

UCH-FC
Q. Ambiental
C 331



**“DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN EN CONDICIONES
CONTROLADAS Y DEGRADACIÓN EN CONDICIONES AMBIENTALES DE
GLIFOSATO (^{14}C) Y CLORPIRIFOS (^{14}C) EN UN SUELO DE LA VI REGIÓN
MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS ISOTÓPICAS”**

Seminario de Título entregado a la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile
para optar al título de

QUÍMICO AMBIENTAL



VIRGINIA ELIZABETH CARVAJAL SAN MARTÍN

Director Seminario de Título: Ing. Agr. M. Cs. Inés Pino N.

Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia V. Copaja C.

Noviembre, 2007

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN
SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la alumna:

Virginia Elizabeth Carvajal San Martín

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del Seminario de Título como requisito para optar al Título de Químico Ambiental.

COMISIÓN

Director Ing. Agr. M. Cs. Inés Pino N.

Handwritten signature of Inés Pino N. in black ink, written over a dotted line.

Profesor Patrocinante M. Cs. Sylvia V. Copaja C.

Handwritten signature of Sylvia V. Copaja C. in black ink, written over a dotted line.

Corrector M. Cs. Héctor Bravo V.

Handwritten signature of Héctor Bravo V. in blue ink, written over a dotted line.

Corrector Dr. Mauricio Isaacs C.

Handwritten signature of Mauricio Isaacs C. in black ink, written over a dotted line.

A mi Madre y Hermana



**Agradecemos al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el apoyo
brindado a este Seminario de Título a través del proyecto CHI/5/048**





AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas que me acompañaron en esta etapa.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional.

Al equipo de la Sección de Agricultura de la Comisión Chilena de Energía Nuclear. A la Sra. Inés Pino, Sra. Ana María Parada, Sra. Ximena Videla y Sra. Adriana Nario, por su cariñosa acogida, apoyo, entrega de conocimientos y observaciones críticas en la escritura de este trabajo. Igualmente agradezco a Don Marcos Acuña por su valiosa colaboración y buena voluntad.

Al Sr. Herman Zárate por su colaboración y buena disposición.

A los miembros de la comisión evaluadora, profesora Sylvia V. Copaja por su preocupación, orientación y apoyo entregado durante todos estos años. A los profesores Héctor Bravo y Dr. Mauricio Isaacs por su buena disposición y aporte a este trabajo.

Reseña alumna



Datos personales

Nombre: Virginia Elizabeth Carvajal San Martín.

Fecha de nacimiento: 23 Marzo 1983.

Nacionalidad: Chilena.

Estado civil: Soltera.

Dirección: Esmeralda 6035, San Miguel.

Teléfono: 02-5116890 / 8-2159175

e-mail: vicky.carvajal@gmail.com, vickycarvajalsanmartin@hotmail.com

Estudios Enseñanza Básica y Media

1989- 2000: Colegio Santa Cruz. Santiago.

Estudios Superiores

2001- 2007: Licenciatura en Ciencias Ambientales con mención en Química.
Química Ambiental. Facultad de Ciencias .Universidad de Chile.

Experiencia laboral

2005 Agosto - 2006 Enero: Laboratorio de Química de Suelos. Facultad de Ciencias.
Universidad de Chile. Determinación de la Adsorción y Persistencia de Glifosato en el Suelo Chimbarongo.

2006 Octubre- 2007 Marzo: Desarrollo Seminario de Título. Sección de Agricultura. Departamento de Aplicaciones Nucleares. Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

Unidad de Investigación

Estudio de la Adsorción y Persistencia de Glifosato en el Suelo Chimbarongo. 2006.

Investigación

Participación en el VIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Octubre 2006. Universidad Arturo Prat. Iquique. “Relación Adsorción- Biodisponibilidad de Glifosato en Suelos Chilenos”.

Participación en la V Jornada de Física y Química Ambiental. 2007. Viña del Mar, Chile. “Dinámica de Plaguicidas en Suelos”.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.1.1 Problemática Ambiental	1
1.1.2 Uso y Legislación de Plaguicidas en Chile	3
1.2 Evolución de los plaguicidas en el suelo	6
1.2.1 Procesos que determinan la evolución de plaguicidas en el suelo	6
1.2.2 Factores que rigen la evolución de plaguicidas en el suelo	10
1.3 Biodegradación de plaguicidas	15
1.4 Plaguicidas en estudio	17
1.4.1 Glifosato	17
1.4.2 Clorpirifos	21
1.5 Técnicas Isotópicas	24
1.5.1 Técnica de Centelleo Líquido	24
1.6 Hipótesis	26
II. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo General	27
2.2 Objetivos específicos	27



III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Recolección de muestras de suelo	28
3.1.1 Clasificación del Suelo Serie La Lajuela	29
3.1.2 Características físicas y morfológicas del horizonte Ap (0-14 cm) del Suelo Serie La Lajuela	30
3.2 Plaguicidas utilizados en este estudio	31
3.2.1 Glifosato	31
3.2.2 Clorpirifos	32
3.3 Determinación de parámetros del suelo	33
3.3.1 Determinación de la humedad inicial	33
3.3.2 Determinación del pH	33
3.3.3 Determinación de Materia Orgánica	33
3.4 Determinación de la Biodegradación de los plaguicidas Clorpirifos y Glifosato en condiciones controladas	34
3.4.1 Preparación de disoluciones de Glifosato y Clorpirifos	34
3.4.2 Fortificación y homogeneización del suelo	35
3.4.3 Incubación de las muestras de suelo	37
3.4.4 Cuantificación de la biodegradación	38
3.4.5 Determinación del plaguicida residual en el suelo	39
3.4.6 Determinación de residuos ligados y extraíbles del plaguicida	41
3.4.7 Testigos	43



3.5 Determinación de la Degradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos en condiciones ambientales	45
3.5.1 Preparación de disoluciones fortificantes	45
3.5.2 Fortificación y homogeneización del suelo	46
3.5.3 Preparación y ubicación de las muestras de suelo	46
3.5.4 Determinación del plaguicida residual en el suelo	47
3.5.5 Determinación de residuos ligados y extraíbles	48
3.5.6 Testigos	48
3.6 Recuento de microorganismos aeróbicos mesófilos (RAM)	49
3.7 Determinación de los límites de detección y cuantificación del CCL	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1 Parámetros físicos y químicos del suelo Serie La Lajuela	52
4.2 Determinación de la biodegradación del herbicida Glifosato en condiciones controladas	55
4.3 Determinación de la degradación de Glifosato en condiciones ambientales	62
4.4 Comparación entre los ensayos de biodegradación bajo condiciones controladas y degradación bajo condiciones ambientales de Glifosato	64
4.5 Determinación de la biodegradación del insecticida Clorpirifos en condiciones controladas	71



4.6 Determinación de la degradación de Clorpirifos en condiciones ambientales	76
4.7 Comparación entre los ensayos de biodegradación bajo condiciones controladas y degradación bajo condiciones ambientales de Clorpirifos	79
4.8 Comparación de los ensayos de biodegradación en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos	84
4.9 Discusión General	87
V. CONCLUSIONES	91
VI. REFERENCIAS	92
ANEXOS	97
Anexo I. Cálculos Desarrollados	98
Anexo II. Tablas de datos experimentales	102
Anexo III. Etapas de las curvas de Biodegradación	127
Anexo IV. Datos meteorológicos	129
Anexo V. Curvas de calibración del equipo contador de centelleo líquido	130
Anexo VI. Recuentos de Microorganismos Aeróbicos Mesófilos (RAM)	132

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Distribución porcentual de plaguicidas vendidos en Chile, según tipo.	3
Figura 2	Distribución de ventas de plaguicidas (%) según Región	4
Figura 3	Mecanismos que influyen en la evolución de plaguicidas en el suelo	6
Figura 4	Estructura química de Glifosato	17
Figura 5	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos vía del ácido shiquímico	19
Figura 6	Ruta de degradación de Glifosato	20
Figura 7	Estructura química de Clorpirifos	21
Figura 8	Inhibición de la colinesterasa por organofosforados	22
Figura 9	Clorpirifos y sus metabolitos	23
Figura 10	Predio vitícola	28
Figura 11	Localidad de Apalta, VI Región	29
Figura 12	Estructura química de ^{14}C -Glifosato	31
Figura 13	Estructura química ^{14}C -Clorpirifos [Etil-1- ^{14}C]	32
Figura 14	Fortificación del suelo	36
Figura 15	Homogeneizador tipo pantalón	36
Figura 16	Incubación de las muestras de suelo	37

Figura 17	Contador de centelleo líquido (Beckman LS 500 TD)	38
Figura 18	Secado de muestras	39
Figura 19	Cubeta de porcelana con muestra de suelo y manitol	40
Figura 20	Oxidizador Biológico (Biological Oxidizer OX 500)	40
Figura 21	Equipo microondas (CEM-Mars 5)	42
Figura 22	Frasco para suelo testigo	43
Figura 23	Ubicación de las muestras de suelo del ensayo de degradación en condiciones ambientales	47
Figura 24	Ubicación de los Testigos junto a las muestras en el ensayo bajo condiciones ambientales	49
Figura 25	Cultivo de microorganismos	50
Figura 26	Biodegradación de Glifosato en condiciones controladas	55
Figura 27	Glifosato residual (%) en el suelo, bajo condiciones controladas	58
Figura 28	Residuos ligados y extraíbles de Glifosato en condiciones controladas	59
Figura 29	Esquema del Modelo de Compartimentación	60
Figura 30	Glifosato residual (%) en el suelo, bajo condiciones ambientales	62
Figura 31	Residuos ligados y extraíbles de Glifosato bajo condiciones ambientales	63

Figura 32	Reacción del ión fosfato con una superficie de Al hidroxilado	69
Figura 33	Adsorción del Glifosato a las partículas de MO	70
Figura 34	Biodegradación de Clorpirifos en condiciones controladas	71
Figura 35	Clorpirifos residual en el suelo en condiciones controladas	74
Figura 36	Residuos ligados y extraíbles de Clorpirifos en condiciones controladas	75
Figura 37	Clorpirifos residual en el suelo en condiciones ambientales	76
Figura 38	Residuos ligados y extraíbles de Clorpirifos en condiciones ambientales	78

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Propiedades físicas y químicas del Suelo Serie La Lajuela	52
Tabla 2	Curva de evolución de biodegradación de Glifosato bajo condiciones controladas	56
Tabla 3	Biodegradación de Glifosato en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales (%)	64
Tabla 4	Condiciones de humedad, radiación solar y temperatura durante el período de ensayos	66
Tabla 5	Curva de evolución de biodegradación de Clorpirifos bajo condiciones controladas	72
Tabla 6	Biodegradación de Clorpirifos en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales (%)	79
Tabla 7	Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos	85

GLOSARIO

Actividad: Es el número de transformaciones nucleares espontáneas, que tiene lugar en un intervalo de tiempo. Su unidad de medida en el Sistema Internacional es el Becquerel (Bq) y corresponde a una desintegración por segundo (dps) (FAO/IAEA, 2001).

Actividad específica: Número de desintegraciones nucleares por unidad de tiempo y por unidad de masa de un material radiactivo. Se expresa en Bq g^{-1} .

Becquerel (Bq): Siendo la unidad de radioactividad el Bq, su expresión corresponde a una desintegración por segundo.

Curie (Ci): Unidad antigua de medida de radioactividad, su equivalencia es: $1\text{Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{Bq}$.

Capacidad de campo (CC): Cantidad relativamente constante de agua que contiene un suelo saturado después de 48 horas de drenaje. El drenaje ocurre por la transmisión del agua a través de los poros mayores de 0,05 mm de diámetro; sin embargo, la capacidad de campo puede corresponder a poros que varían entre 0,03 y 1 mm de diámetro. El concepto de Capacidad de Campo se aplica únicamente a suelos bien estructurados donde el drenaje del exceso de agua es relativamente rápido (FAO, 2005).

Isótopo radiactivo: Corresponden a elementos que tienen igual número atómico (igual número de protones en su núcleo), pero difieren en peso atómico (diferente número de neutrones en su núcleo). Se caracteriza por tener un núcleo atómico inestable y emitir energía cuando cambia de esta forma a una más estable.

Líquido centelleador: Sustancia química que transforma la energía radiactiva en luz, por medio de la emisión de fotones.

Mesófilos: Microorganismos fundamentalmente compuestos por bacterias y hongos que desarrollan actividad biológica en rangos de temperaturas entre 20-45 °C, bajo condiciones normales de oxígeno.

Partículas beta: partículas que tienen la misma masa que el electrón y la carga eléctrica es de una unidad elemental de signo negativo (megatrón) o de signo positivo (positrón).

RESUMEN

El herbicida Glifosato y el insecticida Clorpirifos, son dos plaguicidas ampliamente utilizados en la agricultura mundial y chilena. Mediante el conocimiento de los procesos de degradación y biodegradación de estos plaguicidas en el suelo es posible predecir, minimizar y/o descartar impactos ambientales asociados a su evolución en los distintos compartimentos ambientales.

En este trabajo se estudió la biodegradación bajo condiciones controladas (20 °C, en oscuridad y contenido de humedad de 75 % de la CC) y la degradación bajo condiciones ambientales (de temperatura y radiación solar, contenido de humedad del suelo variable) de los plaguicidas Glifosato (^{14}C) y Clorpirifos (^{14}C) en un suelo agrícola de la VI Región, mediante el uso de técnicas isotópicas. Para ello, en ambos ensayos, las muestras de suelo fueron fortificadas con una dosis de 0,75 mg de Glifosato por Kg de suelo y otras con 10 mg de Clorpirifos por Kg de suelo. La determinación de la biodegradación de los plaguicidas bajo condiciones controladas se realizó mediante muestreos periódicos durante 99 días de ensayo, a través de la cuantificación del $^{14}\text{CO}_2$ producido por la mineralización de los plaguicidas y de la cuantificación de $^{14}\text{Glifosato}$ y $^{14}\text{Clorpirifos}$ remanente en el suelo, detectados por medio de un Contador de Centelleo Líquido. La degradación de ambos plaguicidas bajo condiciones ambientales fue determinada periódicamente durante 91 días de ensayo, a través de la cuantificación de los residuos de plaguicidas remanentes en el suelo. Conjuntamente, en ambos ensayos se determinó la fracción de residuos extraíbles y ligados al suelo de los plaguicidas.

La biodegradación de Glifosato alcanzó un 50 % bajo condiciones controladas, mientras la degradación bajo condiciones ambientales sólo llegó a un 3 %. Así, la cantidad de residuos de Glifosato remanente en el suelo fue de 61 % y 97 % bajo condiciones controladas y ambientales respectivamente. El Glifosato mostró una fuerte tendencia a ser adsorbido en el Suelo Serie La Lajuela, presentando un 60 % de residuos ligados bajo condiciones controladas y 86 % bajo condiciones ambientales.

Clorpirifos mostró un comportamiento similar al de Glifosato bajo condiciones controladas, dónde un 46 % de Clorpirifos fue biodegradado quedando un 54 % de este remanente en el suelo (25 % ligado y 25 % extraíble). Bajo condiciones ambientales Clorpirifos presentó una mayor degradación, alcanzando un 81 % al final del ensayo, quedando un 19 % de este en el suelo (13 % ligado y 6 % extraíble).

En consecuencia los resultados obtenidos demuestran que los procesos de degradación y en especial de biodegradación de Glifosato y Clorpirifos son fuertemente influenciados por los factores ambientales y las características intrínsecas de cada plaguicida, ya sea directa o indirectamente a través de la adsorción.

Dentro de las ventajas presentadas por la técnica utilizada, se destaca la baja variabilidad entre mediciones y la alta sensibilidad de detección y cuantificación.

ABSTRACT

Glyphosate herbicide and Chlorpyrifos insecticide are two pesticides widely used in the world and in Chilean agriculture. Through the knowledge of degradation and biodegradation processes in soil of both pesticides it is possible to predict, minimize and discard environmental impacts associated with their evolution in different environmental resources.

For this study the biodegradation under control conditions (20 °C, in the dark and moisture of 75 % of the Field Capacity) and the degradation under outdoor conditions (of temperature and solar radiation, variable moisture) of Glyphosate (^{14}C) and Chlorpyrifos (^{14}C) pesticides in an agricultural soil of the VI Region, by means of the use of isotopic techniques, has been examined. In both tests some soil samples were fortified with doses of 0,75 mg/Kg of Glyphosate and some with 10 mg/Kg of Chlorpyrifos. The biodegradation of the pesticides was determined during 99 days of test, by means of the quantification of $^{14}\text{CO}_2$ produced by the mineralization of the pesticides, and by the quantification of the remaining $^{14}\text{Glyphosate}$ and $^{14}\text{Chlorpyrifos}$ using a Liquid Scintillation Counter. The degradation of the pesticides under outdoor conditions was determined during 91 days of test, through the quantification of the remaining pesticides in the soil. Furthermore, in both tests, the labile and non-labile fraction of pesticides was determined.

The biodegradation of Glyphosate under control conditions was 50 % and under outdoor conditions 3%. The amount of Glyphosate remaining in the soil was 61 % under control conditions and 97 % under outdoor conditions. Glyphosate showed a strong tendency to be adsorbed in La Lajuela Series Soil, and presented high amount of residues in the non-labile fraction, 60 % under control conditions and 86 % under outdoor conditions.

Chlorpyrifos showed a similar behavior as Glyphosate under control conditions, 46 % of Chlorpyrifos was biodegraded and 54 % of Chlorpyrifos remained in the soil (25 % in non-labile fraction and 25 % in labile fraction). Chlorpyrifos under outdoor conditions was degraded rapidly, the amount degraded was 81 % after 91 days of test. The amount of Chlorpyrifos that remained in the soil was 19 % (13 % in non-labile fraction and 6 % in labile fraction).

The results obtained have shown that the degradation and biodegradation processes of Glyphosate and Chlorpyrifos are strongly affected by the environmental factors and by the proper characteristics of every pesticide. Both factors also have direct or indirect influence on the adsorption of the pesticides into the soil.

Among the advantages presented by the technique outlined above is the low variability between measurements and the high sensitivity of detection and quantification.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 Problemática Ambiental

A medida que crece la población mundial aumenta también la necesidad de mantener la capacidad de producción del suelo, lo cual ha significado un aumento de las áreas plantadas tanto en productos de consumo humano, como forrajero y forestal. Esta situación ha implicado un mayor uso de plaguicidas, para combatir a organismos vivos, las plagas, que causan efectos no deseados sobre cultivos agrícolas y forestales (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

Frente a las ventajas presentadas por los plaguicidas en el control de plagas y enfermedades, el uso de estos compuestos también lleva consigo serios problemas, ya que los plaguicidas generalmente llegan al suelo, ya sea directa o indirectamente, constituyendo una fuente de contaminación en las zonas donde se emplean durante periodos de tiempo más o menos largos, así como en zonas alejadas del lugar de aplicación, por su movilidad a través del agua o del aire, su acumulación en los seres vivos y su incorporación en la cadena alimenticia (Cornejo J., 2001).

Por esto, es importante conocer la evolución de los plaguicidas en el medio ambiente, es decir, de los procesos que afectan a estos compuestos y de la implicación de los mismos en su persistencia y bioactividad. Con este conocimiento el impacto ambiental del uso de un plaguicida en agricultura podría ser evaluado más exactamente.

Si bien, el estudio de las interacciones entre el suelo y los distintos plaguicidas añadidos al mismo es un tema de gran importancia práctica, es complejo desde un punto de vista científico y requiere grandes esfuerzos en investigación, ya que existe gran variedad en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos y la diversidad de ambientes en que ellos se encuentran y en los cuales los plaguicidas son utilizados.

1.1.2 Uso y Legislación de Plaguicidas en Chile

La actividad agrícola y forestal de Chile ha experimentado un aumento significativo en las últimas décadas, principalmente en cultivos destinados a la exportación, donde los mercados extranjeros determinan las exigencias respecto a la calidad de los productos, debido a esto se ha producido un incremento en el uso de plaguicidas.

Según la “Declaración de ventas de plaguicidas del año 2004” (MINAGRI-SAG, 2006), ese año se vendió un total de 668 productos comerciales de plaguicidas en el país, dentro de los cuales predominan los de tipo insecticidas, acaricidas y rodenticidas (31 %) y fungicidas y bactericidas (31 %) (Figura 1).

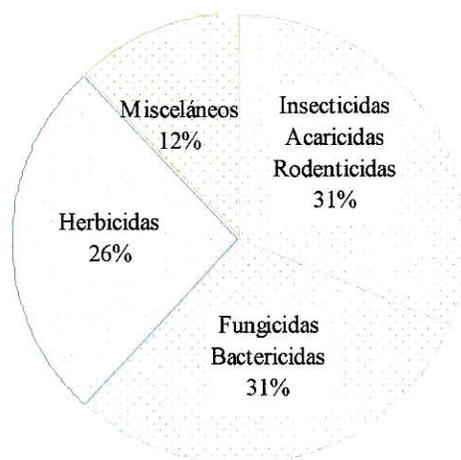


Figura 1. Distribución porcentual de plaguicidas vendidos en Chile, según tipo
(MINAGRI- SAG, 2006)

Las principales regiones donde se venden plaguicidas en todas sus presentaciones (Kg, L, tabletas, placas y dispensador) son las Regiones VI, RM y VII, mientras que las Regiones I, II XI y XII son las que menos utilizan estos productos. Si se consideran los tipos más importantes de unidades (Kilogramos y Litros), las Regiones IV, V, VI, VII y RM suman el 88,7 % del total expendido a nivel nacional (Figura 2).

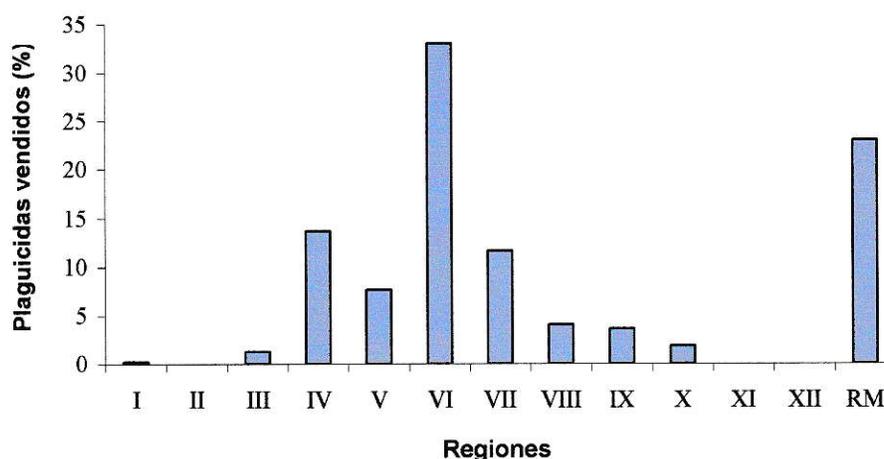


Figura 2. Distribución de ventas de plaguicidas (%) según Región (MINAGRI- SAG, 2006)

El SAG, servicio público dependiente del Ministerio de Agricultura, es el ente responsable del uso agrícola de plaguicidas en Chile. Este fue creado el año 1967 mediante de Ley N° 16.640 o Ley de Reforma Agraria y cuyo ámbito de acción es el sector silvoagropecuario. Entre otras funciones, el SAG, a través del Decreto de Ley N° 3.577 de 1980, tiene amplias facultades para regular y controlar la autorización y post-registro de plaguicidas de uso agrícola en el país.

La normativa vigente sobre plaguicidas de uso agrícola en Chile establece lo siguiente:

- La clasificación toxicológica de los plaguicidas de uso agrícola.
- La obligación de declarar ventas de plaguicidas de uso agrícola.
- La denominación y códigos de formulaciones de plaguicidas de uso agrícola.
- Los criterios y procedimientos para autorizar la internación de plaguicidas de uso agrícola y la autorización para la distribución y comercialización de las formulaciones nacionales, especialmente lo que se refiere a su muestreo y análisis.
- Normas para la evaluación y autorización de plaguicidas, ingreso de patrones analíticos de plaguicidas e ingreso de muestras de plaguicidas para experimentación.
- Requisitos para ejecutar labores de muestreo y análisis de plaguicidas y fertilizantes bajo convenio y los requisitos que deben cumplir las etiquetas de los envases de los plaguicidas de uso agrícola.

