago, Chile, 677 pp.

Aislabie, J., Bej, A., Ryburn, J., Lloyd, N., & Wilkins, A. 2005. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. FEMS Microbiol. Ecol. 52: 279-286.

Alayof, E., Yariv, S., & Gerstl, Z. 1997. Thermo-IR-Spectroscopy study of the adsorption of therbutlylazine by soil from the jezreel valley. J. Thermal Anal. 50: 215-227.

Albarrán, A., Celis, R., Hermosin, M., Lopez-Pineiro, A., & Cornejo, J. 2004. Behavior of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. Chemosphere 54: 717–724.

Amlinger, F., Götz, B., Dreher, P., Geszti, J., & Weissteiner, C. 2003. Nitrogen in biowaste and yard waste compost: dynamics of mobilization and availability-a review, Eur. J. Soil Biol. 39: 107–116.

Assefa, B., Schoenau, J., & Grevers, M., 2004. Effects of four annual applications of manure on Black Chernozemic soils. Can. Biosys. Eng. 46: 639-646.

Awasthi, N., Ahuja, R., & Kumar, A. 2000. Factors influencing the degradation of soil applied endosulfan isomers. Soil Biol. Biochem. 32: 1697–1705.

Baéz, M., Rodriguez, M., Lastra, O., Peña, A., De la colina, S., & Sánchez, F. 1996. Residuos de plaguicidas en aguas superficiales de la V región de Chile. Estudio prospectivo. Bol. Soc. Chil. Quim. 41: 271-276.

Balesdenta, J., Chenub, C., & Balabane, M. 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. Soil Tillage Res. 53: 215–230.

Barra, R., Maffioli, G., Notarianni, V., Mazzucheli, P., & Vighi, M. 1999. Patrones de contaminación por herbicidas en aguas superficiales en una cuenca agrícola. Ecotox. Environ. Res. 2: 75–83.

Barraclough, D., Kearney, T., & Croxford, A. 2005. Bound residues: environmental solution or future problem?. Environ. Pollut. 133: 85–90.

Barriuso, E., & Houot, S. 1996. Rapid mineralization of S-triazine ring of atrazina in soils in relation to soil management. Soil Biol. Biochem. 28: 1341-1348.

Bayern CropScience, 2008. Estudio de INE para año agrícola 2008-2009: Crece la superficie sembrada. http://www.bayercropscience.cl/noticias/vernoticia.asp?id=2189. Revisado 01-03-2009.

Bending, G., Friloux, M., & Walker, A. 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. FEMS Microbiol. Lett. 212: 59-63.

Ben-Hur, M., Letey, J., Farmer, W., Williams, C., & Nelson, S. 2003. Soluble and solid organic matter effects on atrazine adsorption in cultivated soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 67:1140–1146.

Bigwaneza, P., Fortin, J., Antoun, H., Ndayegamiye, A., & Côte, D. 2003. Effect of long-term liquid pig manure application on atrazine mineralization in a soil cultivated with maize. Biol. Fertil. Soils 38: 191-199.

Blacksaw, R., Molnar, L., & Larney, F. 2005. Fertilizer, manure and compost effects on weed growth and competition with winter wheat in western Canada. Crop Protect. 24: 971–980.

Boivin, A., Amellal, S., Schiavon, M., & Genuchten, T. 2005. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. Environ. Pollut. 138: 92–99.

Bolan, N., Adriano, D., & Mora, M. Dynamics and environmental significance of dissolved organic matter in soil. In SuperSoil 2004: 3rd Australian New Zealand Soils Conference, 5–9 December 2004, Sydney: Australia, 2004.

Briceño, G., Palma, G., & Durán, N. 2007. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. Crit. Rev. Environ. Sci. Tech. 37:233–271.

Brunetti, G., Senesi, N., & Plaza, C. 2007. Effects of amendment with treated and untreated olive oil mill wastewaters on soil properties, soil humic substances and wheat yield. Geoderma 138:144–152.

Calderón, F., McCarty, G., & Revees, J. 2006. Pyrolisis-MS and FT-IR analysis of fresh and decomposed dairy manure. J. Anal. Appl. Pyrolysis. 76: 14-23.

Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Herrero-Hernández, E., Sánchez-San Roman, F., & Prado, M. 2002. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. J. Chromatogr A 950: 157–166.

Celis, R., Barriuso. E, & Houot, S. 1998. Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. Chemosphere. 37: 1091-1107.

CIREN, 2003. Descripciones de suelos, materiales y símbolos, estudio agrológico X región Vol I, Centro de información de recursos naturales Santiago, Chile.

Chambers, B., Nicholson, N., & Smith, K. 2001. Making better use of livestock manures on grassland. In Managing Livestoch Manures, Vol. 2005, pp. 25. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Chantigny, M., Angers, D., & Rochette, P. 2002. Fate of carbon and nitrogen from animal manure and crop residues in wet and cold soils. Soil Biol. Biochem. 34: 509–517.

China, M., Shashi, & Kumar, S. 2004. Sensitivity analysis of biodegradation of soil applied pesticides using a simulation model. Biochem. Eng. J. 19:119–125.

Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., & Zhang, J. 2007. Soil microbial biomasa, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. Soil Biol. Biochem. 39: 2971-2976.

Clausen, L., & Fabricius, I. 2001. Atrazine, isoproturon, mecoprop, 2,4-D, and bentazone adsorption onto iron oxides. J. Environ. Qual. 30:858-869.

Clausen, L., Fabricius, I., & Madsen, L. 2001. Adsorption of pesticides onto quartz, calcite, kaolinite, and α-alumina, J. Environ. Qual. 30: 846–857.

CONAMA. 1998. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial. Sector criadero de aves. Subsector productores de huevos. Comisión Nacional del Medio Ambiente, Región Metropolitana.

CONAMA, 2004. Guía CONAMA para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas. Comisión Nacional del Medio Ambiente, Chile.

Costa, J., Bedmar, F., Aparicio, V., & Daniel, P. 2004. Pérdidas de atrazina desde un monocultivo de maíz en el sudeste bonaerense. In: I.N.d.T. Agropecuaria (Editor), Buenos Aires.

Cotta, M., Whitehead, T., & Zeltwanger, R. 2003. Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. Environ. Microbiol. 5: 737-745.

Cox, L., Cecchi, A Celis, R., Hermosín, M., Koskinen, W., & Cornejo, J. 2001. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 65: 1688–1695.

Crecchio, C., Curci, M., Rosa, M., Ricciuti, P., & Ruggiero, P. 2001. Molecular approaches to investigate herbicide-induced bacterial community changes in soil microcosms. Biol. Fertil. Soils 33: 460-466.

D'Ascoli, Rao, R., Adamo, M., Renella, P., Landi, R., Rutigliano, L., Terribile, F., & Gianfreda, L. 2006. Impact of river overflowing on trace element contamination of volcanic soils in south Italy: Part II. Soil biological and biochemical properties in relation to trace element speciation. Env. Poll. 144: 317-326.

Debosz, K., Petersen, S., Kure, K., & Ambus, P. 2002. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. Applied Soil Ecol. 19: 237–248.

DeForest, J., Zak, D., Pregitzer, K., & Burton, A. 2004. Atmospheric nitrate deposition and the microbial degradation of cellobiose and vanillin in a northern hardwood forest. Soil Biol. Biochem. 36: 965–971.

DEFRA. 2002. Animal by-products regulation (EC) 1774/2002. Department for Environment, Food & Rural Affairs, London.

Demanet, R., Aguilera, M., & Mora, ML. 1999. Efecto de la aplicación de purines sobre el sistema suelo-planta. Frontera Agrícola 5: 87-94.

De Schrijver, A., & De Mot, R. 1999. Degradation of pesticides by actinomycetes. Crit. Rev. Microbiol. 25: 85–119.

Diez, J., De la Torre, A., Cartagena, M., Carballo, M., Vallejo, A., & Muñoz, M. 2001. Evaluation of the application of pig slurry to an experimental crop using agronomic and ecotoxicological approaches. J. Environ. Qual. 30:2165–2172.

Dousset, S., Mouvet, C, & Schiavon, M. 1994. Sorption of terbuthylazine and atrazine in relation to the physico-chemical properties of three soils. Chemosphere 28: 467-476.