1.2 Dinámica de los plaguicidas en el suelo

El estudio de la interacción de los plaguicidas con la fase suelo, sustrato primario y más importante, tiene especial interés, ya que la mayor parte de los mismos reacciona con la superficie de éste, ya sea, directa o indirectamente por lo que se hace necesario conocer su dinámica en este sistema (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

1.2.1 Procesos que determinan la dinámica de plaguicidas en el suelo

Los mecanismos que influyen en la dinámica de los plaguicidas en el suelo son esquematizados en la Figura 3 y descritos a continuación.

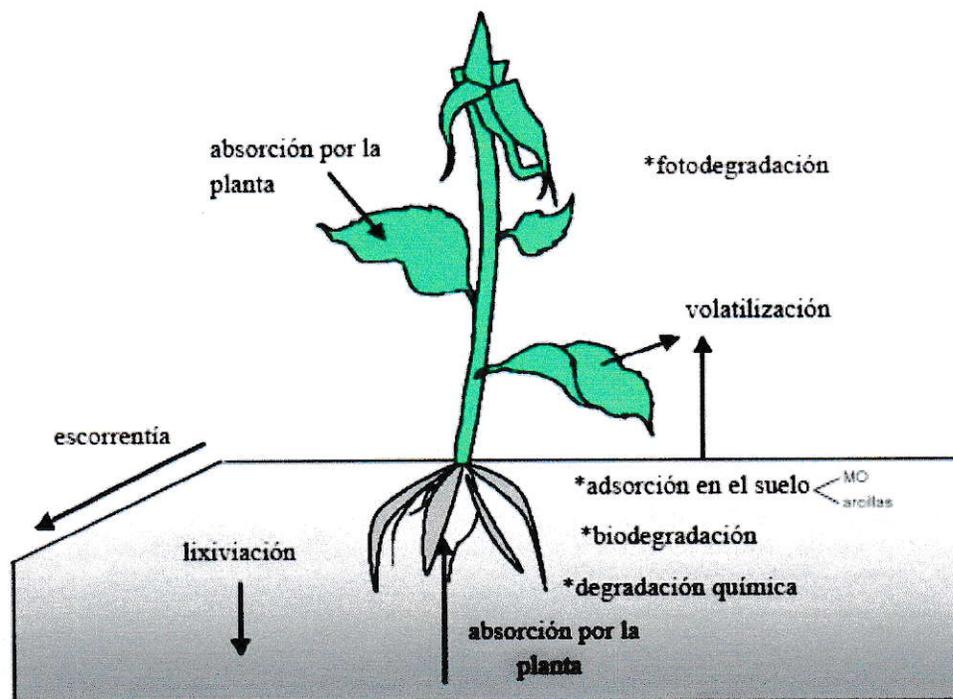


Figura 3. Mecanismos que influyen en la dinámica de plaguicidas en el suelo (adaptado de Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

a. Volatilización. Es la pérdida del compuesto en forma de vapor. Todas las sustancias orgánicas son volátiles en algún grado dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura ambiente (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

b. Lixiviación. Es el proceso por el cual el agua, procedente de lluvia o riego, arrastra o disuelve moléculas de plaguicidas dando lugar a un movimiento vertical en el perfil del suelo. Es el parámetro más importante de evaluación del movimiento de una sustancia en el suelo. El riesgo de contaminación de acuíferos por el movimiento vertical de plaguicidas depende fundamentalmente de la velocidad de transporte a través del suelo tanto como de su adsorción y degradación, ya que ambos procesos disminuyen el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas (Bowman, 1989).

c. Difusión. Es el movimiento de moléculas a causa de un gradiente de concentración. Este movimiento es al azar pero trae como consecuencia el flujo de materiales desde las zonas más concentradas a las menos concentradas. Tanto el coeficiente de difusión, solubilidad y presión de vapor de los plaguicidas, como la temperatura, humedad y porosidad del suelo y el grado de adsorción del compuesto son los principales factores que influyen en este proceso (Navarro y col., 2007).

d. Escorrentía. Es el movimiento de agua sobre superficies inclinadas. La cantidad de plaguicida asociada a este movimiento depende de factores tales como: la pendiente y el tipo de suelo, la cantidad de agua en el suelo, la cantidad y tiempo de riego o lluvias

después del tratamiento, y de la cantidad y solubilidad del plaguicida usado (SAG, 2002).

e. Adsorción. Es un fenómeno de atracción entre una superficie sólida y un líquido o un vapor. Por este mecanismo, las moléculas de plaguicidas pueden ser adsorbidas o retenidas por los coloides presentes en el suelo, arcilla y materia orgánica. Cuando un plaguicida es adsorbido su concentración en la solución del suelo disminuye, estableciéndose un equilibrio entre las concentraciones de materia activa disuelta y adsorbida. El mecanismo de desorción del compuesto dependerá principalmente de la energía de adsorción. Cuanto mayor sea esta energía, más difícil será la desorción del plaguicida a la solución del suelo (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

f. Absorción por la planta. Los plaguicidas pueden penetrar en el sistema radicular de la planta junto al agua absorbida y trasladarse a través del vegetal por los sistemas vasculares xilema y floema. La mayoría de los plaguicidas se degradan una vez que son absorbidos. Sin embargo, algunos residuos de plaguicidas pueden permanecer dentro de la planta o ser devueltos al ambiente cuando la planta se destruye (SAG, 2002).

g. Fotodescomposición. Esta modificación química de los plaguicidas es producida por la interacción de la radiación solar ultravioleta y visible (240-700nm) con los enlaces y afecta especialmente a los grupos -OH, -SH, C=O, -Cl, -N=, así como a dobles enlaces, sobre todo si están conjugados. La fotodescomposición también puede tener lugar a través de sustancias fotorreceptoras (clorofilas, carotenos, y sobre todo compuestos

húmicos) capaces de captar energía lumínica y de traspasarla a los plaguicidas. Los factores principales en este proceso son la presencia de catalizadores fotoquímicos, intensidad y período de exposición a la radiación, aireación y pH del suelo, estructura química y estado físico del plaguicida y su afinidad de adsorción coloidal (Navarro y col., 2007).

h. Degradación química. Es la transformación de los plaguicidas mediante procesos de oxidación, reducción, hidroxilación, dealquilación, rotura de anillos, hidrólisis e hidratación. Todas estas reacciones suelen ser catalizadas en mayor o menor grado por la superficie de las arcillas, óxidos metálicos, iones metálicos, superficies de sustancias húmicas y materiales orgánicos diversos (Cornejo y col., 1983).

i. Degradación microbiana. Los microorganismos del suelo, bacterias, algas y hongos, obtienen alimento y energía para su crecimiento por descomposición de estos compuestos orgánicos sobre todo cuando carecen de otras fuentes (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

En definitiva los mecanismos que afectan a la dinámica de los plaguicidas en los suelos pueden ser agrupados en:

Procesos de transporte	→	volatilización, lixiviación, difusión y escorrentía
Procesos de acumulación	→	adsorción-desorción, absorción por la planta
Procesos de transformación	→	fotodescomposición, degradación química y biodegradación

1.2.2 Factores que rigen la dinámica de plaguicidas en el suelo

Dentro de estos factores se han de considerar tanto a las características del plaguicida como las propiedades del medio en que se encuentra.

1.2.2.1 Características del plaguicida

a. Estructura Química. El carácter químico, determinado fundamentalmente por el número, tipo y posición relativa de los grupos funcionales, afecta los procesos de adsorción. Así, la adsorción será mayor en compuestos que tengan grupos funcionales con átomos con pares de electrones no compartidos (P=O, C=O, NH, etc.) que exalten su capacidad de formación de puentes de hidrógeno y su poder de coordinación a los cationes de cambio. El tamaño y estructura molecular también influyen en la adsorción y en la disposición de las moléculas orgánicas adsorbidas. La facilidad de penetración en la interlámina será mayor cuanto más elevado sea el momento dipolar y más pequeño el tamaño molecular (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

b. Persistencia. Se define como la capacidad de cualquier plaguicida para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio en el cual es transportado o distribuido, durante un período limitado después de su emisión. Los plaguicidas que persisten más tiempo en el ambiente, tienen mayor probabilidad de interactuar con los diversos elementos que conforman los ecosistemas. Si su vida media y su persistencia es

mayor a la frecuencia con la que se aplican, los plaguicidas tienden a acumularse tanto en los suelos como en la biota (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

c. Constante de Henry (K_h). Esta depende de la presión de vapor en estado líquido y de la solubilidad en agua. Representa por tanto el reparto del plaguicida entre la fase líquida del suelo y la atmósfera. Según Jury y col. (1983), la duración y la intensidad del proceso de volatilización en suelos húmedos depende mayoritariamente de la K_h . Basados en los valores de K_h , estos autores definieron tres categorías de plaguicidas:

i) $K_h \gg 2,65 \times 10^5$, plaguicidas altamente volátiles, cuya velocidad de volatilización es más alta después de la aplicación y disminuye a una velocidad que depende de la evaporación del agua del suelo.

ii) Plaguicidas moderadamente volátiles con valores intermedios de K_h .

iii) $K_h \ll 2,65 \times 10^5$, plaguicidas ligeramente volátiles, que tienden a acumularse en la superficie del suelo y a medida que se evapora el agua del suelo, aumenta la volatilización con el tiempo, y disminuye lentamente si el agua no se evapora.

d. Coefficiente de reparto. Se define como la relación de concentraciones de cualquier especie molecular entre dos fases. En el caso de plaguicidas se emplea el coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow}), que mide la hidrofobicidad (o la lipoafinidad) de un compuesto. K_{ow} , proporciona una estimación de la posible distribución del contaminante entre el suelo (materia orgánica) y el agua (Racke, 1993).

e. Solubilidad. Factor trascendente por dos razones fundamentales:

i. La fase líquida del suelo es una fase acuosa, lo que condiciona la dinámica del plaguicida asociado a dicha fase.

ii. Los plaguicidas con mayor carácter contaminante son poco solubles en agua.

La solubilidad está relacionada con la adsorción y persistencia. Así, si el coeficiente de adsorción del plaguicida es pequeño, indica una alta movilidad de un plaguicida soluble (Cornejo, 2001).

f. Coefficiente de Adsorción de carbono orgánico (K_{oc}). Es una medida de la tendencia de un plaguicida a ser adsorbido por la materia orgánica del suelo (Racke, 1993). El K_{oc} es específico para cada plaguicida e independiente de las propiedades del suelo (Cornejo, 2001).

g. Formulación. La persistencia y biodisponibilidad pueden verse influidas según sea la presentación del producto en emulsión, polvo, granulada, etc. (Navarro y col., 2007).

h. pK_a, pK_b. Parámetros significativos para los plaguicidas que se comportan como ácidos y como bases débiles, ya que determinan el rango de pH en que se comportan como especies neutras o ionizadas (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

1.2.2.2 Características del suelo

a. Coloides del suelo. Los suelos ricos en coloides (arcillas, humus) adsorben más fuertemente a los plaguicidas y dentro de estos a los orgánicos con más intensidad que a los minerales. Las arcillas constituyen la fracción coloidal inorgánica del suelo y su carga eléctrica superficial les permite adherirse a compuestos con carga de signo contrario. De ahí radica su importancia en los fenómenos de adsorción de las sustancias que llegan al suelo. La materia orgánica es otro componente de la fracción coloidal del suelo, muy importante también en los procesos de adsorción. En la mayor parte de los suelos las sustancias húmicas constituyen el principal componente de la materia orgánica del suelo, la capacidad de cambio de cationes de las sustancias húmicas es más alta que la de los minerales de la arcilla, siendo del orden de 200 a 400 meq * 100 g⁻¹ y tienen además una gran área superficial, 500-800 m² g⁻¹ (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

b. pH. El pH de la solución del suelo determina la carga superficial de los componentes con carga variable del suelo y la ionización de los plaguicidas con propiedades ácidas o básicas. Así, distintos trabajos han puesto de manifiesto la importancia del pH en los procesos adsorción, hidrólisis y biodegradación (Eberbach, 1998; Racke y col. 1996; Singh y col. 2003).

c. Estructura y textura. Las estructuras granulares presentan una elevada porosidad y favorecen la volatilización, oxidación y transporte del plaguicida; similares resultados se producen en suelos de textura gruesa (Sánchez M. y Sánchez C., 1984).

d. Microorganismos. Los microorganismos ejercen un papel fundamental en la degradación de los plaguicidas en el suelo, pero de manera más importante en los órganofosforados (Racke, 1993).

e. Temperatura. La volatilización de los plaguicidas se incrementa con la temperatura (Navarro y col. 2007), así como la desorción (Tubert y Talanquer, 1997).

f. Humedad. La humedad favorece la degradación de los plaguicidas, ya que provoca una menor adsorción inicial del plaguicida y favorece la actividad microbiana. Además aumenta la difusión del plaguicida (Navarro y col., 2007).

1.3 Biodegradación de plaguicidas

Este estudio se concentra en el proceso biodegradación, ya que la acción de los microorganismos del suelo sobre los plaguicidas es uno de los mecanismos de descomposición más importante.

Este proceso natural no sólo permite la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su acumulación, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas).

Así, los procesos microbiológicos de degradación, son los sistemas de degradación más activos y versátiles, ya que son siempre catalizados por enzimas y aportan energía a través de los procesos metabólicos. Los tipos más relevantes son:

Reacciones oxidativas. Destaca el complejo MFO (Mixed Function Oxidase) que convierte xenobióticos liposolubles en hidrosolubles. Uno de sus componentes, el citocromo P450, aparece en invertebrados y microorganismos.

Reacciones de reducción. Comprenden la reducción de grupos cetónicos y nitros hasta hidroxilos y aminas respectivamente.

Reacciones de hidrólisis. Catalizadas por las hidrolasas, afectan a reacciones como la hidrólisis de ésteres aromáticos o alifáticos, amidas, etc.

Ruptura de anillos aromáticos. Estos procesos requieren que el anillo contenga al menos dos grupos hidroxilo en posición orto- o para- que pueden ser introducidos a su vez por oxidasas.

Los factores que influyen en la actividad biológica sobre los plaguicidas son: tipo de suelo, contenido de MO, pH, grado de hidratación, nivel de oxígeno, temperatura y tipo y número de microorganismos presentes. En general la actividad microbiológica es mayor en suelos cálidos, húmedos, oxigenados con alto contenido de MO (Bridges y Dempsey, 1998).

La estructura química del plaguicida también es un factor determinante en la actividad microbiana. Por ejemplo, los compuestos órganofosforados y carbamatos son más rápidamente metabolizados por los microorganismos bajo condiciones aeróbicas que los insecticidas órganoclorados (Bridges y Dempsey, 1998).

1.4 Plaguicidas en estudio

1.4.1 Glifosato

El herbicida Glifosato apareció en el mercado a principio de los años setenta (1972-1974), actualmente es el más popular y el más vendido en el mundo y se ha establecido como líder de los herbicidas de postemergencia, sistémicos y no-selectivos para el control de malezas anuales, bienales y perennes (herbáceas y leñosas) (Kogan, 2003).

El Glifosato es un ácido débil compuesto mitad de glicina y mitad de fosfometil (Figura 4). Químicamente y físicamente, el Glifosato se parece mucho a sustancias que se encuentran en la naturaleza, no tiene una gran persistencia biológica, no es bioacumulable ni se biomagnifica a lo largo de la cadena alimenticia (Solomon y col., 2005).

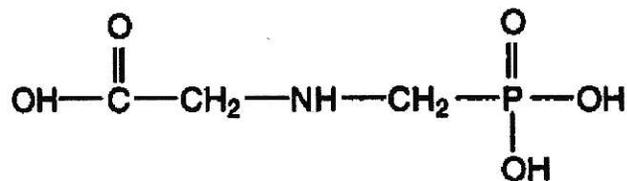


Figura 4. Estructura química de Glifosato (ácido N-fosfono-metil-glicina)

Este herbicida se caracteriza por presentar muy baja o casi nula actividad en el suelo. Además presenta gran movilidad dentro de la planta, principalmente en el floema, y baja toxicidad a mamíferos (Kogan, 2003).

El mecanismo de acción del herbicida Glifosato consiste en la inhibición de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), lo cual altera la producción de proteínas y previene la formación de compuestos secundarios como la lignina.

El Glifosato ejerce su acción (sitio primario de acción) inhibiendo la enzima 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual cataliza la reacción entre shiquimato-3-fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato (EPSP) y fósforo inorgánico (Pi). Glifosato actúa como un inhibidor competitivo de EPSPS con respecto a PEP. Pero como un inhibidor competitivo respecto a S3P. Mecánicamente, S3P forma un complejo con EPSPS al cual Glifosato se acopla antes que PEP. Así, se ha considerado que Glifosato participa como un estado análogo de transición de PEP. Glifosato interactúa con la región de sitio activo de la enzima, que une al grupo fosfato del PEP (Figura 5) (Kogan, 2003).

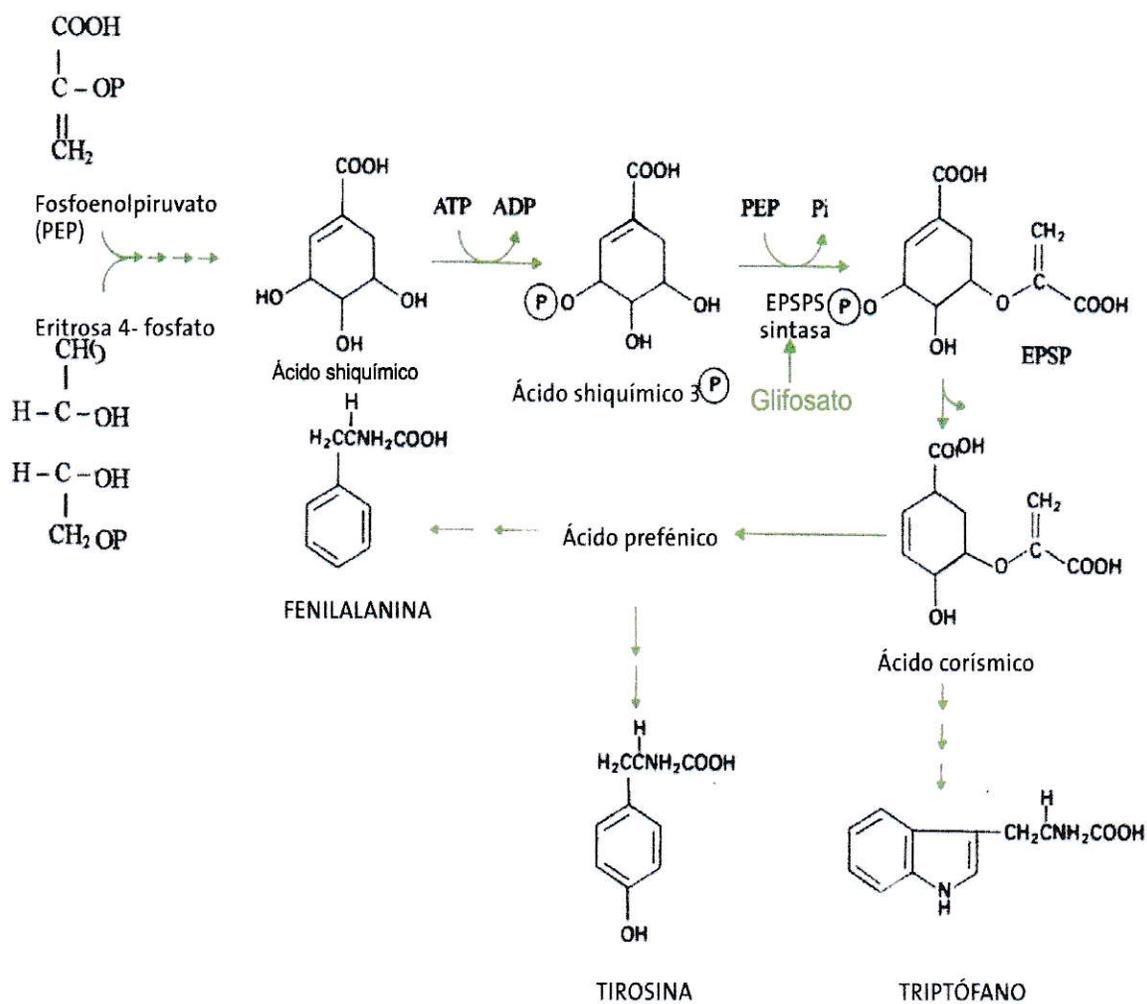


Figura 5. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos vía del ácido shiquímico. Glifosato actúa como inhibidor competitivo de la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintasa), interactuando con el sitio activo de la enzima que se uniría al grupo fosfato del PEP (Kogan, 2003).

Giesy y col. (2000) determinaron un promedio de tiempo de vida media de Glifosato, basado en 47 estudios de suelos agrícolas y forestales en diversas localidades geográficas, de 32 días. La degradación de glifosato en suelos se debe principalmente a la acción de microorganismos, siendo su principal metabolito el ácido aminometil fosfónico (AMPA) (Figura 6).

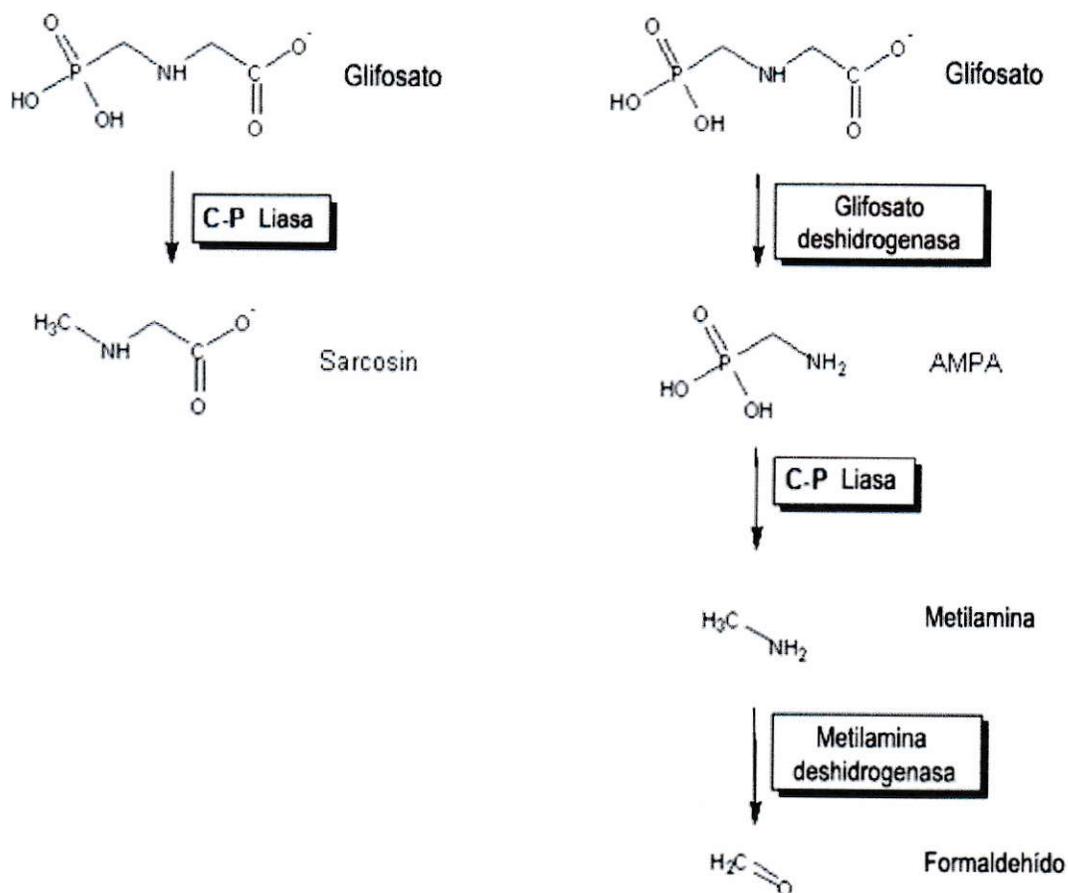


Figura 6. Ruta de degradación de Glifosato (Wiersema y col., 2006).

1.4.2 Clorpirifos

Clorpirifos (Figura 7), es un insecticida órganofosforado aplicado al follaje y de amplio espectro de acción. Clorpirifos controla eficazmente insectos masticadores y chupadores como escamas, conchuelas, pulgones y larvas de lepidópteros (AFIPA, 1999).

Según la Declaración de ventas de plaguicidas del año 2004 (MINAGRI-SAG, 2006), Clorpirifos es uno de los ingredientes activos de insecticidas mas vendidos en nuestro país, alcanzando las 12.837,3 Toneladas vendidas (19,81%), de las cuales 5.154 corresponden a la VI Región.

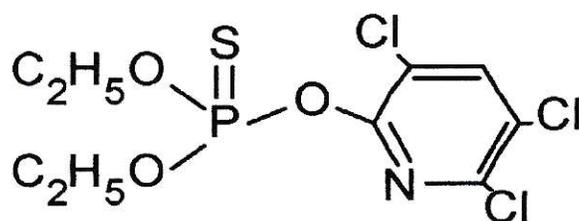


Figura 7. Estructura química de Clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotiato]

El mecanismo de acción del insecticida Clorpirifos consiste en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, enzima responsable de la eliminación de acetilcolina. Con su inhibición, se ve alterado el funcionamiento normal del impulso nervioso (Racke, 1993).

La inactivación se produce cuando la acetilcolinesterasa interacciona con los compuestos órganofosforados mediante un grupo $-OH$ de un resto de serina, formando un enlace $P=O$, el cual no es hidrolizable (Figura 8).

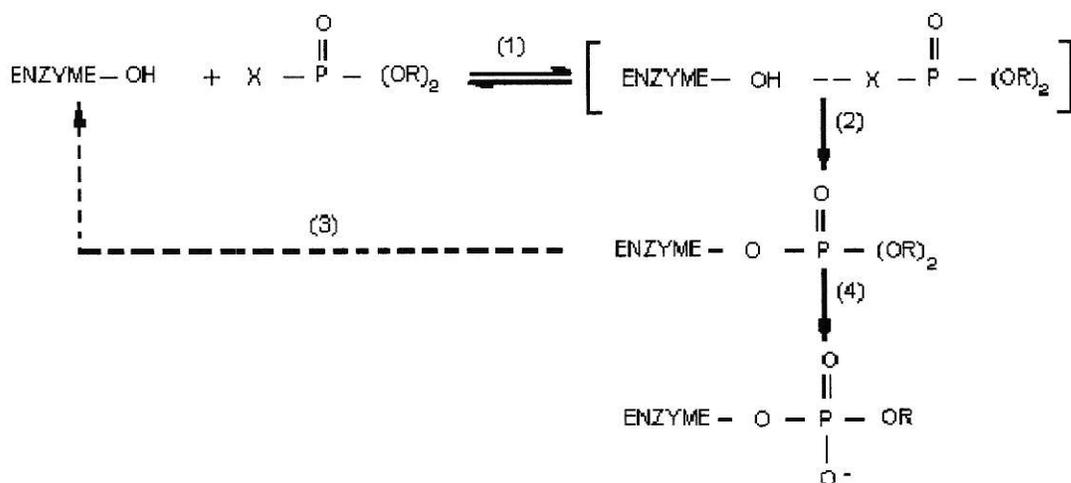


Figura 8. Inhibición de la colinesterasa por órganofosforados.

(1) Formación del complejo. (2) La parte ácido del órganofosforado se une covalentemente a la serina, del centro activo de la enzima. (3) Una molécula de agua libera la parte ácida del órganofosforado y la enzima es reactivada; este proceso es muy largo e irreversible (4).

Para Clorpirifos se han registrado tiempos de vida media en un rango de 10 a 120 días, dependiendo de la formulación del producto, del contenido de carbono orgánico, temperatura, humedad y pH del suelo. Su degradación se debe tanto a procesos bióticos como abióticos. En ambos casos el principal metabolito originado es el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) (Figura 9) (Racke, 1993).

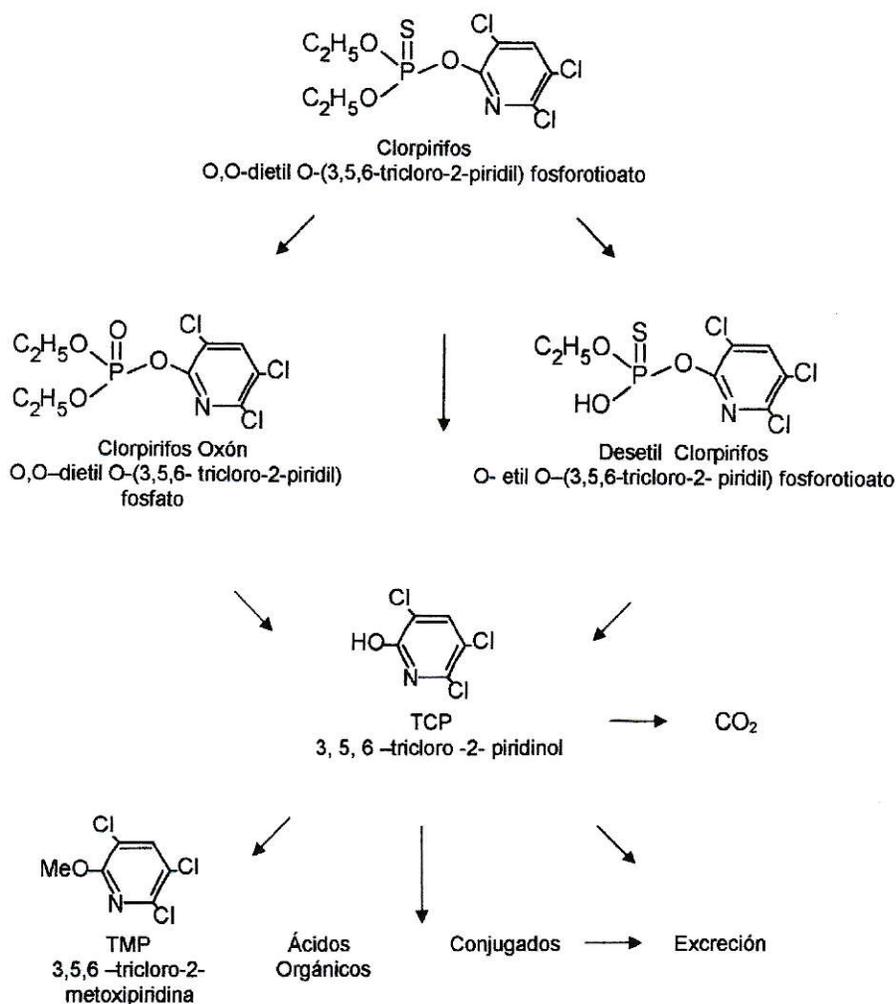


Figura 9. Clorpirifos y sus metabolitos (Racke, 1993)

1.5 Técnicas Isotópicas

Los isótopos radiactivos son extremadamente útiles en las disciplinas científicas, ya que estos pueden sustituir al mismo elemento no radiactivo en formulaciones químicas. Este compuesto radiactivo resulta ser fácilmente detectable y químicamente idéntico al material original.

Así, la aplicación de técnicas isotópicas permite evaluar la trayectoria del plaguicida en diversos sistemas ambientales, identificando y cuantificando de manera precisa los pesticidas en concentraciones muy bajas. Esta técnica emplea como trazadores isótopos naturales y radiactivos. Su uso permite realizar estudios del comportamiento y destino final de los plaguicidas.

1.5.1 Técnica de Centelleo Líquido

La técnica se basa en que ciertos compuestos orgánicos emiten luz fluorescente al ser bombardeados por una radiación nuclear. La fluorescencia o fotones emitidos por estos compuestos orgánicos (líquidos centelleadores), pueden ser convertidos en un flujo de electrones por medio de un tubo fotomultiplicador y posteriormente medidos como pulso eléctrico (Skoog y Leary, 1991).

El uso de un líquido centelleador permite medir muestras de emisores Beta de baja energía como ^3H y ^{14}C , casi sin absorción ni autoabsorción (Alay y col. 2006). Esta

técnica presenta una alta eficiencia de conteo del orden de 90 % para ^{14}C y más de un 60 % para ^3H .

El Contador de Centelleo Líquido (CCL) consiste en un tubo fotomultiplicador en contacto óptico con un vial de vidrio. El vial contiene líquido centelleador orgánico y la muestra a ser medida disuelta en un solvente apropiado. El sistema completo es totalmente cerrado para protegerlo de los fotones luminosos.

El principal problema del Centelleo líquido consiste en el Quenching, que es un proceso que interfiere ya sea con la producción de luz en el líquido centelleador (quenching químico) o con la transmisión de luz hacia el tubo fotomultiplicador (quenching de color). Así, el quenching químico es causado por interferencias de sustancias disueltas principalmente moléculas con grupos polares como NH_2 -, SH -, CHCl involucrando la transferencia de energía desde la radiación emitida por el fósforo; por su parte el quenching de color se debe a la absorción de parte de la luz por sustancias coloreadas lo que produce una pérdida de la energía de la radiación transmitida (Alay y col. 2006).

Estas interferencias son corregidas determinando la eficiencia de conteo del equipo CCL. Para esto se agregan cantidades crecientes de interferentes químicos (por ejemplo CCl_4), a muestras que contienen líquido centelleador y el radioisótopo a medir. Con ello el instrumento calcula un factor de corrección, para cantidades de interferentes específico en una muestra y asigna un % de eficiencia de conteo a cada medición (Pino y col., 1992).

1.6 Hipótesis

Los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos marcados con ^{14}C pueden ser identificados y cuantificados en muestras de suelo, utilizando técnicas isotópicas, y con ello, determinar la degradación de estos bajo condiciones controladas y ambientales.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar y cuantificar la biodegradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos en un suelo agrícola de la VI Región, mediante técnicas isotópicas.

2.2 Objetivos específicos

- i) Determinar algunas propiedades del suelo en estudio: humedad, pH y materia orgánica (MO).
- ii) Aplicar técnicas isotópicas, utilizando como trazador ^{14}C , para determinar la degradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos.
- iii) Analizar y comparar la degradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos en condiciones controladas y ambientales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron recolectadas en un predio vitícola (Figura 10) de la VI Región, ubicado en la localidad de Apalta, próxima a la comuna de Santa Cruz, provincia de Colchagua (Figura 11).

Las muestras de suelo recolectadas corresponden al horizonte Ap de la Serie de Suelos La Lajuela (CIREN- Chile, 1996).



Figura 10. Predio vitícola.

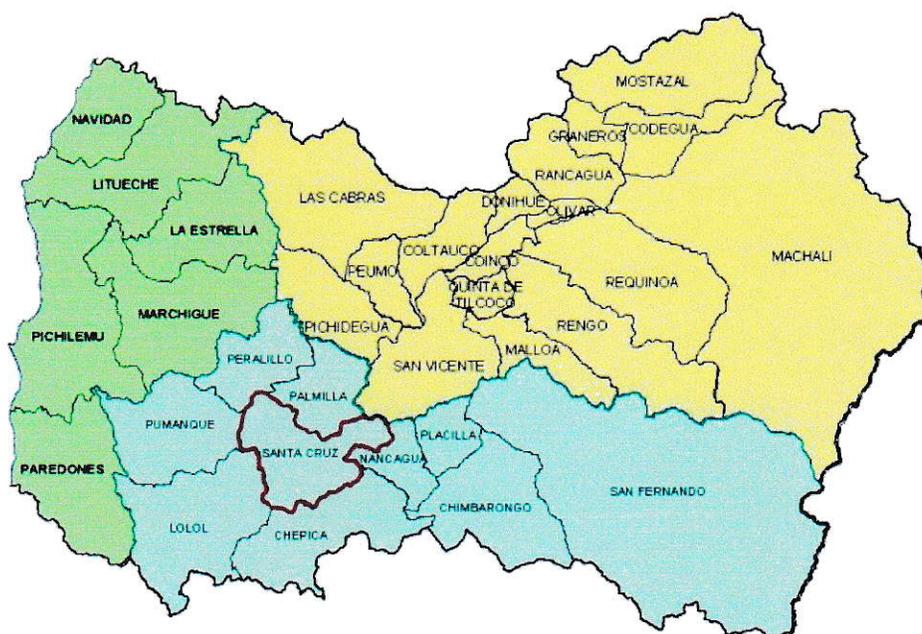


Figura 11. Localidad de Apalta, ubicada a 3 Km de la comuna de Santa Cruz,
VI Región.

3.1.1 Clasificación del Suelo Serie La Lajueta

La Serie de Suelos La Lajueta, es miembro de la Familia franca fina, mixta, térmica de los Ultic Haploxeralfs, formada a partir de material generador andesítico, topografía de cerro, texturas que varían entre franco arcillo arenosa en superficie, a arcillosa en profundidad, estructura de bloques subangulares hasta los 50 cm y macizo desde los 50 cm en profundidad (CIREN-Chile, 1996). El clima es xérico, la precipitación anual se encuentra entre los 750 y los 900 mm, y la temperatura media anual es de 14,5° C (CIREN-Chile, 1996).

3.1.2 Características físicas y morfológicas del horizonte Ap (0-14 cm)

Este horizonte es de color pardo muy oscuro (7,5YR 2,5/2) en húmedo, franco arenosa, estructura de bloques subangulares finos fuertes, ligeramente adhesivo y ligeramente plástico, raíces finas y muy finas abundantes, poros finos abundantes. Límite lineal abrupto (Comunicación personal, W. Luzio, 2006).

Las muestras recolectadas se llevaron al laboratorio, se secaron al aire y se tamizaron a <math><2\text{ mm}</math>.

3.2 Plaguicidas utilizados en este estudio

3.2.1 Glifosato

Para este estudio se utilizó el herbicida Glifosato comercial, de calidad analítica y pureza 98 % (Chem Service Inc, USA) solubilidad 12 g L^{-1} (European Comisión, 2002).

Además, se utilizó Glifosato marcado con ^{14}C en el grupo fosfonometil, con una actividad total de 37 MBq, actividad específica $2,213 \text{ MBq mg}^{-1}$ ($374 \text{ MBq mmol}^{-1}$) y pureza superior al 95 % (Institute of isotopes Co, Ltd Hungary) (Figura 12).

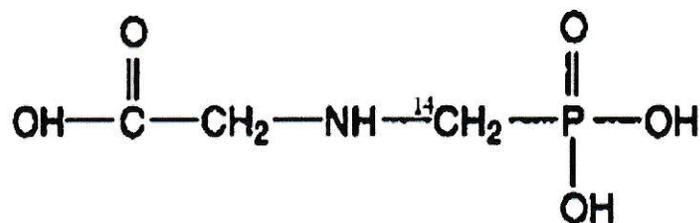


Figura 12. Estructura química de ^{14}C -Glifosato en el grupo fosfonometil.

3.2.2 Clorpirifos

Se utilizó insecticida Clorpirifos comercial, de calidad analítica y pureza de 99 %, solubilidad $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) (Chem Service Inc, USA).

También se utilizó Clorpirifos marcado con ^{14}C en el grupo etilo [Etil-1- ^{14}C], con una actividad total de $9,25 \text{ MBq}$, actividad específica $13,43 \text{ MBq g}^{-1}$ (630 MBq mol^{-1}) y pureza superior al 95 % (Instute of isotopes Co, Ltd Hungary) (Figura 13).

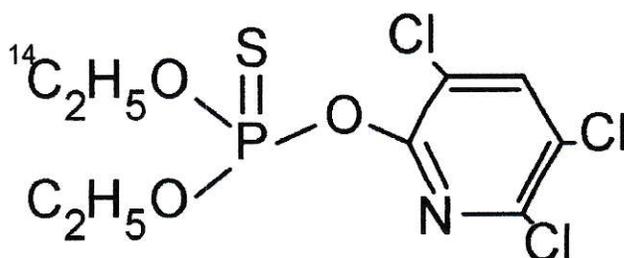


Figura 13. Estructura química ^{14}C -Clorpirifos [Etil-1- ^{14}C].

3.3 Determinación de parámetros del suelo

3.3.1 Determinación de la humedad inicial

Se masó en balanza analítica (Industry) en duplicado, entre 10-20 g (exactitud 0,01 g) de suelo seco al aire en un recipiente de metal previamente tarado. Las muestras de suelo se secaron a estufa (Kottermann modelo 2771) durante 24 h a 105 ± 5 °C. Luego, las muestras se retiraron de la estufa, se dejaron enfriar y se masaron. Finalmente se determinó el contenido de agua (Sadzawka, 1998).

3.3.2 Determinación del pH

Se preparó una suspensión de suelo agua desionizada en una proporción suelo: solución de 1: 2,5 y en el sobrenadante se determinó el valor del pH con un medidor de pH (HANNA INSTRUMENT) (Sadsawka, 1998).

3.3.3 Determinación de Materia Orgánica

La determinación de la materia orgánica (MO) se realizó de acuerdo al procedimiento de Walkley y Black, modificado (Sadzawka, 1998), el cual corresponde a una combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico. Después de la reacción se determinó colorimétricamente la concentración de carbono orgánico mediante un espectrofotómetro UV-Vis (UV 2, UNICAM).

3.4 Determinación de la Biodegradación de los plaguicidas Clorpirifos y Glifosato en condiciones controladas

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 2002), el cuál consiste en la incubación, a 20 ± 1 °C y oscuridad completa, de una solución de NaOH junto con las muestras de suelo fortificadas con plaguicida marcado con ^{14}C . La solución de NaOH captura el CO_2 liberado por la degradación de la materia orgánica y del plaguicida.

3.4.1 Preparación de disoluciones de Glifosato y Clorpirifos

Se preparó dos disoluciones, basadas en la dosis de aplicación comercial de cada plaguicida. Cada disolución es una mezcla de plaguicida comercial y plaguicida marcado con ^{14}C .

Las dosis de aplicación comercial (AFIPA, 1999. Manual de Fitosanitarios) son las indicadas a continuación:

Glifosato : 0,75 mg de herbicida por cada 1000 g de suelo.

Clorpirifos : 10 mg de insecticida por cada 1000 g de suelo.

a. Disolución fortificante de Glifosato

Se tomó 29,2 μL con una micropipeta de desplazamiento positivo (Gilson Microman Presición) de una disolución de Glifosato marcado con ^{14}C (^{14}C -GLY) de concentración 3,344 mg mL^{-1} , actividad de 7,4 MBq mL^{-1} y 1,783 mL de una disolución de Glifosato sin marcar (GLY) de concentración 1 mg mL^{-1} . Estas disoluciones se aforaron a 25 mL con agua de grado analítico (mq).

b. Disolución fortificante de Clorpirifos

Se tomó 126 μL con micropipeta de desplazamiento positivo (Gilson Microman Presición) de una disolución de Clorpirifos marcado con ^{14}C (^{14}C -CLP) de concentración 122,6 mg mL^{-1} , actividad de 1,65 MBq mL^{-1} y 9,5 mL de una disolución de Clorpirifos sin marcar (CLP) de concentración 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas disoluciones se aforaron a 25 mL con isooctano (Merck p.a. pureza > 99,5 %).

3.4.2 Fortificación y homogeneización del suelo

Se fortificó 2,5 Kg de suelo para cada plaguicida con las disoluciones ya mencionadas, los cuales se dispusieron en 2 bandejas de vidrio (pirex). Para una fortificación homogénea, los suelos se dividieron en 164 cuadrados iguales (2,5 cm de largo y 3 cm de ancho) a los cuales se les aplicó el mismo volumen de solución fortificante (Figura 14).



(A)



(B)

Figura 14. Fortificación del suelo (A). Bandejas fortificadas bajo campana (B).

Para permitir la evaporación del agua y del isooctano las bandejas se dejaron bajo campana por 24 h. Una vez seco, el suelo se trasladó a un envase plástico y se llevó al homogeneizador de tipo pantalón (24 vueltas min^{-1}) por 48 h (Figura 15).

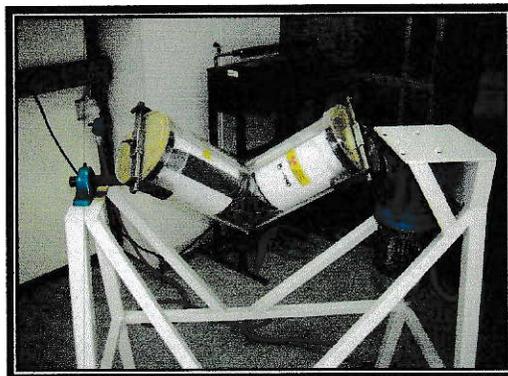
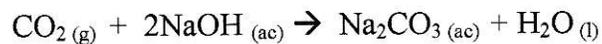


Figura 15. Homogeneizador tipo pantalón.

3.4.3 Incubación de las muestras de suelo fortificadas con los plaguicidas para el ensayo de degradación en condiciones controladas

Se colocó 100 g de suelo, previamente fortificado y homogeneizado, en frascos de vidrio con tapa hermética (750 mL de capacidad), etiquetados del 1 al 20, para cada plaguicida. Posteriormente se ajustó el contenido de agua de cada frasco, a un 75 % de la capacidad de campo del suelo (Steubing y col., 2002). En el interior de cada frasco se introdujo otro frasco con 10 mL de NaOH 0,5 M. Esta solución captura el CO₂ mediante la siguiente reacción:



Posteriormente los frascos fueron dispuestos al azar en incubadora (Sanyo Incubator MIR-253), a 20 ± 1 °C y a oscuridad completa (Figura 16).

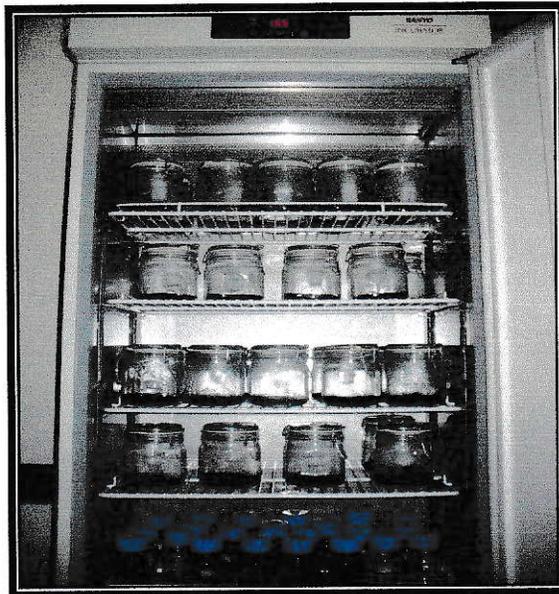


Figura 16. Incubación de las muestras de suelo.

3.4.4 Cuantificación de la biodegradación

Los frascos con 10 mL de NaOH 0,5 M, ubicados en el interior de los frascos herméticos, se cambiaron cada tres días para evitar la saturación del NaOH. Así, los frascos retirados contienen el CO₂ liberado en tres días por la biodegradación de los plaguicidas y la materia orgánica del suelo.

De estos frascos se tomó una alícuota de 1 mL en viales de vidrio, y se les agregó 5 mL de líquido centelleador (Packard, Ultima Gold LLT). Posteriormente, los viales se llevaron al contador de centelleo líquido (Beckman LS 500 TD) (Figura 17) dónde sólo se cuantifica el dióxido de carbono marcado con ¹⁴C (¹⁴CO₂), proveniente de la biodegradación del plaguicida. Así se conoce la tasa de evolución del ¹⁴CO₂, y por lo tanto la biodegradación del producto en el suelo.

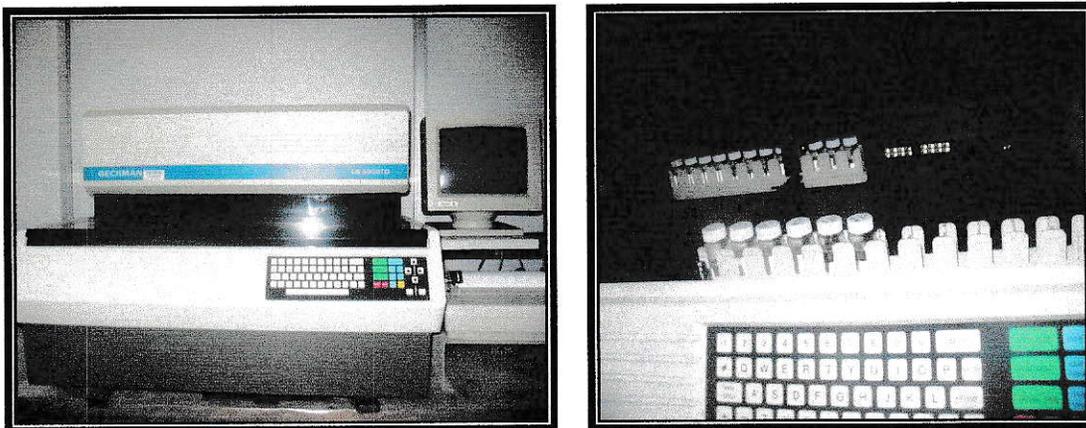


Figura 17. Contador de centelleo líquido.