Dumont, J. 2004. Manejo eficiente de purines. In: I.d.I. Agropecuarias (Editor), Informativo Remehue Nº 21, Osorno.

Dungan, R., Gan, J., & Yates, S. 2003a. Accelerated degradation of methyl isothiocyanate in soil. Water Air Soil Pollut. 142: 299–310.

Dungan, R., Ibekwe, A., & Yates, S. 2003b. Effects of propargyl bromide and 1.3-dichloropropene on microbial communities in an organycally amended soil. FEMS Microbiol. Ecol. 43:75–87.

Entry, J., & Emmingham, W. 1995. The influence of dairy manure on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in pasture soils. Can. J. Soil Sci. 75:379-383.

Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E., Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M., Socías-Viciana, M., & Ureña-Amate, M. 2002. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. J. Environ. Qual. 31: 880–888.

Fuentes, C., Lozano, A., Jairo, Y., Guerrero-Dallos, Pérez, L., Olarte, I., & Acevedo, B. 2003. Comportamiento y destino ambiental de la atrazina en el suelo: Detección por HPLC y ^{14}C de las concentraciones ambientales bajo condiciones controladas y de campo en Saldaña-Tolima. Agron. Colombiana 21: 29-48.

Fuentes, B., Bolan, N., Naidu, R., & Mora, M. 2006. Phosphorus in organic waste-soil systems. J.Soil Sc. Plant. Nutr.6: 64–83.

Getenga, Z. 2003. Enhanced mineralization of atrazine in compost-amended soil in laboratory studies, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71: 933–941.

Getenga, Z., & Kengara, F. 2004. Mineralization of glyphosate in compost-amended soil under controlled conditions. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72: 266–275.

Gianfreda, L., Rao, M., Piotrowska, A., Palumbo, G., & Colombo, C. 2005. Soil enzyme activities as is affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practice and organic pollution. Sci. total Env. 341: 265-279.

Giles, C., McEwan, S., Nakhwa, S., & Smith, D. 1960. Studies of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface area in solids. J. Chem. Soc. 3:3973–3993.

Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leiro, M., & Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biol. Biochem. 37: 877–887.

Graber, E., Dror, I., Bercovich, F., & Rosner, M. 2001. Enhanced transport of pesticides in a field trial with treated sewage sludge. Chemosphere 44: 805–811.

Golovlena, L., Aharonson, N., Greenhalagh, R., Sethunathan, N., & Vonk, J. 1990. The role and limitations of microorganisms in the role conversion of xenobióticos. Pure Appl. Chem. 62: 351–364.

Gustafson, I. 1989. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. Environ. Toxicol. Chem. 8:339–357

Haney, R., Senseman, S., Krutz, L., & Hons, F. 2002. Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. Biol. Fertil. Soils 35: 35–40.

Hang, S., Barriuso, E., & Houot, S. 2003. Behavior of ^{14}C-atrazine in Argentinean topsoils under different cropping managements. J. Environ. Qual. 32: 2216-2222.

Hirzel, J., & Walter, I. 2008. Availability of nitrogen, phosphorus and potassium from poultry litter and conventional fertilizers in a volcanic soil cultivated with silage corn. Chilean J. Agric. Res. 68:264-273.

Holland, J. 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. Agric. Ecosyst. Environ. 103: 1–25.

Houot, S., Barriuso, E., & Bergheaud, V. 1998. Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendment. Soil Biol. Biochem. 30: 2147-2157.

Houot, S., Topp, E., Yassir, A., & Soulas, G. 2000. Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils. Soil Biol. Biochem. 32: 615-625.

Huang, X., & Lee, S. 2001. Effects of dissolved organic matter from animal waste effluent on chlorpyrifos sorption by soils. J. Environ. Qual. 30:1258–1265.

Ilani, T., Schulz, E., & Chefetz, B. 2005. Interactions of organic compounds with wastewater dissolved organic matter: role of hydrophobic fractions. J. Environ. Qual. 34:552–562.

INE, 2006. Enfoque estadístico- Producción de leche. Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadísticas.

Iwasaki, A., Takagi, K., Yoshioka, Y., Fujii, K., Kojima, Y., & Harada, N. 2007. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading β-proteobacterium and detection of genes encoding s-triazine-degrading enzymes. Pest. Manag. Sci. 63:261–268.

Jahn, E., Vidal, A., & Soto, P. 2000. Sistema de producción de leche basado en alfalfa (Medicago sativa) y maíz (Zea mays) para la zona centro sur. I Producción de leche. Agric. Téc. 60: 43-51.

Jiang, H., Adams, C., & Koffskey, W. 2005. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography–massspectrometry. J. Chromatogr. A 1064: 219–226.

Kadian, N., Gupta, A., Satya, S., Kumasi R., & Malik, A. 2008. Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. Bioresour. Technol. 99: 4642-4647.

Kah, M., & Brown, C. 2006. Adsorption of ionisable pesticides in soils. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 188:149-217.

Kaiser, M., & Ellerbrock, R. 2005. Functional characterization of soil organic matter fractions different in solubility originating from a long-term field experiment. Geoderma. 127: 196-206.

Kalbitz, K., Schwesig, D., Schmerwitz, J., Kaiser, K., Haumaier, L., Glaser, B., Ellerbrock, R., & Leinweber, P. 2003. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. Soil Biol. Biochem. 35: 1129–1142.

Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H., & Fritsche, F. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [^{14}C] anthracene in soil. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1834–1842.

Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K., & Masao, N. 2002. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 68: 699-704.

KEEG, 2008. Kyoto encyclopedia of genes and genomes. http://www.genome.jp/kegg/ revisado Diciembre 2008.

Klose, S., Acosta-Martínez, V., & Ajwa, H. 2006. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. Soil Biol. Biochem. 38:1243–1254.

Kovaios, I., Paraskeva, C., Koutsoukos, P., & Payatakes. A. 2006. Adsorption of atrazine on soils: Model study. J. Colloid Interface Sci. 299: 88-94.

Krutz, L., Senseman, S., Mcinnes, K., Zuberer, D., & Tierney, D. 2003. Adsorption and desorption of atrazine, desethylatrazine, deisopropylatrazine, and hydroxyatrazine in vegetated filter strip and cultivated soil. J. Agric. Food Chem. 51:7379-7384.

Kulinova, N., & Perminova, I. 2002. Binding of atrazine to humic substances from soil, peat, and coal related to their structure. Environ. Sci. Technol. 36:3720-3724.

Kumar, S., Mukerji, K., & Lal, R. 1996. Molecular aspects of pesticides degradation by microorganisms. Crit. Rev. Microbiol. 22: 1–26.

Lamendella, R., Santo Domingo, J., Oerther, D., Vogel, J., & Stoeckel, D. 2006. Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of Bacteroidetes 16S rRNAgene. FEMS Microbiol. Ecol. 59: 651–660.

Li, K., Cheng, J., Wang, X., Zhou, Y., & Liu, W. 2008. Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. Pedosphere 18: 265-272.

Loos, R., & Niessner, R. 1999. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–ultraviolet detection. J. Chromatogr. A 835: 217–229.

Lesan, H., & Bhandari, A. 2004. Contact-time-dependent atrazine residue formation in surface soils. Water Res. 38: 4435–4445.

Li, K., Xing, B., & Torello, W. 2005. Effects of organic fertilizer derived dissolved organic matter on pesticides sorption and leaching. Environ. Pollut. 134:187-194.

Liebner, S., Harder, J., & Wagner, D. 2008. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia. Int. Microbiol. 11:195-202.

Ling, W., Xu, J., & Gao, Y. 2006. Dissolved organic matter enhances the sorption of atrazine by soil. Biol. Fertil. Soils 42: 418-425.

Mahía, J., Matín, A., Carballas, T., & Díaz-Raviña, M. 2007. Atrazine degradation and enzyme activities in an agricultural soil Ander two tillage systems. Sci. Total Environ. 378: 187-194.

Mahía, J., Martín, A., & Díaz-Raviña, M. 2008. Extractable atrazine and its metabolites in agricultural soils from the template humid zone. Environ. Geochem Health. DOI 10.1007/s10653-008-9149-x.