3.4.5 Determinación del plaguicida residual en el suelo

La determinación del plaguicida residual en el suelo se realizó en intervalos de tiempo definidos en el transcurso del ensayo. Para esta determinación se retiraron de la incubadora muestras del suelo en duplicado, las que se secaron en estufa (Kottermann 2771) (Figura 18) a 50 ± 2 °C por 24 h.

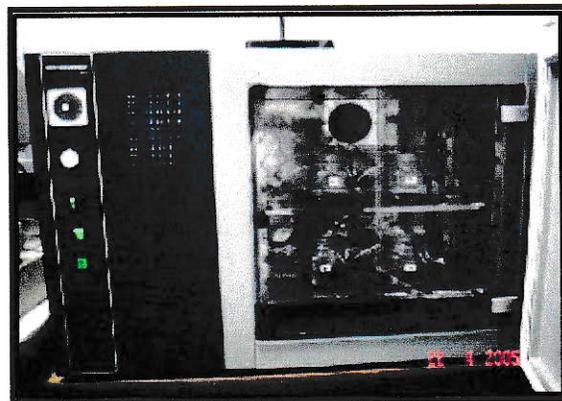


Figura 18. Secado de muestras (Estufa Kottermann 2771).

Una vez secas las muestras, se masó (PRECISA) 0,5 g de suelo más 50 mg de manitol (p.a) en cubetas de porcelana, las que fueron transportadas en una cuchara de cuarzo (Figura 19) al oxidizador biológico (Biological Oxidizer OX 500) (Figura 20).

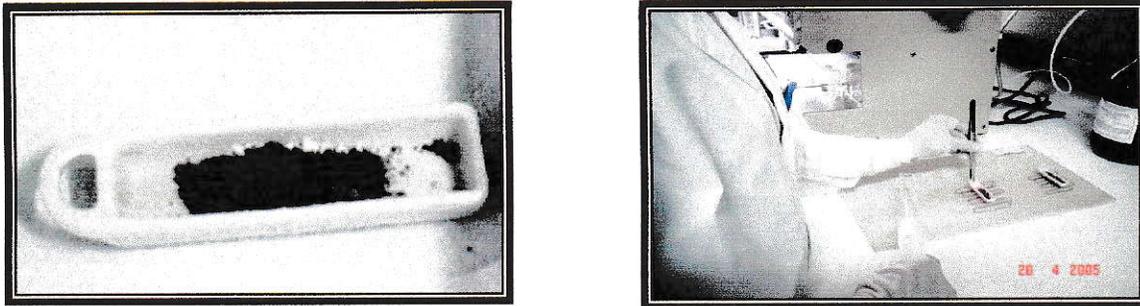


Figura 19. Cubeta de porcelana con muestra de suelo y manitol.

En el oxidizador biológico las muestras se combustonan a 900 °C y como producto se obtiene CO_2 y $^{14}\text{CO}_2$, proveniente del plaguicida marcado, el cuál se recoge en viales de vidrio que contienen líquido centelleador (cocktail de Xileno Carbon- 14) (Figura 20). Junto con las muestras de suelo, se combustionó una muestra de 50 mg de manitol, en duplicado, la que es utilizada como blanco (Andreu y Picó, 2004).

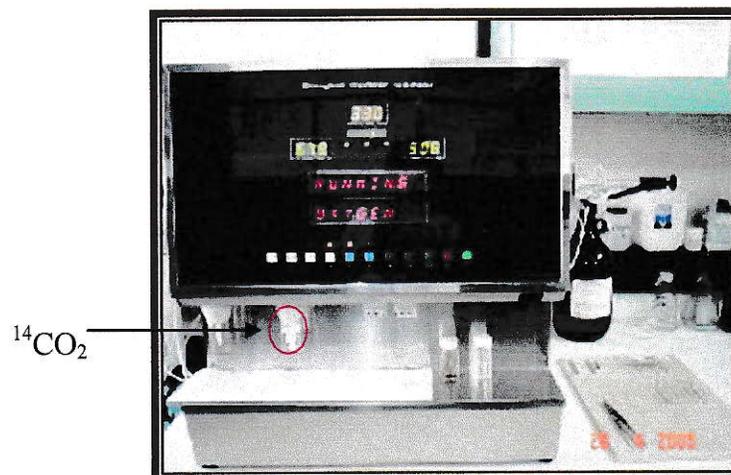


Figura 20. Oxidizador Biológico

Cada vez que se utilizó el oxidizador biológico se determinó un factor de combustión (FC) con cada plaguicida, el cuál chequea el buen funcionamiento del equipo.

Para la determinación del FC se combustionó una lámina de papel filtro con 10 μ L de una solución estándar de plaguicida marcado, siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras de suelo, a esta muestra se le llamó estándar combustionado. Paralelamente, se depositó directamente 10 μ L de la solución estándar de plaguicida en un vial de vidrio con 10 mL de líquido centelleador, a esta muestra se le llamó estándar directo (R. J. Harvey Instrument Corporation, 2002). Posteriormente, se llevó las dos muestras de estándares al contador de centelleo líquido y finalmente se calculó el valor de FC (Anexo I).

3.4.6 Determinación de residuos ligados y extraíbles del plaguicida

Del plaguicida residual del suelo se determinó la cantidad que correspondía a residuos ligados y a residuos extraíbles. La determinación se realizó mediante una extracción con agua, asistida por microondas (CEM-Mars 5), (Figura 21). Para esto se masó en cuadruplicado, 2 g de suelo (suelo retirado en 3.4.5) en vasos especiales para el microondas y se les agregó 10 mL de agua destilada. Posteriormente, los vasos se llevaron al microondas, para realizar la extracción, durante 30 minutos y con una potencia de 1.200 W (Jassie y col., 1997).

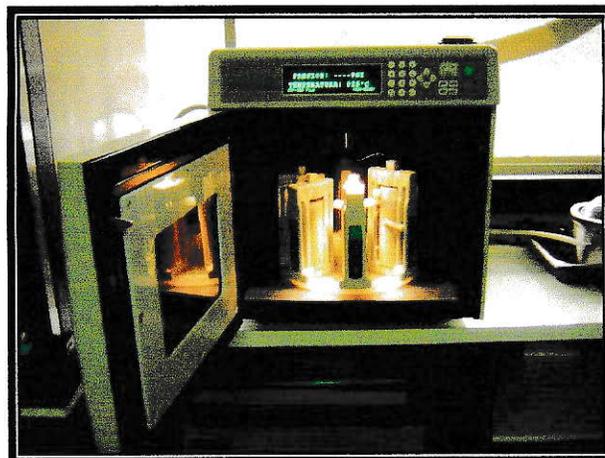


Figura 21. Equipo microondas (CEM-Mars 5).

Luego de la extracción, la solución suelo se centrifugó a 3000 rpm (Heraeus Sepatech) por 15 minutos para separar la fase líquida que contiene los residuos extraíbles, de la fase sólida que contiene los residuos ligados.

Para determinar los residuos extraíbles, se separó y se filtró la fase líquida. Luego, del filtrado se tomó 1 mL en un vial de vidrio, se adicionó 5 mL de líquido centelleador (Packard, Ultima Gold LLT) y posteriormente se llevaron al contador de centelleo líquido.

La fase sólida se dejó secando 24 h a 50 ± 2 °C (Kottermann 2771). Una vez seca y homogeneizada se combustionó en cuadruplicado siguiendo el procedimiento del punto 3.4.5. De esta manera se obtienen los residuos ligados.

3.4.7 Testigos

Paralelamente al ensayo, se llevaron dos tipos de testigos con suelo esterilizado por medio de radiación. En un caso el suelo fue fortificado con plaguicida y luego esterilizado (Testigo A) y en el otro, el suelo fue esterilizado y posteriormente fortificado con plaguicida (Testigo B).

Para esto se masó (Industry) 50 g de suelo (suelo fortificado para el testigo A y suelo sin fortificar para el testigo B), en frascos con tapa rosca y centro de goma (a), de 150 mL de capacidad etiquetados como A-1, A-2 y A-3 ó B-1, B-2, B-3 para cada plaguicida. Al interior de cada frasco se colocó otro frasco de menor tamaño (b) sostenido por un trípode de alambre (c) (Figura 22).

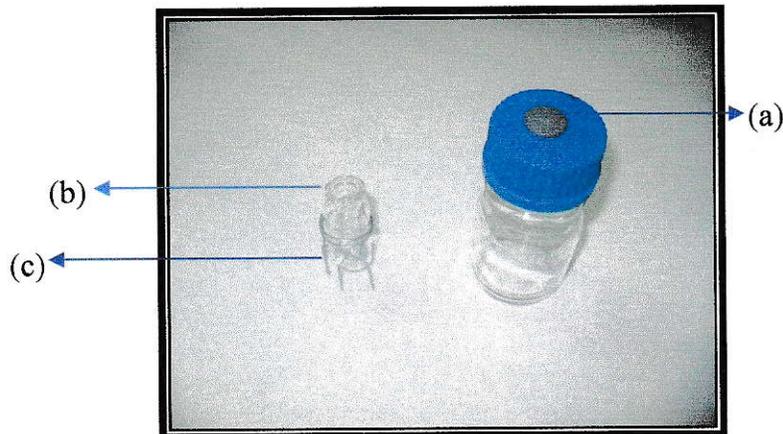


Figura 22. Frasco para suelo testigo.

Los frascos completamente cerrados se llevaron al irradiador (Sección de Salud y Alimentos, Departamento de Aplicaciones Nucleares, CCHEN). Las muestras de suelo fueron irradiadas con una dosis de 25 KGy. Posteriormente, a los testigos B se les agregó una disolución de plaguicida marcado con ^{14}C , hecha según la dosis de aplicación comercial. A ambos testigos se les agregó 10,7 mL de agua al suelo contenido en los frascos (volumen de agua necesario para alcanzar el 75 % de la capacidad de campo del suelo) con una jeringa a través del centro de goma y se agregaron 5 mL de NaOH 0,5 M esterilizado a los frascos ubicados en el interior, mediante una jeringa. Estos testigos fueron incubados (Sanyo Incubator MIR-253) junto con las muestras a 20 ± 1 °C y oscuridad completa.

La cuantificación del $^{14}\text{CO}_2$ se realizó cada 6 días, para esto se sacó con una jeringa los 5 mL de NaOH contenidos en los frascos pequeños. De el NaOH retirado se tomó 1 mL en un vial de vidrio y se les agregó 5 mL de líquido centelleador (Packard, Ultima Gold LLT). Posteriormente, los viales se llevaron al contador de centelleo líquido y se repuso los 5 mL de NaOH de los frascos pequeños.

3.5 Determinación de la Degradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos en condiciones ambientales

En este ensayo de 91 días de duración se determinó la degradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos en el suelo, expuesto a condiciones ambientales de temperatura y radiación solar.

3.5.1 Preparación de disoluciones fortificantes

Al igual que en el ensayo de la determinación de la biodegradación en condiciones controladas, se prepararon dos disoluciones fortificantes, basadas en la dosis de aplicación comercial, para cada plaguicida.

a. Disolución fortificante de Glifosato

Se tomó 39,8 μL con una micropipeta de desplazamiento positivo (Gilson Microman Presición) de una disolución de ^{14}C -GLY de concentración 3,344 mg mL^{-1} , actividad de 7,4 MBq mL^{-1} y 1,1 mL de una disolución de Glifosato comercial de concentración 1 mg mL^{-1} . Estas disoluciones se aforaron a 20 mL con agua grado mq.

b. Disolución fortificante de Clorpirifos

Se tomó 140 μL con micropipeta de desplazamiento positivo (Gilson Microman Presición) de una disolución de ^{14}C -CLP de concentración $122,6 \text{ mg mL}^{-1}$, actividad de $1,65 \text{ MBq mL}^{-1}$ y se aforó a 20 mL con isooctano (Merck p.a. pureza > 99,5 %).

3.5.2 Fortificación y homogeneización del suelo

Se fortificó 1,7 Kg de suelo para cada plaguicida con las disoluciones ya mencionadas (3.5.1), siguiendo el procedimiento descrito en 3.4.2.

3.5.3 Preparación y ubicación de las muestras de suelo

Se masó 50 g (Industry) de suelo, previamente fortificado y homogeneizado, en placas petri, etiquetadas del 1 al 12 para cada plaguicida, incluyendo muestras y contra muestras. Se ajustó el contenido de agua a un 75 % de la capacidad de campo del suelo agregando 10,1 mL de agua a cada placa petri.

Las placas se colocaron al aire libre, en las instalaciones del Centro de Estudios Nucleares La Reina de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (Figura 23).



Figura 23. Ubicación de las muestras de suelo del ensayo de degradación en condiciones ambientales.

3.5.4 Determinación del plaguicida residual en el suelo

La determinación del plaguicida residual en el suelo se realizó en intervalos de tiempo definidos en el transcurso del ensayo. Para esta determinación se retiraron placas con muestras de suelo en duplicado las que se secaron durante 24 h a 50 ± 2 °C (Kottermann 2771). Esta determinación se realizó mediante la combustión de las muestras de suelo y su posterior cuantificación en el contador de centelleo líquido siguiendo la misma metodología mencionada en el apartado 3.4.5 del ensayo de biodegradación de plaguicidas en condiciones controladas.

3.5.5 Determinación de residuos ligados y extraíbles de plaguicida

Del plaguicida residual del suelo se determinó la cantidad que correspondía a residuos ligados y a residuos extraíbles. La determinación se realizó mediante una extracción con agua asistida por microondas (CEM-Mars 5) empleando la misma metodología descrita en el apartado 3.4.6 del ensayo de biodegradación de plaguicidas en condiciones controladas.

3.5.6 Testigos

Se masó 50 g de suelo, previamente fortificado y homogeneizado, en frascos herméticos de vidrio con tapa rosca y centro de goma, etiquetados de 1 a 8 para cada plaguicida. Los frascos se llevaron al irradiador para esterilizar el suelo. La dosis aplicada fue de 25 KGy. Posteriormente, se agregó un volumen de agua de 10,1 mL a cada frasco, mediante una jeringa a través del centro de goma de los frascos, para llevar el suelo a un 75 % de su capacidad de campo.

Los testigos fueron puestos al azar en una bandeja junto a las muestras de suelo al aire libre (Figura 24).



Figura 24. Testigos ubicados junto a las muestras en el ensayo bajo condiciones ambientales.

Al suelo testigo se le determinó el plaguicida residual en distintos intervalos de tiempo durante el ensayo. La metodología utilizada para la cuantificación de los residuos de plaguicida fue la misma que se describió en el apartado 3.4.5 del ensayo de biodegradación de plaguicidas en condiciones controladas.

3.6 Recuento de microorganismos aeróbicos mesófilos (RAM)

Se realizó el recuento microbiano de una muestra de suelo inicial sin fortificar, de una de las muestras de suelo incubadas en el ensayo de biodegradación en condiciones controladas (3.4.3) y de los testigos A-3 y B-3 de cada plaguicida (3.4.7). Con este recuento se obtiene el número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (ufc g^{-1}) en cada muestra. El RAM fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Sección de Salud y Alimentos de la CCHEN, siguiendo el método del Manual Bacteriológico Analítico (BAM *online*, 2001).

Este método consiste en diluir 25 g de la muestra de suelo en 225 mL de agua peptonada 0,1% estéril (WP). De esta disolución se tomó 1 mL, el cual se diluyó con 9 mL de WP en un tubo de ensayo y se agitó (vortex). De este tubo se tomó 1 mL y se diluyó nuevamente en 9 mL de WP en otro tubo de ensayo, de esta misma forma se realizaron 7 diluciones consecutivas. De la 7^o disolución se tomó 1 mL en placa de petri, en duplicado, y se agregó un medio de cultivo (Agar de Soya Trypticasa) (Figura 25).

Las placas se dejaron por 48 h a 35 ± 1 °C en estufa. Pasado este tiempo se realizó el recuento de ufc en cada placa, el que finalmente fue expresado en ufc g⁻¹ para cada muestra.

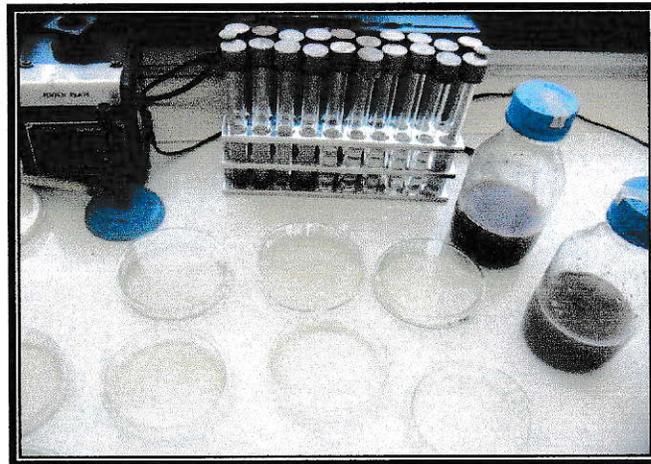


Figura 25. Cultivo de microorganismos.

3.7 Determinación del límite de detección y cuantificación del equipo contador de centelleo líquido (Beckman LS 500 TD) para Glifosato y Clorpirifos

Se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del equipo contador de centelleo líquido (Beckman LS 500 TD) para los plaguicidas en estudio mediante una curva de calibración (concentración versus actividad). Para la construcción de las curvas de calibración se utilizaron concentraciones de $0,3 \times 10^{-3}$; $0,1 \times 10^{-2}$; $0,5 \times 10^{-2}$; $0,1 \times 10^{-1}$ y $0,1$ (mg L^{-1}) de Glifosato y concentraciones de $0,3$; $0,5$; $1,0$; $2,0$ y $5,0$ (mg L^{-1}) de Clorpirifos.

Los LD y LC se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LD} = (\text{Sm} - \underline{\text{Sbl}}) / m$$

$$\text{LC} = (\text{Sm}^* - \underline{\text{Sbl}}) / m$$

Donde:

$\underline{\text{Sbl}}$: promedio mediciones blancos

Sm : $\underline{\text{Sbl}} + 3 \times \text{sbl}$

Sm^* : $\underline{\text{Sbl}} + 10 \times \text{sbl}$

sbl : desviación estándar blancos

m : pendiente curva de calibración

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros físicos y químicos del suelo Serie La Lajuela

Los resultados obtenidos en la determinación de las propiedades físicas y químicas del Suelo Serie La Lajuela se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del Suelo Serie La Lajuela.

Parámetros		Suelo Serie La Lajuela
Materia Orgánica (%)		4,2
pH (H ₂ O)		6,3
Distribución por tamaño de partícula	Arena (%)	55,9
	Limo (%)	28,2
	Arcilla (%)	15,9
Clase Textural		Franco arenosa
Densidad Aparente (Mg m ⁻³)		1,4
Porosidad Total (%)		45,1

El Suelo Serie La Lajuela presenta un alto porcentaje de materia orgánica (MO). Este contenido de MO (4,2 %) es considerado alto para suelos agrícolas, siendo así un factor clave en la fertilidad del suelo, ya que actúa sobre las propiedades físicas (porosidad, capacidad de retención hídrica y estabilidad de los agregados). Igualmente influye en las propiedades químicas en especial sobre la capacidad de intercambio de cationes que actúa como una reserva nutricional, a la vez que aporta nutrientes mediante los procesos de mineralización y sobre los biológicos, ya que mantiene la actividad microbiana del suelo.

El pH de este suelo está dentro del rango considerado débilmente ácido (6,1 – 6,5), y se espera encontrar en el suelo una máxima disponibilidad de nutrientes. Con respecto a los microorganismos desarrollados, en los suelos con pH sobre 5,5, las bacterias y actinomicetes son fuertemente competitivos y tienden a dominar la actividad microbiana. Además se pueden encontrar hongos, ya que son muy versátiles y se desarrollan satisfactoriamente en un amplio rango de pH (Sadzawka, 2006 a).

En general los suelos que contienen 15 a 30 % de arcilla, 40 a 55 % de arena y 15 a 30 % de limo, como el Suelo Serie La Lajuela, presentan escasos problemas de drenaje o disponibilidad de agua. En consecuencia se les cataloga como suelos óptimos para el crecimiento de las plantas y para la producción agrícola (Casanova y col., 2006).

La densidad aparente relaciona el peso del suelo y su volumen, incluyendo el espacio libre poroso, es por esto que la densidad está inversamente relacionada con la porosidad. En la Tabla 1, se observa que el valor de la densidad aparente es alto sin embargo, se aprecia un valor de porosidad que permite una buena aireación y movimiento de agua.

4.2 Determinación de la biodegradación del herbicida Glifosato en condiciones controladas

En la Figura 26, se presentan los resultados de la biodegradación de Glifosato bajo condiciones controladas, en función del tiempo, durante los 99 días de ensayo.

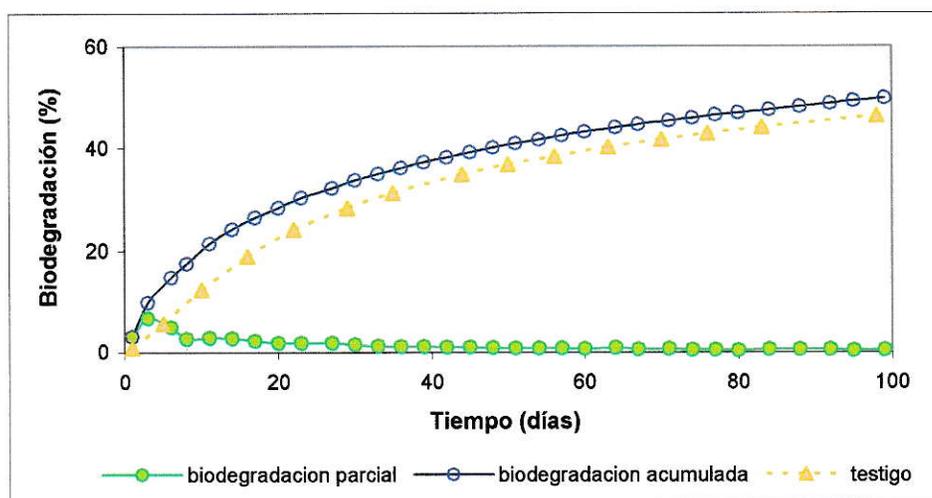


Figura 26. Biodegradación de Glifosato en condiciones controladas.

Las curvas representan la biodegradación de Glifosato, expresadas como porcentaje de CO_2 , considerando como 100 % a la cantidad inicial de Glifosato aplicado al suelo, determinada experimentalmente.

La biodegradación parcial representa el porcentaje de CO_2 recuperado cada tres días, alcanzando un máximo de 6,8 % al tercer día de ensayo, disminuyendo al 5 % al sexto

día. A partir del octavo día hasta el día 39, la producción de CO₂ se mantiene sobre el 1 %, la cual disminuye lentamente desde el día 42 en adelante, no superando el 0,5 % de CO₂ hacia la etapa final del ensayo (Figura 26).

Así, al término del ensayo la curva de biodegradación acumulada alcanzó un 49,8 % de CO₂ total (Figura 26), resultado que concuerda con lo obtenido por Landry y col. (2005), Sørensen y col. (2006) y Rueppel y col. (1977).

En esta curva se observan tres etapas de biodegradación (Tabla 2) considerando los intervalos de tiempo, la pendiente de la curva (Anexo III) y los valores acumulados de CO₂. La primera etapa presenta una rápida biodegradación inicial, seguida por una etapa intermedia, que finaliza en una tercera etapa donde la pendiente de la curva presenta un bajo valor (0,2) y el porcentaje de Glifosato biodegradado es menor al de las otras etapas (12,6 %).