Marchand, A., Piuttu, S., Lagacherie, B., & Soulas, G. 2002. Atrazine mineralization in bulk soil and maize rhizosphere. Biol. Fertil. Soils 35: 288-292.

Martin-Laurent, F., Cornet, L., Randjard, L., López-Gutiérrez, J., Philippot, L., Schwartz, C., Chaussod, R., Catroux, G., & Soulas, G. 2004. Estimation of atrazine-degrading genetic potential and activity in three French agricultural soils. FEMS Microbiol. Ecol. 48: 425-435.

Martin-Neto, L., Gomes, D., Vaza, C., Crestana, S., & Sposito, G. 2001. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. J. Environ. Qual. 30:520-525.

McGarvey,J., Miller, W., Sanchez, S., & Stanker, L. 2004. Identification of bacterial populations in dairy wastewaters by use of 16S rRNA gene sequences and other genetic markers. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4267–4275.

Moral, R., Moreno-Caselles, J., Perez-Murcia, M., Perez-Espinosa, A., Rufete, B., & Paredes, C. 2005. Characterization of the organic matter pool in manures. Bioresour. Technol. 96: 153–158.

Mordaunt, C., Gevao, B., Jones, K., & Semple, K. 2005. Formation of non-extractable pesticides residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues. Environ. Pollut. 133: 25–34.

Moreno, J., Aliaga, A., Navarro, S., Hernández, T., & García, C. 2007. Effect of atrazine on microbial activity in semiarid soil. Appl. Soil Ecol. 35: 120-127.

Moorman, T., Cowan, J., Arthur , E., & Coats, J. 2001. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. Biol. Fertil. Soils 33: 541–545.

Müller, K., Bach, M., Hartmann, H., Spiteller, M., & Frede, H. 2002. Point- and nonpoint source pesticide contamination in the Zwester Ohm catchment, Germany, J. Environ. Qual. 31: 309–318.

Namkoong, W., Hwang, E., Park, J., & Choi, J. 2002. Bioremediation of diesel contaminated soil with composting. Environ. Pollut. 119: 23–31.

Neeteson, J. 2000. Nitrogen and phosphorus management on Dutch dairy farms: legislation and strategies employed to meet the regulation. Biol. Fertil. Soils 30: 566–572.

ODEPA, 2008. Boletín de la leche año 2007. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y políticas agrarias. Gobierno de Chile. Santiago-Chile. 56 pp.

Ostrofsky, E., Robinson, J., Traina, S., & Tuovinen, O. 2002. Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. Soil Biol. Biochem. 34:1449–1459.

Palma, G., Sánchez, A., Olave, Y., Encina, F., Palma, R., & Barra, R. 2004. Pesticides levels in surfaces waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. Chemosphere 57: 763-770.

Palma, G., Aguilera, P., & Briceño, G. 2009. Degradation of s-triazines (simazine and atrazine) in an Andisol of southern Chile. Chemosphere sometida.

Park, J., Feng, Y., Ji, P., Voice, T., & Boyd, S. 2003. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3288–3298.

Patterson, B., Franzmann, P., Davis, G., Elbers, J., & Zappia, L. 2002. Using polymer mats to biodegrade atrazine in groundwater: laboratory column experiments. J. Contam. Hydrol. 54:195-213.

Peacock, A., Mullen, M., Ringelberg, D., Tyler, D., Hedrick, D., Gale, P., & White, D. 2001. Soil microbial community response to dairy manure or ammonium nitrate applications. Soil Biol. Biochem. 33: 1011-1019.

Peigné, J., & Girardin, P. 2004. Environmental impacts of farm-scale composting practices. Water Air Soil Pollut. 153: 45–68.

Peralta, J. 2005. Recomendaciones técnicas para la gestión ambiental en el manejo de purines de la explotación porcina. Instituto de investigaciones agropecuarias, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Colección libros INIA N° 18, 206 pp.

Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S., Mazzatura, A., & Casucci, C. 2000. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. Biol. Fertil. Soils 32: 17-23.

Perrin-Ganier, C., Schiavon, F., Morel, J. & Schiavon, M. 2001. Effects of sludge-amendment or nutrient addition on the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. Chemosphere 44: 887-92.

Piccolo, A., Celano, C., & De Simona, C. 1992. Interactions of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolysed products. Sci. Total Environ. 118: 403-412.