Tabla 2. Curva de evolución de biodegradación de Glifosato bajo condiciones controladas.

Etapa	Intervalo de tiempo (días)	Pendiente de la curva	Biodegradación en la etapa (%)
I	0-6	2,6	14,8
II	7-39	0,6	22,4
III	40-99	0,2	12,6

Contrariamente a lo esperado, la curva de biodegradación del testigo (Figura 26), presentó valores similares a los alcanzados por las muestras, posiblemente producto de una dosis de irradiación menor a la necesaria o a una potencial contaminación de las muestras en el transcurso del ensayo, situación que se confirma ya que al término del mismo el recuento microbiano presentó un valor mayor ($1,36 \times 10^8$ ufc g^{-1}) al encontrado en las muestras de suelo sin esterilizar ($3,5 \times 10^7$ ufc g^{-1}). Por otro lado, análisis realizados en el laboratorio de la Sección Agricultura de la CCHEN, permiten descartar un efecto en la degradación del Glifosato producto de la irradiación obteniéndose valores similares en las condiciones indicadas.

Al trabajar con muestras de suelo con plaguicidas y esterilizadas mediante irradiación, Carazo y col. (1982) observaron que estas muestras esterilizadas presentaban una menor o mayor degradación del plaguicida con respecto a las muestras sin esterilizar. Mientras Getzin y Rosefield (1968), citado por Carazo y col (1982), encontraron que la degradación de diversos plaguicidas en suelos irradiados es ligeramente menor que en los no esterilizados.

La producción de CO_2 , descrita anteriormente y representada mediante las curvas de biodegradación de Glifosato (Figura 26), es un proceso que está directamente relacionado con la disminución de los residuos de Glifosato en el suelo (Figura 27).

Así, se observa que el porcentaje de Glifosato inicial en el suelo disminuye a medida que transcurren los días de incubación (Figura 27), siendo inversamente proporcional a la curva de biodegradación acumulada (Figura 26).

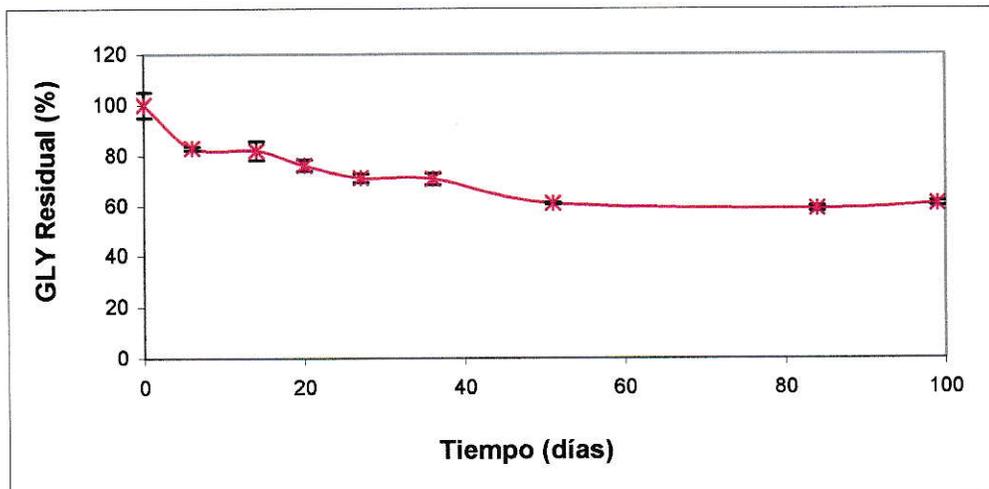


Figura 27. Glifosato residual (%) en el suelo, bajo condiciones controladas.

De este Glifosato residual, un porcentaje corresponde a residuos ligados al suelo y otro a residuos extraíbles (Figura 28).

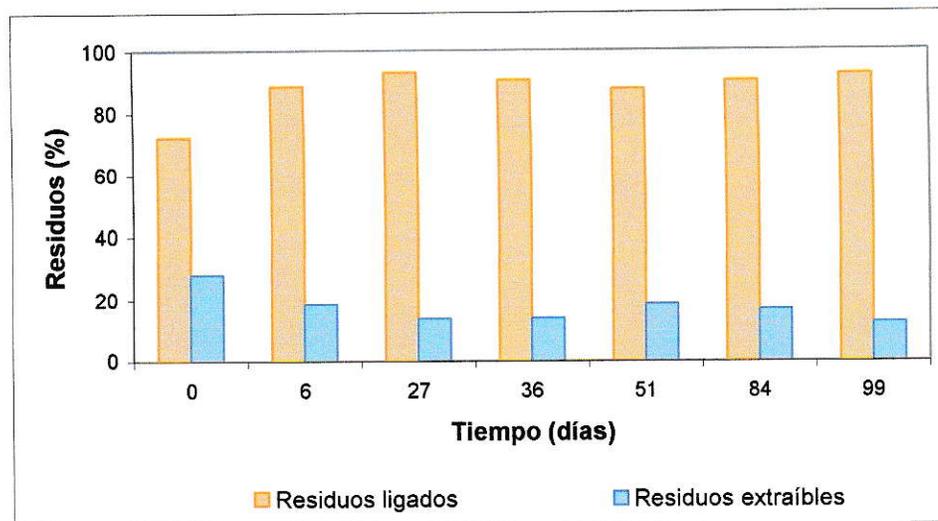


Figura 28. Residuos ligados y extraíbles de Glifosato en condiciones controladas.

Al considerar el porcentaje de residuos de Glifosato total, se observa que a partir del sexto día de incubación en adelante, el porcentaje de residuos ligados al suelo se mantiene entre un 88 % y 93 % (Figura 28). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la literatura respecto al comportamiento de Glifosato en suelos, describiéndolo como una pequeña molécula que es adsorbida rápida y fuertemente a la mayoría de los suelos a través de sus constituyentes, entre ellos, los óxidos metálicos, las arcillas, algunos materiales orgánicos y las sustancias húmicas (Afonso y col., 2005).

Así mismo, los residuos de Glifosato permanecen relativamente constantes con valores menores al 12 %, siendo complementarios a los porcentajes de residuos ligados (Figura 28).

De acuerdo al modelo propuesto por Hamaker y Goring (1976) (citado por Eberbach, 1998), llamado “Compartimentación”, la descomposición del plaguicida sólo puede ocurrir desde la fase lábil (plaguicida extraíble) (Figura 29). Esta situación es particularmente válida para plaguicidas cuya mayor ruta de degradación es microbiológica, como sucede con el plaguicida Glifosato.

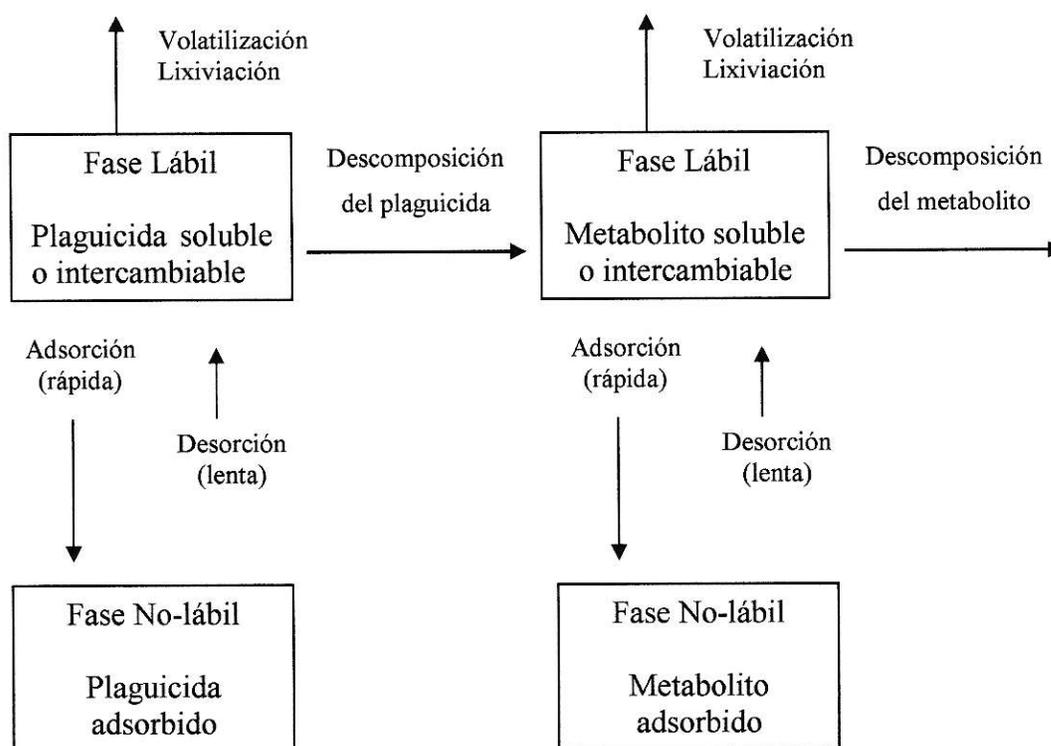


Figura 29. Esquema del Modelo de Compartimentación (Eberbach, 1998)

Mediante este modelo es posible explicar los resultados obtenidos en la curva de evolución de la biodegradación de Glifosato en condiciones controladas (Figura 26). Así, el mayor porcentaje de producción de CO₂ se presenta en los primeros días de incubación, cuando los residuos ligados están en menor porcentaje y por lo tanto, el Glifosato se encuentra más biodisponible. A través del tiempo a medida que aumentan los residuos ligados al suelo, se produce una disminución de la biodegradación de Glifosato.

De esta manera, resultados obtenidos por Rueppell y col. (1977), afirman que la lenta degradación de Glifosato, después de 7 días, refleja la adsorción del substrato reduciendo su disponibilidad para la descomposición.

4.3 Determinación de la degradación de Glifosato en condiciones ambientales

En la determinación de la degradación de Glifosato en el suelo bajo condiciones ambientales a través del tiempo, se observó que, del Glifosato inicialmente agregado un alto porcentaje (97 %) permanece en el suelo (Figura 30). Lo anterior evidencia una baja o nula degradación de Glifosato en las muestras de suelo. Los testigos presentan un comportamiento similar, donde el Glifosato, inicialmente agregado, permanece en el suelo, aún transcurridos los 91 días de ensayo (Figura 30).

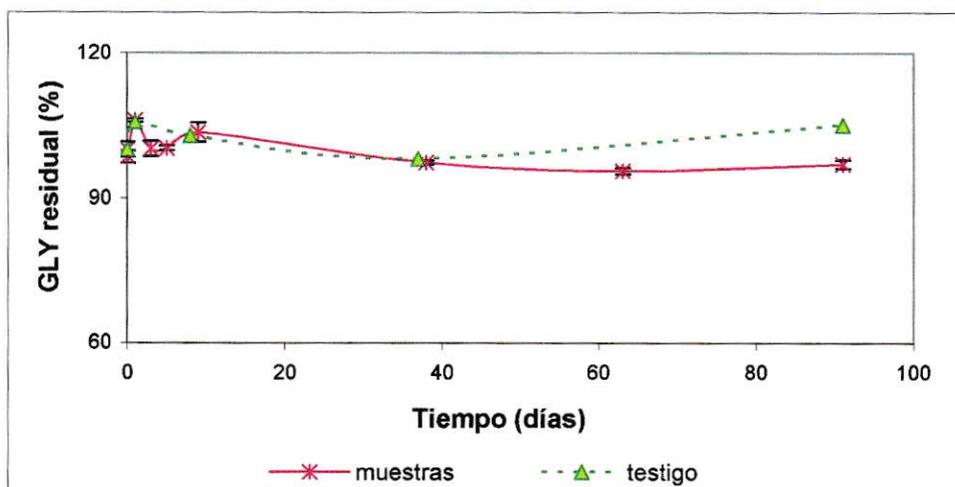


Figura 30. Glifosato residual (%) en el suelo, bajo condiciones ambientales.

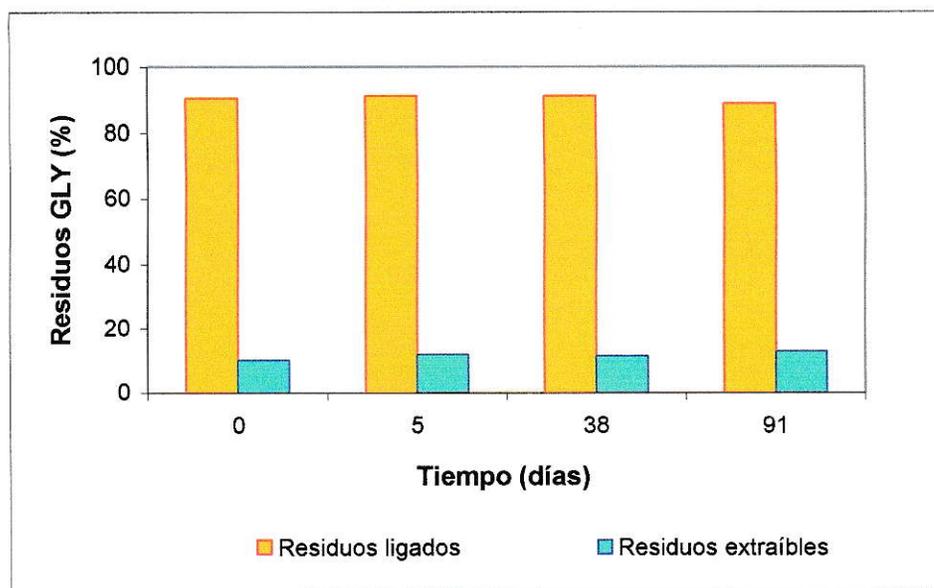


Figura 31. Residuos ligados y extraíbles de Glifosato bajo condiciones ambientales.

En la Figura 31, se observan los porcentajes de residuos ligados y extraíbles en función del tiempo, con una fuerte tendencia del Glifosato a ser adsorbido por el suelo. Esta situación se refleja desde el inicio del ensayo, donde se determinaron altos porcentajes de residuos ligados al suelo (89-91 %). Esto impide su degradación química y microbiana, ya que el Glifosato disponible es aquel que se encuentra como residuo extraíble (≤ 12 %).

Estos resultados se ven reafirmados por Eberbach (1998), quién en uno de sus ensayos, calculó los rangos de tiempo de vida media para el Glifosato en la fase lábil y en la fase no-lábil, siendo de 6-9 días y de 222-835 días, respectivamente.

4.4 Comparación entre los ensayos de biodegradación bajo condiciones controladas y degradación bajo condiciones ambientales de Glifosato

En la Tabla 3, se presenta un resumen de los valores obtenidos al término de los ensayos de biodegradación en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales, expresados en porcentaje con respecto al Glifosato aplicado inicialmente al suelo.

Tabla 3. Biodegradación de Glifosato en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales (%).

Determinación	Condiciones Controladas (%)	Condiciones Ambientales (%)
GLY total biodegradado	50	nd
GLY total degradado	nd	3
GLY final remanente en el suelo	61	97
Residuos ligados	60	86
Residuos extraíbles	8	7

nd : no determinado

De los resultados expuestos, se observa que bajo condiciones controladas al cabo de 99 días se biodegradó el 50 % del producto aplicado; mientras que bajo condiciones ambientales, la degradación del Glifosato alcanzó sólo un 3 % al cabo de 91 días de ensayo (Tabla 3).

De igual manera, se observan grandes diferencias entre los porcentajes de residuos ligados, para ambas condiciones de ensayo. Así, el porcentaje de residuos ligados es significativamente mayor bajo condiciones ambientales (86 %) que bajo condiciones controladas (60 %), mientras que el bajo porcentaje de los residuos extraíbles se mantiene similar para ambas condiciones de estudio (Tabla 3).

Así, las diferencias obtenidas en ambos ensayos son atribuidas a los factores de humedad, temperatura y radiación solar, condiciones que variaron entre un ensayo y otro (Tabla 4) (Anexo III).

Tabla 4. Condiciones de humedad, radiación solar y temperatura durante el período de ensayos.

Factor	Condiciones Controladas	Condiciones Ambientales
Humedad (% CC)	75	Variable
Radiación solar max. Promedio ($W m^{-2}$)	0	916*
Temperatura max. promedio ($^{\circ}C$)	20	30*
Temperatura min. promedio ($^{\circ}C$)	20	13*

*Valores promedio de base de datos de estación meteorológica, período diciembre 2006 a febrero 2007. Fuente: Departamento de Meteorología del Centro de Estudios Nucleares, La Reina, de la CCHEN.

Durante el ensayo bajo condiciones controladas la humedad del suelo se mantuvo a un 75 % de su CC, mientras que, para el ensayo bajo condiciones ambientales, no se mantuvo para todo el periodo de estudio (Tabla 4). Al inicio, la humedad de suelo fue corregida diariamente, sin embargo las altas temperaturas provocaron una rápida evaporación del agua aplicada llevando a las muestras a condiciones de estrés hídrico. La variabilidad del porcentaje de humedad del suelo, pudo provocar una disminución de la actividad microbiana, ya que ésta se desarrolla óptimamente cuando el suelo presenta una humedad de 60 %, respecto al contenido total que el suelo puede almacenar. (Navarro y col., 1992 citado por Camarda, 2005).

Si bien, la radiación solar puede provocar la fotodescomposición del Glifosato al interactuar con ciertos enlaces de la molécula, la acción de la radiación solar sobre las muestras, bajo condiciones ambientales (Tabla 4), no tuvo mayor influencia en la degradación del Glifosato (Tabla 3), pues el Glifosato es estable frente a la fotodegradación en suelos (EPA, 1993).

Al parecer, la temperatura sería el factor determinante en la diferencia de porcentaje de disipación del Glifosato, en ambos ensayos. En el ensayo bajo condiciones controladas, la temperatura se mantuvo a 20 ± 1 °C, mientras que bajo condiciones ambientales ésta fue variable durante el día presentando una temperatura máxima promedio de 30 ± 3 °C y una mínima promedio de 13 ± 2 °C (Tabla 4).

Por una parte, el aumento de la temperatura favorece la actividad microbiana (Varnero, 1992) y por otra, un aumento de temperatura provocaría una disminución en la adsorción y un aumento en la desorción, ya que la adsorción es un proceso exotérmico. A pesar de esto, el ensayo bajo condiciones ambientales presentó una mayor adsorción del Glifosato al suelo dejándolo menos disponible para los microorganismos, reduciendo su degradación.

Resultados similares obtuvo Eberbach (1998), quién encontró que a altas temperaturas, el Glifosato es fuertemente retenido en suelos ácidos.

Finalmente, es la biodegradación la principal ruta de disipación del Glifosato, la que se encuentra estrechamente relacionada con la cantidad de Glifosato presente en la fase lábil. Así lo confirman Calderón y col. (2005), al decir que, la fuerte adsorción de Glifosato al suelo puede inducir a una protección de éste frente a la degradación microbiana, siendo los procesos de adsorción-desorción los que al final controlen la cantidad de Glifosato en suelo.

Según el trabajo de Chorbadjian y Kogan (2001), se ha determinado que la adsorción de Glifosato al suelo se incrementa al aumentar el contenido de arcillas del suelo (Glass, 1987; Hensley y col., 1978), también se ha especificado que la adsorción del Glifosato a las arcillas depende del tipo de arcilla, pH de la solución, composición iónica de la superficie de la arcilla (Hossner, 1985) y especialmente de la concentración de Glifosato en la solución (Gerritse y col., 1977). Con respecto a estos factores, la montmorillonita posee una gran capacidad de adsorción de Glifosato (Glass, 1987) (citado por Chorbadjian y Kogan, 2001). Concuera con que la montmorillonita, arcilla expandible 2:1, es la principal arcilla presente en el Suelo Serie La Lajuela.

La molécula de Glifosato y la arcilla montmorillonita, generalmente, poseen cargas netas negativas, de modo que no hay atracción electrostática asociada a la interacción. Sin embargo, la montmorillonita presenta alta capacidad de adsorción de cationes, y además, se sabe que el Glifosato es capaz de formar complejos de esfera interna con varios metales como el Al^{+3} y Fe^{+3} , de modo que se pueden formar los mismos complejos en las superficies de la montmorillonita como en sus intercapas (Afonso M. y col., 2005).

Así, el Glifosato (anión) se acopla a las cargas positivas de los iones Ca^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} , que se encuentran asociados con los coloides del suelo, siguiendo el mecanismo de adsorción de los grupos fosfatos (H_2PO_4^-) (Kogan y Pérez, 2003). El mecanismo consiste en el reemplazo de un hidroxilo estructural por un ión fosfato no hidratado para formar un complejo de esfera interna. Esta reacción une al fosfato tan firmemente que no puede ser fácilmente reemplazado por otros aniones. Con el tiempo, un segundo oxígeno del ión fosfato puede reemplazar un segundo hidroxilo, de manera que el fosfato queda unido a dos átomos de Al (o Fe) formando una unión binuclear estable. Cuando esto ocurre, el fosfato pasa a formar parte integral del mineral y su liberación a la solución suelo es extremadamente lenta (Sadzawka, 2006 b) (Figura 32).

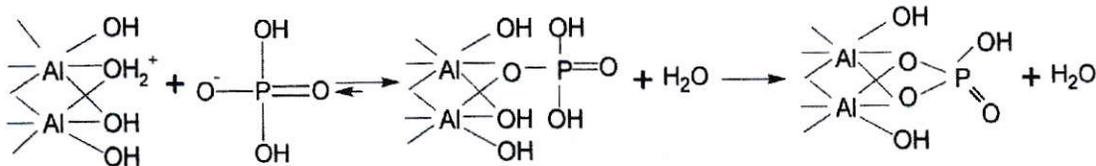


Figura 32. Reacción del ión fosfato con una superficie de Al hidroxilado formando finalmente un complejo de esfera interna con una unión binuclear estable.

Otro componente de la fracción coloidal del suelo importante también en los procesos de adsorción es la MO, la cuál está presente en un alto porcentaje (4,2 %) en el suelo en estudio. La MO (sustancias húmicas específicamente), podría adsorber igual cantidad de Glifosato que las arcillas, dependiendo de su estructura química y tamaño molecular (Piccolo y col., 1996 citado por Chorbadjian y Kogan, 2001).

El Glifosato se ioniza fácilmente, y como anión, se adsorbe fuertemente a la materia orgánica (Figura 33) en suelos con pH intermedio (Solomón y col., 2005).

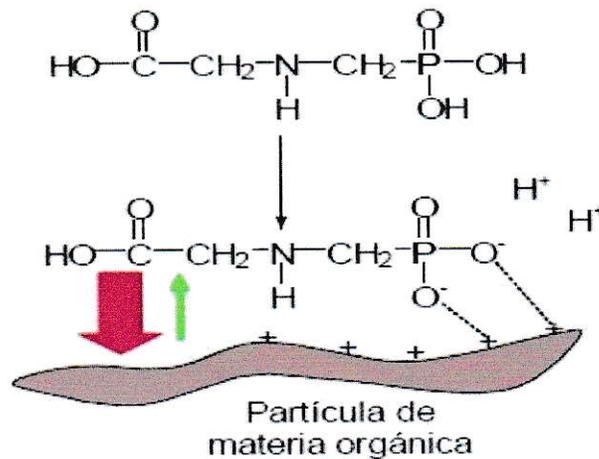


Figura 33. Adsorción del Glifosato a las partículas de MO (Solomón y col., 2005).

4.5 Determinación de la biodegradación del insecticida Clorpirifos en condiciones controladas

Los resultados obtenidos en la determinación de la biodegradación de Clorpirifos en condiciones controladas, en función del tiempo, se presentan en la siguiente figura (Figura 34).

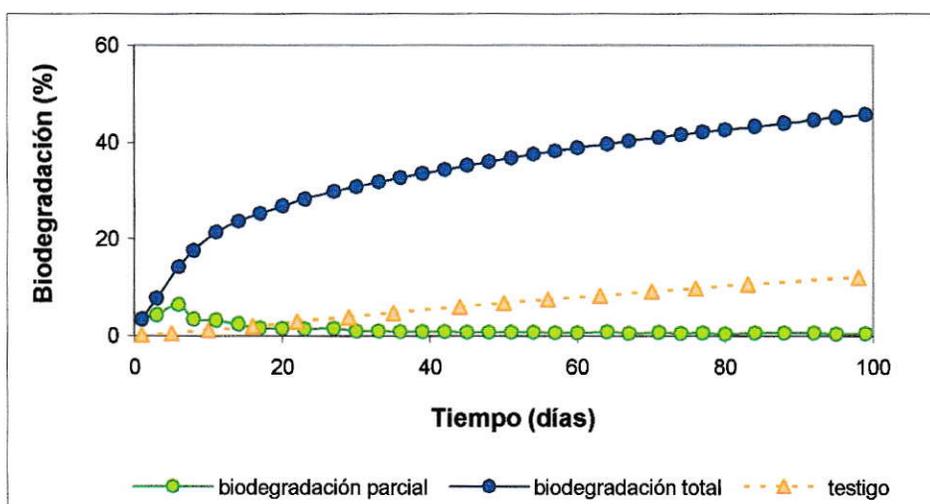


Figura 34. Biodegradación de Clorpirifos en condiciones controladas.

En la figura 34, se observa la evolución de la biodegradación del Clorpirifos, en 99 días de incubación bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y oscuridad. El 100 % corresponde a la cantidad de Clorpirifos inicialmente agregada al suelo, determinada experimentalmente.

La curva de biodegradación parcial muestra una máxima recuperación de CO₂ al sexto día de incubación, alcanzando un 6,43 %. A partir del séptimo día de incubación, la producción de CO₂ comienza a disminuir progresivamente, terminando con porcentajes inferiores a 1.

La curva de biodegradación acumulada puede ser descrita en tres etapas diferentes, las cuales se presentan a continuación (Tabla 5) (Anexo III).

Tabla 5. Curva de evolución de biodegradación de Clorpirifos en condiciones controladas.

Etapas	Intervalo de tiempo (días)	Pendiente de la curva	Biodegradación en la etapa (%)
I	0-6	2,4	14,11
II	7-33	0,6	17,72
III	34-99	0,2	13,9

Los resultados expuestos en la Tabla 5, presentan una gran similitud con los resultados obtenidos en la determinación de la biodegradación del Glifosato en condiciones controladas (Tabla 2). Nuevamente es posible apreciar una primera etapa, correspondiente a los 6 primeros días de ensayo, dónde la producción de CO₂ es muy alta, en esta corta etapa se alcanzó un 14,11 % de Clorpirifos biodegradado.

La etapa II, ó etapa de transición, tiene un periodo de duración de 26 días de ensayo (desde el día 7 al día 33), días en los cuales comienza a disminuir progresivamente la producción de CO₂ diario, esto se observa en el menor valor de la pendiente de la curva (0,6). La etapa III, ó etapa final, muestra una muy baja producción de CO₂, a pesar de ser la etapa más larga, la cual consta de 35 días de duración (desde el día 34 al día 99), en ella sólo se degradó un 13,9 % del Clorpirifos inicialmente agregado al suelo. La biodegradación neta de Clorpirifos al final del este ensayo fue de 46 %.

La disminución de la producción de CO₂ en el transcurso del ensayo, se puede atribuir a que en un comienzo hay mayor cantidad de Clorpirifos disponible para ser biodegradado por los microorganismos, la cual disminuye a medida que transcurre el tiempo.

Por otra parte la mayor biodegradación al comienzo y su posterior disminución, también se puede atribuir a la acumulación del TCP (metabolito principal del Clorpirifos), el cual genera un efecto anti microbiano, que inhibe el desarrollo de los microorganismos responsables de la biodegradación del Clorpirifos en el suelo (Racke, 1990).

Con respecto a los testigos, estos, alcanzaron un 12 % de Clorpirifos degradado al fin del ensayo (Figura 34), en contraste con el 46 % de degradación de las muestras. A diferencia de lo ocurrido con los testigos de Glifosato en condiciones controladas, estos mantuvieron su condición de esterilización.

Al término del ensayo se realizó el recuento microbiano del suelo testigo, donde no se encontraron ufc. Por lo que este 12 % de Clorpirifos degradado se atribuye a la hidrólisis química, la cual es otra de vía principal de disipación del Clorpirifos. Otras posibles rutas de disipación de Clorpirifos en el suelo, como lixiviación, volatilización, difusión y fotodegradación, son descartadas, ya que las muestras de suelo fueron incubadas en condiciones de oscuridad y hermetismo.

Los residuos de Clorpirifos en el suelo (Figura 35), muestran una disminución a medida que transcurre el tiempo de incubación, la cual refleja el aumento de la biodegradación de Clorpirifos (Figura 34).

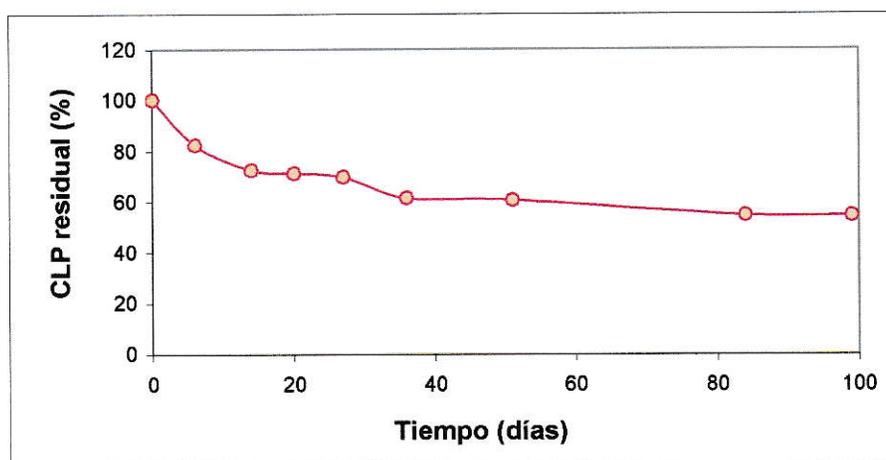


Figura 35. Clorpirifos residual en el suelo en condiciones controladas.

De esta fracción de Clorpirifos remanente en el suelo, un porcentaje corresponde a residuos extraíbles y otro a residuos ligados al suelo (Figura 36).

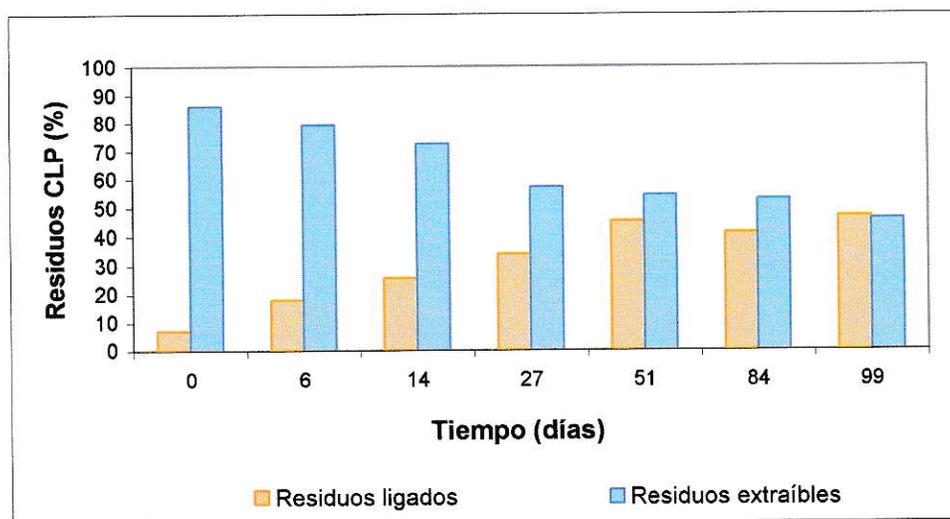


Figura 36. Residuos ligados y extraíbles de Clorpirifos en condiciones controladas.

En la Figura 36, se observa el cambio de las proporciones en que se encuentran los residuos ligados y extraíbles de Clorpirifos en el suelo. Así, a medida que disminuyen los residuos extraíbles, aumentan los residuos ligados al suelo, hasta alcanzar un equilibrio entre ambas fracciones al final del ensayo.

La disminución de los residuos extraíbles se debe a que esta fracción de Clorpirifos es la disponible para ser degradada, ya sea química o biológicamente. Estos resultados tienen relación con lo encontrado en la determinación de la biodegradación (Figura 34), la cual se presenta en mayor porcentaje al inicio del ensayo.

4.6 Determinación de la degradación de Clorpirifos en condiciones ambientales

Los resultados de la determinación de la degradación del Clorpirifos bajo condiciones ambientales (Figura 37), muestran una acelerada disipación del insecticida en el suelo. Así, al tercer día de ensayo los residuos de Clorpirifos son inferiores al 50 %, con respecto al inicialmente agregado al suelo. Al final del ensayo, el porcentaje de Clorpirifos remanente en el suelo fue de 19 %.

Los testigos presentaron una rápida degradación durante el primer día de ensayo, en este día los residuos de Clorpirifos en suelo disminuyeron de un 100 % a un 86 %. Este porcentaje de residuos se mantuvo en un 84 % hasta el día 37. Al fin del ensayo, el Clorpirifos presente en el suelo alcanzó un 68 % (Figura 37).

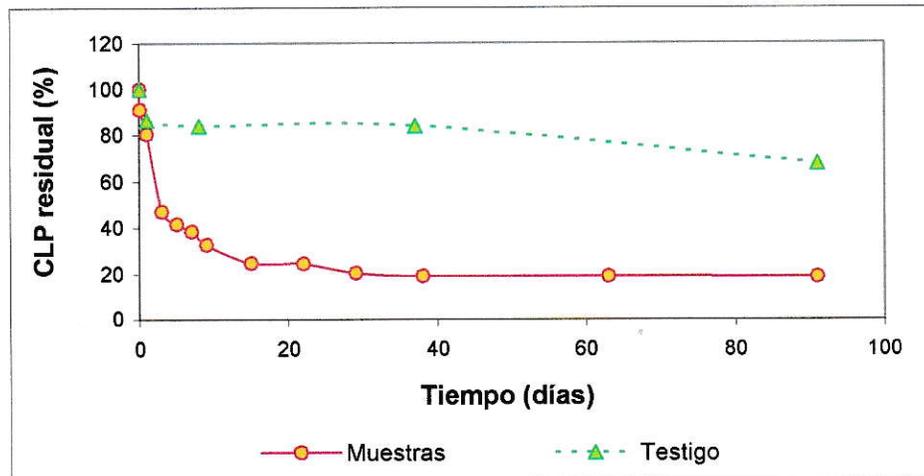


Figura 37. Clorpirifos residual en el suelo en condiciones ambientales.

Así, el porcentaje de residuos de Clorpirifos en el suelo testigo, disminuyó un 32 %, desde el inicio del ensayo al día 91 (Figura 37). Este 32 %, se atribuye a procesos de hidrólisis química y fotodegradación. La volatilización, lixiviación y difusión, como posibles rutas de disipación, se descartan en este caso, ya que el suelo testigo fue puesto en frascos herméticos.

La diferencia en la degradación de Clorpirifos entre muestras y testigos (Figura 37), indica la gran participación que ejercen los microorganismos sobre la disipación de Clorpirifos en el suelo, bajo estas condiciones de ensayo. En otros estudios, citados por Racke (1993), donde se compara la degradación de Clorpirifos en suelos estériles y no estériles, se encontró tiempos de vida media significativamente largos en suelos estériles versus los presentados en suelos naturales, reafirmando así, la importancia de la acción microbiana en la disipación del Clorpirifos.

La proporción de residuos extraíbles y ligados al suelo, determinadas bajo condiciones ambientales, se presenta en la Figura 38.

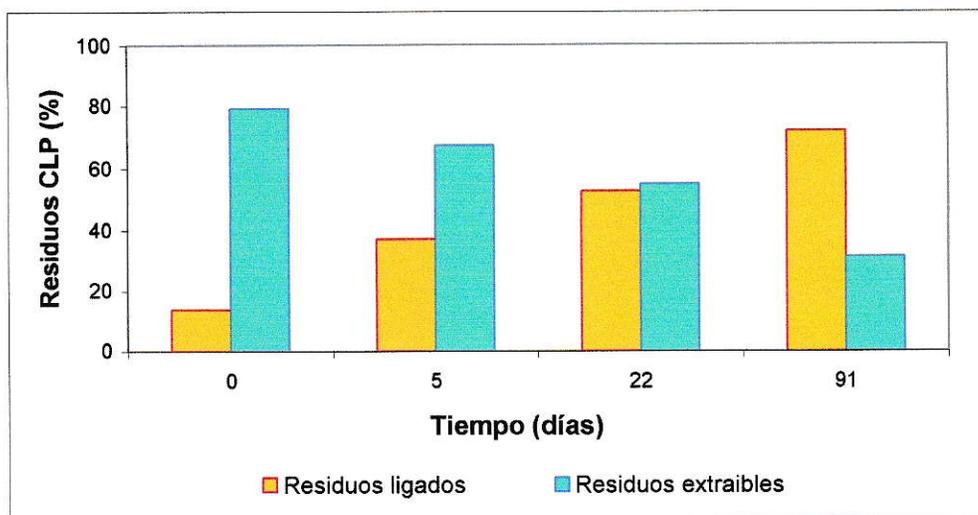


Figura 38. Residuos ligados y extraíbles de Clorpirifos en condiciones ambientales.

Así es posible observar los cambios en las proporciones de residuos ligados y extraíbles, en el tiempo. En un comienzo la fracción de residuos extraíbles (79 %) es considerablemente mayor a la de residuos ligados (14 %). Esta diferencia disminuye paulatinamente durante el transcurso del ensayo, llegando a igualarse en el día 22, y revirtiéndose hacia el fin del ensayo, donde la fracción de residuos ligados supera la de residuos extraíbles (72 % y 31 %, respectivamente), ya que el Clorpirifos extraíble ha sido degradado en su mayoría.

4.7 Comparación entre los ensayos de biodegradación bajo condiciones controladas y degradación bajo condiciones ambientales de Clorpirifos

En la Tabla 6, se presenta un resumen de los valores obtenidos al término de los ensayos de biodegradación en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales, expresados en porcentaje con respecto al Clorpirifos aplicado inicialmente al suelo.

Tabla 6. Biodegradación de Clorpirifos en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales (%).

Determinación	Condiciones Controladas (%)	Condiciones Ambientales (%)
CLP total biodegradado	46	nd
CLP total degradado	nd	81
CLP final remanente en el suelo	54	19
Residuos ligados	25	13
Residuos extraíbles	25	6

nd : no determinado

Al final del ensayo en condiciones controladas el porcentaje de Clorpirifos biodegradado y el remanente en el suelo fue de 46 % y 54 % respectivamente, mientras que en el ensayo bajo condiciones ambientales el porcentaje de degradación fue muy superior al de residuos (81 % sobre 19 %) (Tabla 6).

La degradación de Clorpirifos en suelos puede ser por medio de procesos bióticos y abióticos. Siendo el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) el principal metabolito, originado por hidrólisis en ambos casos. Existen estudios que indican que la división y mineralización del anillo heterocíclico, presente en la molécula de Clorpirifos, ocurre a través de la actividad de los microorganismos del suelo. Así, el rol más importante de los microorganismos, en la ruta de degradación del Clorpirifos, es promover la mineralización de los metabolitos TCP y TMP (3,5,6- tricloro-2-metoxipiridina) (Racke, 1993).

Respecto a los residuos de Clorpirifos extraíbles y ligados al suelo. Al fin del ensayo bajo condiciones controladas estos se encuentran en igual porcentaje (25 %), mientras que en el ensayo bajo condiciones ambientales, el 19% de Clorpirifos residual, se encuentra repartido en un 6 % extraíble y 13 % ligado al suelo (Tabla 6).

Si bien los residuos ligados se presentan en porcentajes muy inferiores a los determinados para el Glifosato (Tabla 3), de igual manera son influyentes en los procesos de disipación del Clorpirifos en el suelo. La importancia de la adsorción se debe a que afecta directa o indirectamente a los procesos de lixiviación, volatilización y

degradación, en especial la biodegradación, la que se ve disminuida y/o retardada, ya que el plaguicida adsorbido es inaccesible para los microorganismos.

Es conocido que la adsorción del Clorpirifos es un proceso que está influenciado por las propiedades intrínsecas del insecticida, factores ambientales y propiedades del suelo, sin embargo, los mecanismos involucrados en la adsorción del Clorpirifos al suelo no han sido extensamente investigados (Racke, 1993).

Los plaguicidas organofosforados, se adsorben en el espacio interlamilar de los silicatos laminares expandibles (montmorillonita, vermiculita) sustituyendo el agua de hidratación de los cationes de cambio, teniendo lugar la interacción a través de los grupos funcionales P=O (fosfato) y P=S (tiofosfato) de la molécula orgánica y los cationes de cambio, bien directamente o a través de puentes de hidrógeno. En algunos casos, simultáneamente a la formación de estos complejos, tiene lugar la descomposición del compuesto vía hidrólisis. Como consecuencia de la formación de fuertes enlaces arcilla-molécula orgánica, puede producirse el debilitamiento de ciertos enlaces, dentro de la molécula orgánica dando lugar a su descomposición (Sánchez Martín y Sánchez Camazano, 1984).

Por otro lado, se ha observado que los plaguicidas orgánicos, no iónicos, como el Clorpirifos, presentan una alta afinidad por la materia orgánica y en menor medida por las arcillas del suelo. Además, cuando el contenido de materia orgánica del suelo es elevado, como el suelo en estudio (4,2 %), la adsorción podría tener lugar

principalmente en las superficies orgánicas, enmascarando el efecto de la adsorción por superficies minerales (Sánchez Martín y Sánchez Camazano, 1984).

En estudios posteriores, Sánchez Martín y Sánchez Camazano (1991) (citado por Camarda, 2005), concluyeron que los plaguicidas organofosforados que presentan enlaces tipo P=S en su estructura son adsorbidos fuertemente por la materia orgánica que contiene el suelo, principalmente por los ácidos fúlvicos a través de residuos ligandos.

Las diferencias entre los ensayos de degradación de Clorpirifos bajo condiciones controladas y ambientales, se deben a las distintas condiciones de humedad, temperatura y radiación solar, a las que fueron expuestas las muestras (Tabla 4).

Según Awasthi y Prakash (1997), la habilidad de un suelo para catalizar la degradación de Clorpirifos, depende de un número de factores, tales como: cantidad de arcilla, tipo de arcilla, contenido de materia orgánica, pH y contenido de humedad del suelo. De estos factores, sólo el contenido de humedad varió entre un ensayo y otro. Por un lado la escasez de agua en el ensayo bajo condiciones ambientales, provoca una disminución de la actividad microbiana, ya que el agua es indispensable para el desarrollo de los organismos vivos (Varnero, 1992). Sin embargo, la mayor degradación del Clorpirifos en condiciones de baja humedad se debe a la aceleración de la degradación hidrolítica (Racke, 1996).

Otras publicaciones han informado la aceleración de la degradación hidrolítica en suelos con baja humedad para otros plaguicidas órgano-fosforados como paratión (Mingelgrin y Saltzman, 1979) y fosforotioato (Rosenfield y van Valkenburg, 1965). La explicación de este mecanismo de hidrólisis de órgano-fosforados bajo estas condiciones se ha focalizado en la fracción mineral de arcilla del suelo, específicamente en el estado de hidratación y la composición de la superficie-contracción. La Teoría de Camazano y Martin (1983) (citado por Racke, 1996), dice que la interacción arcilla/catión/OP que ocurre en esta zona puede aumentar la naturaleza electrofílica del átomo de fósforo del plaguicida, facilitando el ataque nucleofílico por el ión hidroxilo.

La radiación solar puede provocar la fotodescomposición del Clorpirifos, sin embargo en superficies de suelo seco el Clorpirifos es poco susceptible a sufrir este tipo de degradación (Racke, 1993).

Las altas temperaturas registradas en los meses en que se desarrolló el ensayo bajo condiciones ambientales (Tabla 4) favorecen la rápida y mayor degradación de Clorpirifos bajo estas condiciones versus condiciones controladas. A los 10 °C de temperatura la actividad microbiana comienza a aumentar hasta llegar a un máximo entre los 25-35 °C donde se encuentra el óptimo de temperatura para el crecimiento de la mayoría de microorganismos (Mora, 2007). Por otra parte, como la adsorción es un proceso exotérmico, el incremento de temperatura favorece la desorción del adsorbato (Tubert y Talanquer, 1997). Así, el Clorpirifos desorbido tiene mayor probabilidad de volatilizarse y ser degradado.

4.8 Comparación de los ensayos de biodegradación en condiciones controladas y degradación en condiciones ambientales de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos

En el ensayo bajo condiciones controladas se observó gran similitud en los resultados obtenidos, para Glifosato y Clorpirifos, en la determinación de la biodegradación. En ambos casos, las curvas de biodegradación fueron similares a las encontradas por otros autores y presentaron la forma típica de este tipo de curvas.

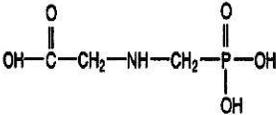
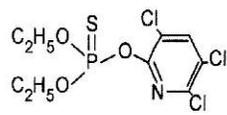
La mayor diferencia encontrada en este ensayo, entre los plaguicidas en estudio, fueron los porcentajes en las fracciones correspondientes a residuos extraíbles y ligados al suelo. Diferencia que se vio aumentada en el ensayo bajo condiciones ambientales, la cual tuvo como consecuencia una baja degradación de Glifosato y una alta degradación de Clorpirifos.

Así, los procesos de adsorción- desorción, son determinantes en la diferente evolución de los plaguicidas estudiados, bajo iguales condiciones ambientales, ya que este proceso influye directa o indirectamente en la magnitud y efecto de los otros procesos que rigen la evolución de los plaguicidas en el suelo. Estos procesos afectan particularmente la degradación de los plaguicidas, en unos casos, impidiéndola o retrasándola, ya que mientras que estos compuestos están adsorbidos los mecanismos de descomposición de los mismos o no pueden actuar o actúan más lentamente. En otros casos, como sucede con Clorpirifos, la adsorción puede aumentar la degradación del plaguicida, ya que los

minerales de la arcilla pueden catalizar su descomposición por medio de la formación de enlaces arcilla-molécula orgánica que debilitarán ciertos enlaces dentro de la molécula.

Al igual que los otros procesos que rigen la evolución de los plaguicidas en el suelo, la adsorción depende tanto de factores relacionados con el medio (los que ya fueron descritos), como de factores relacionados con las propiedades físicas y químicas de cada plaguicida (Tabla 7).

Tabla 7. Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos

Propiedades fisicoquímicas	Glifosato	Clorpirifos
Estructura molecular		
Masa molar (g mol ⁻¹)	169,1	350,59
*Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	12000	1,2
Coefficiente de partición octanol/agua (Kow)	5,6 x 10 ⁻⁴	50.000
*Presión de vapor (mmHg)	3,0 x 10 ⁻⁷	2,0 x 10 ⁻⁵

(*) valores determinados a 25°C

El pequeño tamaño y polaridad de la molécula de Glifosato permiten su penetración en la interlámina y favorecen la adsorción a las arcillas, a través de complejos estables con metales como el Al^{+3} y Fe^{+3} . Además, Glifosato se une a la materia orgánica del suelo, principalmente, por puentes de hidrógeno con las sustancias húmicas (Piccolo y col., 1996. citado por Prata y col., 2005). Por otra parte, el Glifosato presenta una alta solubilidad y bajo coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}), describen una mayor afinidad por la fase soluble del suelo.

Mientras, el mayor tamaño y apolaridad de la molécula de Clorpirifos limitan la adsorción de este a las arcillas del suelo, su mayor masa molar es una característica de los plaguicidas que generalmente esta asociada a una mayor adsorción. Por otra parte, Clorpirifos presenta una baja solubilidad en agua y un moderadamente alto K_{ow} , el cual proporciona una estimación de la posible distribución del contaminante entre el suelo (materia orgánica) y el agua. Estas propiedades dan cuenta de la tendencia de Clorpirifos a adsorberse en el suelo.