Piutti, S., Hallet, S., Rousseaux, S., Philippot, L., Soulas, G., & Martin-Laurent, F. 2002. Accelerated mineralization of atrazine in maize rhizosphere soil. Biol. Fertil. Soils 36: 434-441.

Plaza, C., Senesi, N., Polo, A., Brunetti, G., García-Gil, J., & D'Orazio, V. 2003. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. Soil Tillage Res. 74: 179–190.

Plaza, C., Hernández, D., García-Gil, J., & Polo, A. 2004. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. Soil Biol. Biochem. 36: 1577–1585.

Plaza, C., Garcia-Gil, J., & Polo, A. 2007. Microbial activity in pig slurry-amended soils under aerobic incubation. Biodegradation. 18: 159-165.

Rhine, E., Fuhrmann, J., & Radosevich, M. 2003. Microbial community response to atrazine exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. Microb. Ecol. 46: 145-160.

Ros, M., Goberna, M., Moreno, J., Hernandez, T., García, C., Insam, H., & Pascual, J. 2006. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. Appl. Soil Ecol. 34:93-102.

Sadzawka, A., Grez, R., Carrasco, M., & Mora, M. 2006. Método de análisis recomendados para los suelos Chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación Sociedad Chilena de la Ciencia del suelo. 113 pp.

Sadzawka, R., Carrasco, M., Demanet, R., Flores, H., Grez, R., Mora, ML., & Neamen, A. 2007. Métodos de análisis de tejidos vegetales. Segunda edición, Serie actas INIA N° 40. Instituto de investigaciones agropecuarias. Santiago, Chile. 139 pp.

Said-Pullicino, D., Gigliotti, G., & Vella, V. 2004. Environmental fate of triasulfuron in soils amended with municipal waste compost. J. Environ. Qual. 33: 1743–1751.

Salazar, F., Dumont, J., Santana, M., Pain, B., Chadwick, D., & Owen. E. 2003. Prospección del manejo y utilización de purines de lecherías en el Sur de Chile. Arch. Med. Vet. 35:215-225.

Salazar, F., Dumont, J., Chadwick, D., Saldaña, R., & Santana, M. 2007. Characterization of dairy slurry in southern chile farms. Agric. Téc. 67:155-162.

Sánchez, M., Estrada, I., Martinez, O., Martin-Villacorta, J., Aller, A., & Moran, A. 2004. Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. Chemosphere 57: 673–679.

Sánchez-Monedero, M., Mondini, C., Cayuela, M., Roig, A., Conti, M., & Nobili, M. 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomasa in freshly atended soils. Biol. Fertil. Soils 44: 885-890.

Sannino, F., & Gianfreda, L. 2001. Pesticide influence on soil enzymatic activities. 2001. Chemosphere 45: 417-425.

Seghers, D., Verthé, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S., Verstraete, W., & Topp, E. 2003. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. FEMS Microbiol. Ecol. 46: 139-146.

Sekiguchi, H., Kushida, A., & Takenaka, S. 2007. Effects of cattle and green manure on the microbial community structure in upland soil determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Microbes Environ. 22: 327-335.

Selim, H. 2003. Retention and runoff losses of atrazine and metribuzin in soil. J. Environ. Qual. 32:1058–1071.

Semple, K., Morriss, A., & Paton, G. 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. Eur. J. Soil Sci. 54: 809–818.

Senesi, N. 1992. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. Sci. Total Environ. 124: 63-76.

Senesi, N., D'Orazio, V., & Miano, T. 1995. Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylium herbicides on humic acids from hop field soils. Geoderma 66:273–283.

Senesi, N., Loffredo, E., D'Orazio, V., Brunetti, G., Miano, T., & La Cava, P. 2001. Adsorption of pesticides by humic acids from organic amendment and soils. In Humic

Substances and Chemical Contaminants, eds. C. Clapp, M. Hayes, N. Senesi, P. Bloom, and P. Jardine), Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 502.

Shaner, D., & Henry, W. 2007. Field history and dissipation of atrazine and metolachlor in Colorado. J. Environ. Qual. 36:128–134.

Shaner, D., Henry, W., Krutz, L., & Hanson, B. 2007. Rapid assay for detecting enhanced atrazine degradation in soil. Weed Sci. 55: 528-535.

Singh, N. 2003. Organic manure and urea effect on metolachlor transport through packed soil columns. J. Environ. Qual. 32: 1743–1749.

Singh, P., Suri, C., & Swarenjit, C. 2004. Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 317: 697-702.

Sluszny, C., Graber, E., & Gerstl, Z. 1999. Sorption of s-triazine herbicides in organic matter amendment soils: Fresh and incubated systems. Water Air Soil Pollut. 115: 395–410.

Smith, D., Alvey, S., & Crowley, D. 2005. Cooperative catabolic pathway within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. FEMS Microbiol. Ecol. 53: 265-273.

Smith, D., & Crowley, D. 2006. Contribution of ethylamine degrading bacteria to atrazine degradation in soils. FEMS microbiol. Ecol. 58: 271–277.

Sommer, S., & Hutchings, N. 2001. Ammonia emission from field applied manure and its reduction. Eur. J. Agron. 15: 1–15.

Sorensen, S., Bending, G., Jacobsen, C., Walker, A., & Amand, J. 2003. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in an below agricultural Fields. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 1–11.

Spongberg, A., & Ganliang, L. 2000. Adsorption of atrazine and metolachlor in three soils from Blue Creek wetlands, Waterville, Ohio. Sci. Soils 5:1-9.

Sun, H., Deng, S., & Raun, W. 2004. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5868-5874.

Superintendencia de Servicios Sanitarios & Ministerio de Agricultura. 2006. Guía de recomendaciones manejo de purines de lechería. 8 pp.

Tao, S., Guo, L., Wang, X., Liu, X., Ju, T., Dawson, R., Cao, J., Xu, F., & Li, B.2004. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. Sci. Total Environ. 320: 1–9.

Taylor, J., Wilson, B., Mills, M., & Burns, R. 2002. Comparasion of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biol. Biochem. 34: 387-401.

Thomsen, I. 2000. C and N transformation in ^{15}N cross-labelled solid rumiant manure during anaerobic and aerobic storage. Bioresour. Technol. 72: 267-274.

Thorstensen, C., Lode, O., Eklo, O., & Christianse, A. 2001. Sorption of bentazone, dichlorprop, MCPA, and propiconazole in references soils from Norway. J. Environ. Qual. 30: 2046–2052.

Tomlin, C. 1995. Pesticide Manual. A Word Compendium. British Crop Protection Council, UK, 1341 pp.

Topp, E., Tessier, L., & Gregorich, E. 1996. Dairy manure incorporation stimulates rapid atrazine mineralization in an agricultural soil. Can. J. Soil Sci. 76: 403-409.

Topp, E., Mulbry, W., Zhu, H., Nour, S., & Cuppels, D. 2000. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. Isolated from agricultural soils. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3134-3141.

Topp, E. 2001. A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation. Biol. Fertil. Soils 33: 529–534.

Ureña-Amate, M., Socías-Viciana, M., González-Pradas, M., & Saifi, M. 2005. Effects of ionic strength and temperature on adsorption of atrazine by a heat treated kerolite. Chemosphere 59: 69–74.

Van Eerd, L., Hoagland, R., Zablotowicz, R., & Hall, C. 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. Weed Sci. 51: 1-17.

Walker, A. 1987. Evaluation of a simulation model for prediction of chlorsulfuron persistence in soil. Weed Res. 27:143-152.

Wanner, U., Führ, F., & Burauel, P. 2005. Influence of the amendment of corn straw on the degradation behaviour of the fungicide dithianon in soil. Environ. Pollut. 133: 63–70.

Wexler, H. 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin. Microbiol Rev. 20: 593–621.

Worrall, F., Fernández-Pérez, M., Johnson, A., Flores-Céspedes, F., & González- Pradas, E. 2001. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. J. Contam. Hydrol. 49: 241–262.

Zagal, E., Rodríguez, N., Vidal, I., & Quezada, L. 2001. Actividad microbiana en un suelo de origen volcánico bajo distinto manejo agronómico. Agric. Téc. 62: 297-309.