En general los plaguicidas que presentan una presión de vapor mayor a $1,0 \times 10^{-4}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ son susceptibles a volatilizarse. Según esto, ambos plaguicidas no son volátiles. Sin embargo, Clorpirifos bajo ciertas condiciones de temperatura y periodo de exposición podría ser volátil.

4.9 Discusión General

En el presente trabajo se determinó la biodegradación de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos en un suelo agrícola de la VI Región bajo condiciones constantes de humedad, temperatura y oscuridad, utilizando para su detección y cuantificación técnicas isotópicas. Paralelamente, mediante las mismas técnicas isotópicas, se determinó la degradación de ambos plaguicidas, bajo condiciones ambientales de humedad, temperatura y radiación solar, en el mismo suelo agrícola. Conjuntamente se determinó los residuos extraíbles y ligados al suelo de ambos plaguicidas. Así, fue posible analizar cómo las propiedades del suelo Serie La Lajuela, las características intrínsecas de Glifosato y Clorpirifos y los factores del medio, influyen en los procesos que rigen la evolución de los plaguicidas en el suelo, principalmente en la degradación y biodegradación. Según los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1. Respecto a los ensayos con Glifosato, donde se registraron porcentajes de biodegradación y degradación, de 50 % y 3 % bajo condiciones controladas y ambientales respectivamente, se concluye que:

- a. La biodegradación es efectivamente la principal ruta de degradación de Glifosato en el suelo, la cuál se encuentra estrechamente relacionada con la cantidad del herbicida en la fase lábil (Glifosato extraíble).

- b. La presencia de montmorillonita, el alto contenido de MO, el pH del Suelo Serie La Lajuela y la presencia del grupo fosfonometil en la molécula de Glifosato, son factores que favorecen el proceso de adsorción, el cuál es un proceso determinante en la degradación tanto biótica como abiótica de Glifosato. Según la magnitud del proceso la degradación puede ser retrasada o inhibida.
 - c. Los factores del medio como humedad, temperatura y radiación solar son determinantes en el comportamiento de Glifosato en el suelo influyendo directamente sobre los procesos de degradación de este o indirectamente a través de la adsorción. En este caso, una disminución en el contenido de humedad del suelo, y la exposición de las muestras a una mayor temperatura y radiación solar provocó un aumento de los residuos ligados al suelo en un 26 %, en comparación con las muestras incubadas bajo condiciones controladas.
 - d. La gran tendencia de Glifosato a ligarse con la fracción coloidal del suelo, a pesar de su alta solubilidad, presenta como ventaja la improbable lixiviación de este hacia las capas freáticas, impidiendo su contaminación. Sin embargo, esta fuerte adsorción, lentamente reversible y bajo ciertas condiciones irreversible, provoca una mayor persistencia de Glifosato en el suelo.
2. Respecto a los ensayos con Clorpirifos, donde se registraron porcentajes de biodegradación y degradación, de 46 % y 81 % bajo condiciones controladas y ambientales respectivamente, se concluye que:

- a. La biodegradación es una importante ruta de disipación de Clorpirifos en el suelo, junto con la hidrólisis química.
- b. El alto contenido de MO del suelo, la lipofilicidad y la presencia del enlace P=S en la molécula de Clorpirifos, son factores que favorecen el proceso de adsorción, retardando la biodegradación. Clorpirifos presentó un 25% y 13% de residuos ligados al suelo, bajo condiciones controladas y ambientales, respectivamente.
- c. Los factores del medio como humedad, temperatura y radiación solar son influyentes en el comportamiento de Clorpirifos en el suelo. La disminución en el contenido de humedad del suelo, y la exposición de las muestras a una mayor temperatura y radiación solar provocó una acelerada degradación de Clorpirifos. El aumento de la temperatura provoca una mayor desorción, dejando a este insecticida disponible para los microorganismos. Además, en condiciones de escasa humedad se ve aumentada la naturaleza electrofílica del átomo de fósforo de Clorpirifos favoreciendo el proceso de hidrólisis.

3. Con respecto a las características intrínsecas de los plaguicidas Glifosato y Clorpirifos es posible concluir que estas cumplen un rol importante en el comportamiento de los mismos. Si bien en el ensayo bajo condiciones controladas los porcentajes de biodegradación fueron similares para ambos plaguicidas, en el ensayo bajo condiciones ambientales se presentó una situación completamente distinta: una rápida degradación de Clorpirifos y una casi nula degradación de Glifosato.

4. Respecto a las técnicas isotópicas utilizadas en las determinaciones de biodegradación y degradación de Glifosato y Clorpirifos, se comprobaron sus ventajas, las cuales permiten detectar y cuantificar de manera precisa los plaguicidas en estudio. Considerando un límite de detección de $5,7 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$ y límite de cuantificación de $1,9 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ para (^{14}C) Glifosato y un límite de detección de $9,8 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ y límite de cuantificación de $3,3 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ para (^{14}C) Clorpirifos.

V. CONCLUSIONES

Las técnicas isotópicas utilizadas en las determinaciones de biodegradación y degradación de Glifosato y Clorpirifos constituyen una buena alternativa de detección y cuantificación de plaguicidas en sistemas ambientales, presentando bajos límites de detección y cuantificación, además de baja variabilidad entre mediciones.

Los procesos de biodegradación y degradación de Glifosato y Clorpirifos en el Suelo Serie La Lajuela están condicionados por factores del medio, como humedad, temperatura y radiación solar. Además cada plaguicida estudiado presenta distinta estabilidad y comportamiento en iguales condiciones debido a las diferencias en sus propiedades físicas y químicas.

Finalmente, se concluye que una condición necesaria, previa a la aplicación de Glifosato y Clorpirifos, es conocer el comportamiento de ellos, principalmente de los procesos de degradación y biodegradación, tomando en cuenta los factores ambientales y las características del suelo. Así, el conocimiento de estos aspectos daría lugar a un mayor beneficio, con los mínimos riesgos para la salud y el ambiente de “presente y futuro”.

VI. REFERENCIAS

AFIPA- Chile, 1999. Manual Fitosanitario. Asociación Nacional de Fabricantes e importadores de Productos Fitosanitarios Agrícolas (AFIPA), Santiago, Chile. 731p.

Afonso, M., Khoury, G., Gheris, T. y Tribe, L. 2005. Modelado Molecular de la Adsorción de Glifosato sobre Montmorillonita. XIV Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. C 129, (11- 14 de Abril 2005, Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina).

Alay, R., Otárola, S. y Piñones, O. 2006. Manual Básico de Protección Radiológica. Pp 112- 113.

Andreu, V. y Picó, Y. 2004. Determination of pesticides and their degradation products in soil: Critical review and comparison of methods. *Trens in Analytical Chemistry*. Rev. 23: 10- 11.

Awasthi, M. y Prakash, N. 1997. Persistence of Chlorpyrifos in Soils under Different Moisture Regimes. *Pesticide Science*. Rev. 50: 1- 4.

Bridges, J.S. y Dempsey, C.R. 1998. Pesticide waste disposal technology. Environmental Protection Agency. Editorial Park Ridge. Pp: 56- 57.

Bowman, B.T. y Sans, W.W. 1989. Partitioning behaviour of insecticides in soil-water systems. 1. Adsorbent concentration effects. *J. Environ. Qual. Rev.* 14: 265- 269.

Camarda, G. 2005. Determinación de la vida media del pesticida Clorpirifos (^{14}C) en un suelo agrícola de la VI Región mediante el uso de técnicas isotópicas. Seminario de Título entregado a la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para optar al título de Químico Ambiental. 111p.

Calderón, M.J., Quintana, M.A., Lopez- Piñeiro, A., Hermosín, M.C. y Cornejo, J. 2005. Estudio preliminar sobre el comportamiento del herbicida Glifosato en dos suelos de Extremadura. Pp 23- 28. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo* Vol. VII. F.J. Samper Calvete y A. Paz González.

Carazo, E., Flores, E., Wiend, F.M., Lord, K.A. y Bromilow, R. 1982. Degradación y Comportamiento de ^{14}C - Carbaril en dos suelos Brasileños. *Agronomía Costarricense*. Rev. 6: 81-86.

Casanova, M., Vera, W. y Luzio, W. 2006. Rasgos morfológicos de los suelos. Pp: 43 - 90. En: Avances en el conocimiento de los suelos de Chile. Luzio, W. y Casanova, M. (Eds.). Santiago- Chile. 393 p.

CIREN- Chile. 1996. Estudios Agrológicos, VI Región. Tomos I y II. Centro de Información de recursos naturales, Chile. Publicación 114. 476p.

Cornejo, J. 2001. Dinámica de los plaguicidas en ecosistemas terrestres. Mesa Redonda: Problemática ambiental y de salud en el uso de plaguicidas persistentes. Congreso Implementación del Convenio de Contaminantes Orgánicos Persistentes (26 y 27 de Noviembre 2001, Madrid).

Cornejo, J., Hermosín, M.C., White, J.L., Barnes, J.R. y Hem, S.L. 1983. Role of ferric iron in oxidation of hydrocortisone by sepiolite and palygorskite. Clays and clay mineral. Rev. 31: 109- 112.

Chorbadjian, R. y Kogan, M. 2001. Pérdida de actividad del Glifosato debido a la presencia de suelo en el agua de aspersión. Ciencia e Investigación Agraria. Rev. 28: 83- 87.

Eberbach, P. 1998. Applying Non-steady- state Compartmental Analysis to Investigate the Simultaneous Degradation of Soluble and Sorbed Glyphosate (N-(Phosphonomethyl)glycine) in Four Soils. Pesticide Science. Rev. 52: 229- 240.

EPA. 1993. Registration Eligibility Decision (RED). 291 p.

European Commission. 2002. Health & Consumer Protection Directorate –General. Appendix I. Identity, physical and chemical properties.

FAO/IAEA. 2001. Agriculture and Biotechnology Laboratory. Manual. Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition. Pp 1- 10.

FAO. 2005. Optimización de la humedad del suelo para la producción vegetal. El significado de la porosidad del suelo. Boletín de Suelos de la FAO 79. Glosario.

Geisy, J.P., Dobson, S. y Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology. Rev. 167:35- 120.

Jassie, L., Revesz R., Kierstead, T., Hasty, E., Matz, S., 1997. Capítulo 12: Microwave-Assisted Solvent Extraction. Pp: 569- 609. En: Microwave. Enhanced Chemistry. HMo (Skip) Kingston and Stephen J. Haswell (Eds.). USA, Washington D.C. 772 p.

Jury, W.A., Spencer, W.F. y Farmer, W.J. 1983. Behavior assessment model for trace organics in soil. I. Model description. J. Environ. Qual. Rev. 12, 558- 564.

- Kogan, M. y Pérez, A. 2003. *Herbicidas, Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Chile, Ediciones Universidad Católica de Chile. Pp 190-192.
- Landry, D., Dousset, S., Fournier, J.C. y Andreux, F. 2005. Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne- Romanée, 21- France). *Environmental Pollution*.
- MINAGRI- SAG. 2006. Declaración de ventas de plaguicidas año 2004. 152 p.
- Mingelgrin, U. y Saltzman, S. 1979. Surface reactions of parathion on clays. *Clays and Clay minerals*. Rev. 27 (1): 72-78.
- Mora, J. 2007. La Actividad Microbiana: Un indicador integral de la calidad del suelo. [En línea] <http://lunazul.ucaldas.edu.co> (Consulta: Mayo 2007).
- Navarro, S., Vela, N. y Navarro, G. 2007. Review. An Overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*. Rev. 5(3): 357-375.
- OECD. 2002. Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil. Guidelines for the testing of chemicals. [En línea] <http://oecd.org/dataoecd/44/8/2741293.pdf> (Consulta: Octubre 2006).
- Pino, I., Albornoz, M., Bunedu, M., Parada, A.M. y Vivallo, L. 1992. Curso Regional de Capacitación OIEA/FAO en el uso de isótopos y técnicas de radiación en estudios de productividad de suelo y plantas. RLA/5/029. II.a. Determinación de la eficiencia de conteo por extinción química.
- Prata, F., Lavorenti, A., Borges, J., Vereecken, H., Tornisielo, V. y Pelissari, A. 2005. Glyphosate behavior in a rhodic oxisol under no-till and conventional agricultural systems. *R. Bras. Ci. Solo*. Rev. 29: 61- 69.
- R.J. Harvey Instrument Corporation. 2002. Biological Material Oxidizer OX-500 Operating Manual. Pp: 22.
- Racke, K.D., Laskowski, D.A. y Schultz, M.R. 1990. Resistance of Chlorpyrifos to Enhanced Biodegradation in Soil. *J.Agric. Food. Chem*. Rev. 38: 1430- 1436.
- Racke, K.D. 1993. Environmental fate of Chlorpyrifos. *Environmental Contamination and Toxicology*. Rev. 131: 1- 125.
- Racke, K.D., Steele, K.P., Yoder, R., Dick, W. y Avidov, E. 1996. Factors Affecting the Hydrolytic Degradation of Chlorpyrifos in Soil. *J.Agric. Food. Chem*. Rev. 44: 1582 – 1592.

Rosenfield, C., van Valkenburg, W. 1965. Descomposición of (*O,O*- dimethyl-*O*-2,4,5-trichlorophenyl) phosphorothioate (runnel) adsorbed on bentonite and other clays. *J.Agric. Food. Chem. Rev.* 13: 68 – 72.

Rueppel, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J. y Marvel, J.T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. Rev.* 25: 517- 528.

Sadzawka, A., Grez, R., Mora, M., Saavedra, N., Carrasco, M. y Rojas, C. 1998. Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Método 2. Método 3. Método 7.

Sadzawka, A. 2006 a. Propiedades físico-químicas de los suelos. I: Reacción (pH), acidez y alcalinidad. Pp: 91-127. En: Avances en el conocimiento de los suelos de Chile. Luzio, W. y Casanova, M. (Eds.). Santiago- Chile. 393 p.

Sadzawka, A. 2006 b. Propiedades físico-químicas de los suelos. II: Adsorción e Intercambio iónico. Pp: 129-157. En: Avances en el conocimiento de los suelos de Chile. Luzio, W. y Casanova, M. (Eds.). Santiago- Chile. 393 p.

SAG. 2002. Manual de capacitación para el buen uso y manejo de plaguicidas. Lección 9. Seguridad Ambiental. Pp 217- 234.

Sánchez Martín, M.J. y Sánchez Camazano, M. 1984. Los Plaguicidas. Adsorción y Evolución en el Suelo. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. [En línea] <http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/plaguicidas.pdf> (Consulta: Junio 2007).

Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A. y Wright, D.J. 2003. Effects of Soil pH on the Biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology. Rev.* 69: 5198- 5206.

Skoog, D. y Leary, J. 1991. Análisis Instrumental. Editorial Mc Graw Hill. Cuarta Edición. Pp 785- 789.

Solomon, K., Anadón, A., Cerdeira, A.L., Marshall, J. y Sanín, L.H. 2005. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PEIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA). Washington, D.C., Estados Unidos de América. 143 p.

Sørensen, S., Schultz, A., Jacobsen, O. y Aamand, J. 2006. Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides Glyphosate and MCPA in simples from two Danish soil and subsurface profiles. *Environmental Pollution. Rev.* 141: 184- 194.

Steubing, L., Godoy, R. y Alberdi, M. 2002. Capítulo III. Factores Edáficos. Pp: 93 – 157. En: *Métodos de Ecología Vegetal*. Universidad Austral de Chile. Editorial Universitaria. Santiago – Chile. 343 p.

Varnero, M.T. 1992. Capítulo VIII. El suelo como sistema biológico. Biblioteca Digital de la universidad de chile. [En línea] http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/miscelaneasagronomicas38/C8.html. (Consulta: 12 Junio 2007).

Tubert, I. y Talanquer, V. 1997. Sobre adsorción. *Educación Química. Rev.* 8 (4): 186-190.

Wiersema, R., Burns, M. y Hershberger, D. 2006. Glyphosate Pathway Map. University of Minnesota. [En línea] http://umbbd.msi.umn.edu/gly/gly_map.html. (Consulta: Noviembre 2006).

ANEXOS

Anexo I. Cálculos Desarrollados

1. Determinación del Factor de Combustión (FC)

La determinación del FC se realizó según los siguientes pasos:

- Se promediaron los valores (dpm) obtenidos para el estándar directo (STDd) en las dos mediciones

$$\text{STDd}_1 + \text{STDd}_2 / 2 = \text{STDd}$$

- Se promediaron los valores (dpm) obtenidos para el estándar combustionado (STDc) en las dos mediciones y se le restó el valor del manitol

$$\text{STDc}_1 + \text{STDc}_2 / 2 = \text{STDc}^*$$

$$\text{STDc}^* - \text{manitol} = \text{STDc}$$

- Finalmente se calculó el valor del FC

$$\text{FC} = \text{STDd} / \text{STDc}$$

Se considera aceptable un valor de FC comprendido entre 0,8 y 1,3 (R.J. Harvey Instrument Corporation, 2002)

2. Determinación de humedad

El contenido de humedad del suelo se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad del suelo (\%)} = \frac{a-b}{b-c} \times 100$$

Donde:

a = masa (g) del suelo seco al aire más masa (g) del recipiente.

b = masa (g) del suelo seco a 105 °C aire más masa (g) del recipiente.

c = masa (g) del recipiente.

3. Determinación del factor de corrección por humedad (fh)

El cálculo del fh se realizó según la siguiente ecuación:

$$\text{fh} = \frac{100 + \text{humedad del suelo (\%)}}{100}$$

4. Determinación de la masa de suelo seco a 105 °C

La masa de de suelo seco a 105 °C se calculó a partir del peso de suelo seco al aire corregido por el fh, como se indica a continuación:

$$\text{Masa de suelo seco a 105 °C (g)} = \frac{100}{Fh}$$

Donde el valor 100 corresponde a la masa en gramos de la muestra de suelo seco al aire

5. Determinación del volumen (ó masa) de agua necesaria para llevar el suelo a 75% CC

Se calcula la masa real de agua presente en la muestra de suelo seco al aire:

$$\text{Masa real de agua presente en suelo seco al aire (g)} = [100 - \text{Masa suelo seco a 105°C (g)}]$$

Posteriormente se calcula la masa de agua necesaria para llevar la muestra de suelo a un determinado % de la CC total, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Masa de agua (g ó mL)} = \frac{(A \times B)}{D} - C$$

Donde:

A= masa de suelo seco a 105 °C (g) corregido por el factor de humedad (fh)

B= % de la CC que desea llevar la muestra de suelo

C= masa de agua real que contiene la muestra de suelo seco al aire (g)

D= masa de suelo seco al aire (g)

6. Cálculo porcentual de las mediciones

Para calcular la biodegradación, degradación y residuos de ambos plaguicidas en porcentaje se asignó con un 100% a la actividad (dpm) medida en el tiempo cero. Luego, el porcentaje biodegradado, degradado o residual de plaguicida, a cualquier tiempo, se obtiene convirtiendo la actividad medida en porcentaje como se indica en el siguiente ejemplo.

Residuos de Clorpirifos bajo condiciones controladas (Figura 35)

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)
0	1	2378,28	2430,74
	2	2444,47	
	3	2413,61	
	4	2486,59	
6	1	2021,10	2012,27
	2	1992,90	
	3	2022,81	
14	1	1885,79	1834,71
	2	1763,80	
	3	1854,53	

a) Cálculo de porcentaje de residuos de Clorpirifos para el sexto día de ensayo

$$2430,74 \text{ dpm} \rightarrow 100 \%$$

$$2012,27 \text{ dpm} \rightarrow x \%$$

$$x = 82,78 \%$$

b) Cálculo de porcentaje de residuos de Clorpirifos para el día 14 de ensayo

$$2430,74 \text{ dpm} \rightarrow 100 \%$$

$$1834,71 \text{ dpm} \rightarrow x \%$$

$$x = 75,47 \%$$

Anexo II. Tablas de datos experimentales

I. Determinación de la Biodegradación de Glifosato bajo condiciones controladas

a. Biodegradación de Glifosato (datos correspondientes a Figura 26).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
1	1	1355,17	1389,75	53,96	3,90	3,07	3,1
	2	1362,16					
	3	1451,93					
3	1	2570,08	2993,72	383,91	12,82	6,76	9,8
	2	3403,48					
	3	2662,32					
	4	3357,06					
	5	2975,66					
6	1	2110,54	2223,59	112,50	5,06	4,99	14,8
	2	2110,54					
	3	2110,54					
	4	2110,54					
8	1	1084,66	1215,19	103,73	8,54	2,67	17,5
	2	1182,87					
	3	1274,95					
	4	1318,29					
11	1	1575,40	1758,90	128,65	7,31	3,92	21,4
	2	1858,29					
	3	1765,14					
	4	1836,78					
14	1	1288,65	1281,98	116,53	9,09	2,83	24,2
	2	1443,26					
	3	1181,04					
	4	1214,95					
17	1	1137,69	1023,88	87,36	8,53	2,23	26,5
	2	1044,31					
	3	940,72					
	4	972,81					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
20	1	846,05	881,61	48,96	5,55	1,91	28,4
	2	845,96					
	3	884,64					
	4	949,79					
23	1	940,92	884,25	85,08	9,62	1,91	30,3
	2	925,40					
	3	786,41					
27	1	823,54	874,17	50,66	5,80	1,89	32,2
	2	918,99					
	3	837,64					
	4	916,51					
30	1	807,05	711,76	66,42	9,33	1,52	33,7
	2	673,81					
	3	706,25					
	4	659,95					
33	1	592,32	608,43	44,54	7,32	1,28	35,0
	2	638,50					
	3	553,03					
	4	649,87					
	5	760,25					
36	1	437,71	546,23	86,08	15,76	1,14	36,1
	2	555,11					
	3	494,28					
	4	579,59					
	5	664,44					
39	1	534,34	536,08	65,82	12,28	1,11	37,2
	2	644,48					
	3	466,30					
	4	513,94					
	5	521,36					
42	1	588,66	479,42	68,87	14,37	0,98	38,2
	2	496,05					
	3	456,89					
	4	406,36					
	5	449,12					
45	1	573,47	484,54	81,24	16,77	1,00	39,2
	2	561,73					
	3	433,85					
	4	386,21					
	5	467,42					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
48	1	522,27	447,51	46,70	10,44	0,91	40,1
	2	458,15					
	3	431,71					
	4	425,94					
	5	399,49					
51	1	470,94	392,90	50,68	12,90	0,79	40,9
	2	384,80					
	3	336,69					
	4	406,83					
	5	365,25					
54	1	467,80	404,44	36,12	8,93	0,81	41,7
	2	400,58					
	3	385,42					
	4	386,40					
	5	382,01					
57	1	436,82	393,76	42,58	10,81	0,79	42,5
	2	442,05					
	3	366,98					
	4	372,93					
	5	349,99					
60	1	404,83	350,08	37,72	10,77	0,69	43,2
	2	373,90					
	3	319,75					
	4	321,40					
	5	330,51					
64	1	479,69	436,22	39,63	9,09	0,88	44,1
	2	477,27					
	3	396,73					
	4	405,48					
	5	421,93					
67	1	351,69	309,54	31,71	10,24	0,59	44,7
	2	333,91					
	3	297,15					
	4	286,49					
	5	278,45					
71	1	432,90	369,06	37,70	10,22	0,73	45,4
	2	346,80					
	3	363,14					
	4	366,14					
	5	336,33					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
74	1	318,45	279,18	28,93	10,36	0,52	45,9
	2	295,01					
	3	261,77					
	4	276,82					
	5	243,86					
77	1	338,44	298,03	24,35	8,17	0,57	46,5
	2	285,67					
	3	297,76					
	4	294,13					
	5	274,14					
80	1	275,83	240,54	20,41	8,49	0,44	46,9
	2	222,87					
	3	236,70					
	4	233,48					
	5	233,82					
84	1	357,65	339,49	37,67	11,10	0,66	47,6
	2	335,31					
	3	313,89					
	4	393,29					
	5	297,30					
88	1	364,25	327,23	30,02	9,17	0,63	48,2
	2	335,87					
	3	314,85					
	4	293,97					
92	1	356,73	327,72	29,26	8,93	0,64	48,9
	2	348,52					
	3	308,06					
	4	297,58					
95	1	262,86	241,23	19,55	8,10	0,44	49,3
	2	251,51					
	3	230,94					
	4	219,62					
99	2	293,41	281,45	10,36	3,68	0,53	49,8
	3	275,97					
	4	274,99					

b. Residuos totales de Glifosato en el suelo (datos correspondientes a Figura 27).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	1890,27	2206,12	434,15	19,68	100
	2	1921,39				
	3	2186,80				
	4	2826,01				
6	1	1840,63	1890,95	71,15	3,76	83,0
	2	1941,26				
14	1	1481,12	1873,40	326,87	17,45	82,0
	2	1943,38				
	3	2195,70				
20	1	1538,66	1694,01	205,53	12,13	76,2
	2	1863,10				
	3	1680,26				
27	1	1530,37	1721,15	145,11	8,43	71,1
	2	1735,30				
	3	1883,53				
	4	1735,40				
36	1	2155,14	2011,18	200,95	9,99	70,7
	2	2212,51				
	3	1826,62				
	4	1850,47				
51	1	1489,45	1452,76	33,52	2,31	60,9
	2	1423,75				
	3	1445,07				
84	1	1510,76	1374,41	92,31	6,72	58,9
	2	1343,01				
	3	1306,50				
	4	1337,38				
99	1	1571,00	1536,57	76,41	4,97	60,8
	2	1449,00				
	3	1589,71				

c. Residuos ligados al suelo de Glifosato (% respecto al Total de Glifosato agregado inicialmente al suelo)

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos L. (%)
0	1	1774,81	1649,24	177,59	10,77	77,5
	2	1523,66				
6	1	1784,79	1820,20	50,08	2,75	79,2
	2	1855,62				
27	1	1461,80	1475,42	19,59	1,33	71,2
	2	1466,59				
	3	1497,87				
36	1	1547,31	1633,76	75,54	4,62	68,8
	2	1687,05				
	3	1666,91				
51	1	1209,04	1267,25	53,11	4,19	57,5
	2	1313,06				
	3	1279,66				
84	1	1361,11	1334,28	64,31	4,82	57,0
	2	1260,90				
	3	1380,84				
99	1	1511,41	1416,20	222,65	15,72	60,3
	2	1365,88				
	3	1371,32				

d. Residuos extraíbles de Glifosato (% respecto al Total de Glifosato agregado inicialmente al suelo)

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos E (%)
0	1	162,92	159,31	5,10	3,20	19,7
	2	155,71				
6	1	137,00	134,59	3,41	2,53	16,6
	2	132,18				
27	1	93,27	85,59	6,58	7,69	10,6
	2	75,66				
	3	79,57				
	4	88,57				
	5	88,21				
36	1	82,99	86,30	7,50	8,69	10,7
	2	92,09				
	3	77,29				
	4	92,84				
51	1	103,30	98,99	4,63	4,68	12,2
	2	93,21				
	3	102,09				
	4	97,34				
84	1	91,03	86,95	19,05	21,91	10,7
	2	66,19				
	3	103,63				
99	1	81,82	67,42	9,61	14,25	8,3
	2	63,04				
	3	62,70				
	4	62,11				

e. Balance de Residuos de Glifosato en el suelo (datos correspondientes a Figura 28).

Tiempo (Días)	Residuos					
	Ligados (dpm)	Extraíbles (dpm)	Totales (dpm)	Ligados (%)	Extraíbles (%)	Balance (%)
0	6276,23	1593,14	8710,40	72,05	18,29	90
6	6408,51	1345,92	7226,67	88,68	18,62	107
27	5761,62	855,89	6191,24	93,06	13,82	107
36	5570,10	863,00	6160,64	90,41	14,01	104
51	4651,21	989,85	5304,50	87,68	18,66	106
84	4617,35	869,49	5131,24	89,98	16,95	107
99	4884,86	674,19	5295,49	92,25	12,73	105

f. Testigos de Glifosato (datos correspondientes a Figura 26).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
1	1	261,57	327,801	59,104	18,031	0,875	0,9
	2	346,65					
	3	375,18					
5	1	1533,59	1542,864	275,543	17,859	4,716	5,6
	2	1272,08					
	3	1822,93					
10	1	1729,25	2166,985	416,935	19,240	6,689	12,3
	2	2559,42					
	3	2212,29					
16	1	1749,53	2137,823	368,493	17,237	6,597	18,9
	2	2482,66					
	3	2181,28					
22	1	1380,71	1689,371	348,651	20,638	5,179	24,1
	2	2067,54					
	3	1619,87					
29	1	1133,45	1362,613	246,847	18,116	4,147	28,2
	2	1623,99					
	3	1330,40					
35	1	814,49	969,740	163,316	16,841	2,905	31,1
	2	1140,07					
	3	954,66					
44	1	999,98	1219,398	227,480	18,655	3,694	34,8
	2	1454,16					
	3	1204,06					
50	1	560,30	666,33	108,47	16,28	1,95	36,8
	2	777,08					
	3	661,60					
56	1	498,33	547,09	68,97	12,61	1,57	38,3
	2	595,86					
63	1	598,21	616,98	110,41	17,89	1,79	40,1
	2	517,16					
	3	735,56					
70	1	602,31	525,88	86,51	16,45	1,50	41,6
	2	431,95					
	3	543,37					
76	1	460,22	450,99	82,17	18,22	1,26	42,9
	2	364,59					
	3	528,15					
83	1	438,05	442,54	78,33	17,70	1,24	44,1
	2	366,56					
	3	523,03					

98	1	829,78	745,67	118,95	15,95	2,20	46,3
	2	661,56					

2. Determinación de la Degradación de Glifosato bajo condiciones ambientales

a. Residuos totales de Glifosato en el suelo (datos correspondientes a Figura 30).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	3994,71	3695,36	217,92	5,90	100
	2	3696,35				
	3	3607,49				
	4	3482,90				
0,08	1	3586,95	3667,66	182,95	4,99	98,4
	2	3538,94				
	3	3877,09				
1	1	3963,31	3982,55	50,51	1,27	106,0
	2	3944,49				
	3	4039,85				
3	1	3758,03	3656,40	225,08	6,16	100,1
	2	3492,18				
	3	3925,10				
	4	3450,28				
5	1	3759,33	3706,56	73,33	1,98	100,3
	2	3720,75				
	3	3599,24				
	4	3746,92				
9	1	3980,08	3779,23	284,05	7,52	103,5
	2	3578,37				
38	1	3662,77	3632,16	57,26	1,58	97,3
	2	3676,57				
	3	3549,31				
	4	3640,01				
63	1	3396,04	3464,17	96,35	2,78	95,5
	2	3532,30				
91	1	3628,08	3788,17	123,16	3,25	96,9
	2	3701,08				
	3	3875,26				

b. Residuos ligados al suelo de Glifosato (% respecto al Total de Glifosato agregado inicialmente al suelo).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos L. (%)
0	1	3334,40	3469,56	183,71	5,30	90,6
	2	3678,73				
	3	3395,54				
5	1	3440,48	3422,47	63,82	1,86	91,6
	2	3372,43				
	3	3505,11				
	4	3371,85				
38	1	3195,21	3200,95	111,13	3,47	88,9
	2	3314,83				
	3	3092,80				
91	1	3385,79	3426,80	47,54	1,39	86,2
	2	3415,70				
	3	3478,92				

c. Residuos extraíbles de Glifosato (% respecto al Total de Glifosato agregado inicialmente al suelo).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos E (%)
0	1	122,44	144,19	41,36	28,69	10,2
	2	198,89				
	3	151,42				
	4	104,00				
5	1	177,73	170,76	9,14	5,35	12,0
	2	175,69				
	3	172,13				
	4	157,49				
38	1	155,26	156,92	22,28	14,20	11,0
	2	182,69				
	3	161,15				
	4	128,56				
91	1	112,68	108,58	3,53	3,25	7,6
	2	106,14				
	3	105,18				
	4	110,32				

d. Balance de Residuos de Glifosato en el suelo (datos correspondientes a Figura 31).

Tiempo (Días)	Residuos					Balance (%)
	Ligados (dpm)	Extraíbles (dpm)	Totales (dpm)	Ligados (%)	Extraíbles (%)	
0	12875,05	1441,87	14210,68	90,60	10,15	101
5	13014,76	1707,61	14247,20	91,35	11,99	103
38	12633,95	1569,16	13824,69	91,39	11,35	103
91	12253,54	1085,79	13776,87	88,94	7,88	97

e. Testigos de Glifosato (datos correspondientes a Figura 30)

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	3673,69	3852,09	277,77	7,21	100
	2	4262,00				
	3	3687,28				
	4	3785,40				
1	1	4091,59	4026,27	100,29	2,49	105,7
	2	4040,49				
	3	3880,34				
	4	4092,66				
8	1	3887,49	3849,87	49,86	1,30	102,9
	2	3879,03				
	3	3854,97				
	4	3777,99				
37	1	3520,84	3643,24	82,95	2,28	98,4
	2	3699,80				
	3	3664,09				
	4	3688,24				
91	1	4521,32	4467,99	73,30	1,64	105,0
	2	4498,24				
	3	4384,40				

3. Determinación de la Biodegradación de Clorpirifos bajo condiciones controladas

a. Biodegradación de Clorpirifos (datos correspondientes a Figura 34).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
1	1	1779,00	1787,73	11,30	0,63	3,39	3,4
	2	1783,70					
	3	1800,50					
3	1	2359,20	2248,07	72,87	3,24	4,29	7,7
	2	2267,90					
	3	2212,85					
	4	2236,77					
	5	2163,64					
6	1	3440,50	3344,11	117,84	3,52	6,43	14,1
	2	3346,59					
	3	3198,12					
	4	3476,81					
	5	3258,53					
8	1	1947,59	1819,34	102,22	5,62	3,45	17,6
	2	1699,23					
	3	1736,99					
	4	1830,15					
	5	1882,77					
11	1	1996,60	1958,83	91,82	4,69	3,72	21,3
	2	1812,91					
	3	2058,31					
	4	1986,29					
	5	1940,06					
14	1	1345,24	1278,65	67,47	5,28	2,40	23,7
	2	1235,30					
	3	1183,96					
	4	1300,64					
	5	1328,12					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
17	1	840,56	899,09	54,70	6,08	1,66	25,3
	2	914,21					
	3	926,55					
	4	968,03					
	5	846,09					
20	1	816,99	827,89	24,37	2,94	1,52	26,9
	2	846,05					
	3	825,62					
	4	856,27					
	5	794,49					
23	1	818,19	759,87	42,84	5,64	1,38	28,2
	2	738,20					
	3	792,39					
	4	722,16					
	5	728,38					
27	1	911,84	865,63	41,83	4,83	1,59	29,8
	2	822,10					
	3	882,13					
	4	891,47					
	5	820,59					
30	1	575,75	556,83	28,65	5,15	0,99	30,8
	2	588,63					
	3	515,22					
	4	560,68					
	5	543,86					
33	1	613,63	570,29	42,80	7,50	1,01	31,8
	2	511,43					
	3	585,03					
	4	600,40					
	5	540,98					
36	1	533,25	504,56	17,68	3,50	0,89	32,7
	2	506,40					
	3	493,03					
	4	487,63					
	5	502,50					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
39	1	471,06	492,08	13,86	2,82	0,86	33,6
	2	505,01					
	3	490,52					
	4	489,47					
	5	504,33					
42	1	489,86	481,33	17,63	3,66	0,84	34,4
	2	472,92					
	3	507,68					
	4	462,83					
	5	473,36					
45	1	483,49	464,43	11,03	2,38	0,81	35,2
	2	457,50					
	3	456,63					
	4	460,60					
	5	463,96					
48	1	485,15	472,87	27,08	5,73	0,82	36,1
	2	458,54					
	3	514,98					
	4	453,64					
	5	452,05					
51	1	438,59	425,47	14,13	3,32	0,73	36,8
	2	439,50					
	3	407,62					
	4	415,01					
	5	426,64					
54	1	468,77	428,32	23,63	5,52	0,74	37,5
	2	419,80					
	3	406,57					
	4	423,18					
	5	423,29					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
57	1	439,61	411,14	19,02	4,63	0,70	38,2
	2	398,82					
	3	391,87					
	4	405,34					
	5	420,08					
60	1	365,59	376,55	9,08	2,41	0,64	38,9
	2	377,69					
	3	371,28					
	4	378,35					
	5	389,86					
64	1	458,37	485,67	25,95	5,34	0,85	39,7
	2	475,04					
	3	527,68					
	4	478,04					
	5	489,21					
67	1	383,49	358,78	16,71	4,66	0,60	40,3
	2	365,41					
	3	347,12					
	4	340,82					
	5	357,04					
71	1	493,91	448,69	28,58	6,37	0,78	41,1
	2	430,87					
	3	419,27					
	4	445,31					
	5	454,09					
74	1	348,14	319,15	18,37	5,75	0,52	41,6
	2	313,87					
	3	297,25					
	4	318,26					
	5	318,23					

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
77	1	398,14	363,79	19,90	5,47	0,61	42,2
	2	351,50					
	3	350,14					
	4	363,52					
	5	355,65					
80	1	302,31	300,51	12,89	4,29	0,49	42,7
	2	315,92					
	3	286,79					
	4	288,05					
	5	309,46					
84	1	422,84	374,79	40,63	10,84	0,63	43,3
	2	377,81					
	3	386,83					
	4	376,00					
	5	310,46					
88	1	399,92	400,93	6,07	1,51	0,68	44,0
	2	402,43					
	3	393,37					
	4	408,00					
92	1	386,26	388,37	7,72	1,99	0,66	44,7
	2	379,52					
	3	398,10					
	4	389,60					
95	1	315,70	305,10	20,20	6,62	0,50	45,2
	2	305,34					
	3	322,63					
	4	276,74					
99	1	356,02	356,56	12,80	3,59	0,60	45,8
	2	340,24					
	3	358,55					
	4	371,42					

b. Residuos totales de Clorpirifos en el suelo (datos correspondientes a Figura 35).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	2378,28	2430,74	46,02	1,89	100
	2	2444,47				
	3	2413,61				
	4	2486,59				
6	1	2021,10	2012,27	16,80	0,83	82,4
	2	1992,90				
	3	2022,81				
14	1	1885,79	1834,71	63,37	3,45	72,5
	2	1763,80				
	3	1854,53				
20	1	1794,60	1807,63	11,30	0,63	71,2
	2	1813,44				
	3	1814,84				
27	1	1719,45	1771,18	51,61	2,91	69,8
	2	1822,67				
	3	1771,42				
36	1	1763,62	1814,59	54,19	2,99	61,5
	2	1871,51				
	3	1808,64				
51	1	1553,92	1577,84	46,08	2,92	60,6
	2	1534,03				
	3	1639,86				
	4	1583,55				
84	1	1410,93	1398,00	39,78	2,85	54,6
	2	1344,04				
	3	1398,22				
	4	1438,84				
99	1	1424,03	1465,65	38,30	2,61	54,4
	2	1473,49				
	3	1499,42				

c. Residuos ligados al suelo de Clorpirifos (% respecto al Total de Clorpirifos agregado inicialmente al suelo)

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	227,74	212,97	18,76	8,81	6,9
	2	191,87				
	3	219,29				
6	1	508,48	538,01	41,60	7,73	14,8
	2	502,32				
	3	549,17				
	4	592,06				
14	1	612,59	651,68	40,78	6,26	18,5
	2	693,97				
	3	648,48				
27	1	791,48	738,30	49,25	6,67	23,5
	2	729,17				
	3	694,26				
51	1	761,79	829,63	111,70	13,46	27,2
	2	931,42				
	3	917,27				
	4	708,04				
84	1	616,72	647,12	35,97	5,56	22,4
	2	637,80				
	3	686,83				
99	1	819,92	752,54	74,62	9,92	25,4
	2	672,34				
	3	765,35				

d. Residuos extraíbles de Clorpirifos (% respecto al Total de Clorpirifos agregado inicialmente al suelo)

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	879,19	881,41	7,09	0,80	86,0
	2	889,35				
	3	875,70				
6	1	667,79	669,01	22,22	3,32	65,3
	2	656,86				
	3	700,63				
	4	650,78				
14	1	519,37	538,50	46,76	8,68	52,6
	2	506,75				
	3	519,83				
	4	608,04				
27	1	441,68	407,45	28,29	6,94	39,8
	2	419,57				
	3	386,24				
	4	382,29				
51	1	317,08	336,30	34,79	10,34	32,8
	2	326,37				
	3	387,87				
	4	313,88				
84	1	282,22	295,50	30,34	10,27	28,8
	2	274,06				
	3	330,22				
99	1	240,06	253,99	17,31	6,82	24,8
	2	244,59				
	3	278,78				
	4	252,51				

e. Balance de Residuos de Clorpirifos en el suelo (datos correspondientes a Figura 36).

Tiempo (Días)	Residuos					Balance (%)
	Ligados (dpm)	Extraíbles (dpm)	Totales (dpm)	Ligados (%)	Extraíbles (%)	
0	702,10	8814,09	10244,85	6,85	86,03	93
6	1510,82	6690,13	8440,02	17,90	79,27	97
14	1893,36	5385,00	7422,85	25,51	72,55	98
20	1140,54	5665,27	7297,03	15,63	77,64	93
27	2411,14	4074,48	7152,23	33,71	56,97	91
36	1875,92	3640,69	6301,15	29,77	57,78	88
51	2789,92	3363,00	6207,64	44,94	54,18	99
84	2292,80	2955,01	5596,85	40,97	52,80	94
99	2598,13	2539,86	5576,20	46,59	45,55	92

f. Testigos de Clorpirifos (datos correspondientes a Figura 34).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
1	1	72,13	79,35	9,44	11,89	0,06	0,1
	2	90,02					
	3	75,89					
5	1	242,49	238,35	3,78	1,59	0,39	0,4
	2	237,49					
	3	235,07					
10	1	373,54	364,56	7,81	2,14	0,65	1,1
	2	359,44					
	3	360,68					
16	1	462,56	455,26	43,85	9,63	0,83	1,9
	2	408,22					
	3	495,01					
22	1	494,43	497,02	58,78	11,83	0,92	2,8
	2	439,59					
	3	557,06					
29	1	496,80	510,80	65,69	12,86	0,95	3,8
	2	453,23					
	3	582,36					
35	1	432,26	444,26	64,47	14,51	0,81	4,6
	2	386,64					
	3	513,89					
44	1	621,27	644,59	84,18	13,06	1,22	5,8
	2	574,54					
	3	737,97					

50	1	425,96	453,59	82,25	18,13	0,83	6,7
	2	388,71					
	3	546,09					
56	1	392,52	420,78	70,40	16,73	0,76	7,4
	2	368,90					
	3	500,92					
63	1	428,92	445,50	50,60	11,36	0,81	8,2
	2	405,26					
	3	502,31					
70	1	412,99	435,39	57,94	13,31	0,79	9,0
	2	392,00					
	3	501,18					
76	1	371,71	417,30	74,72	17,91	0,75	9,8
	2	376,66					
	3	503,53					
83	1	386,54	402,86	41,14	10,21	0,73	10,5
	2	372,38					
	3	449,65					
98	1	747,30	760,80	94,97	12,48	1,46	11,9
	2	673,29					
	3	861,80					

4. Determinación de la Degradación de Clorpirifos bajo condiciones ambientales

a. Residuos totales de Clorpirifos en el suelo (datos correspondientes a Figura 37).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	3817,94	3795,99	86,35	2,27	100
	2	3767,36				
	3	3696,76				
	4	3901,93				
0,08	1	3524,47	3473,73	288,82	8,31	91,0
	2	3780,57				
	3	3083,28				
	4	3506,60				
1	1	2978,63	3075,09	75,73	2,46	80,4
	2	3050,68				
	3	3135,00				
	4	3136,05				
3	1	1997,83	1783,75	284,83	15,97	47,1
	2	2060,66				
	3	1551,40				
	4	1525,12				
5	1	1671,29	1595,12	179,60	11,26	41,5
	2	1813,37				
	3	1447,95				
	4	1447,89				
7	1	1508,84	1478,35	54,90	3,71	38,5
	2	1511,25				
	3	1414,98				
9	1	1044,41	1277,56	286,29	22,41	32,8
	2	1587,45				
	3	1454,30				
	4	1024,08				
15	1	935,99	983,34	42,53	4,33	24,8
	2	1038,31				
	3	987,73				
	4	971,34				
22	1	1092,53	977,55	108,37	11,09	24,4
	2	960,78				
	3	1020,39				
	4	836,50				
29	1	715,45	811,79	64,67	7,97	20,3
	2	842,07				
	3	853,98				
	4	835,66				

38	1	850,06	779,66	108,52	13,92	19,1
	2	893,38				
	3	703,27				
	4	671,93				
63	1	784,70	767,03	43,04	5,61	19,0
	2	717,97				
	3	798,41				
91	1	766,99	751,10	22,47	2,99	18,8
	2	735,21				

b. Residuos ligados al suelo de Clorpirifos (% respecto al Total de Clorpirifos agregado inicialmente al suelo).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos L. (%)
0	1	752,84	911,58	208,35	22,86	13,7
	2	715,99				
	3	1044,04				
	4	1133,45				
5	1	748,47	783,34	23,72	3,03	15,4
	2	794,21				
	3	801,06				
	4	789,62				
38	1	835,15	804,29	86,23	10,72	12,8
	2	676,72				
	3	838,43				
	4	866,85				
91	1	848,63	846,49	3,02	0,36	13,5
	2	844,35				

c. Residuos extraíbles de Clorpirifos (% respecto al Total de Clorpirifos agregado inicialmente al suelo).

Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos E (%)
0	1	1175,55	1238,89	87,21	7,04	79,2
	2	1166,07				
	3	1260,96				
	4	1352,98				
5	1	417,87	438,43	23,12	5,27	28,0
	2	414,96				
	3	461,37				
	4	419,45				
	5	432,82				
	6	450,19				
	7	431,58				
	8	479,22				
22	1	233,81	209,95	31,21	14,86	13,4
	2	232,94				
	3	205,57				
	4	167,47				
91	1	92,41	91,89	5,28	5,75	5,9
	2	90,10				
	3	98,82				
	4	86,22				

d. Balance de Residuos de Clorpirifos en el suelo (datos correspondientes a Figura 38).

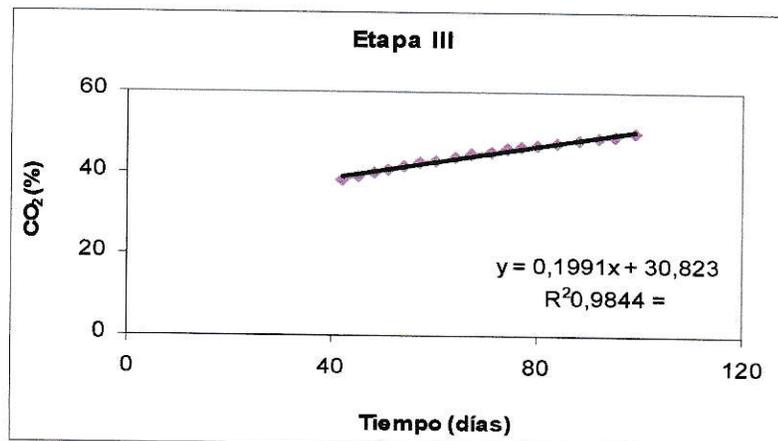
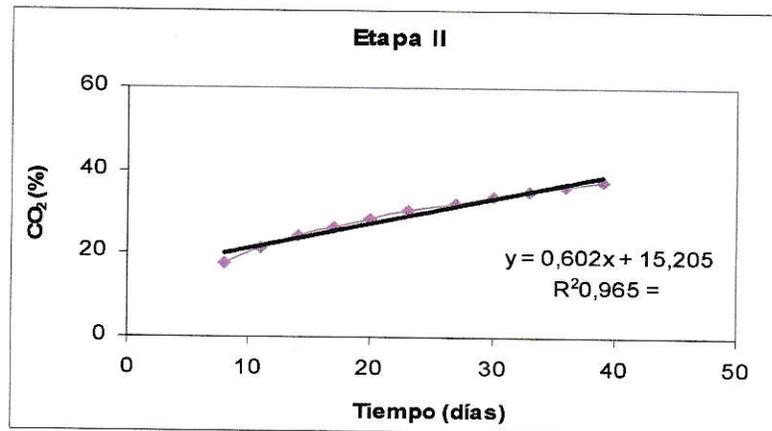
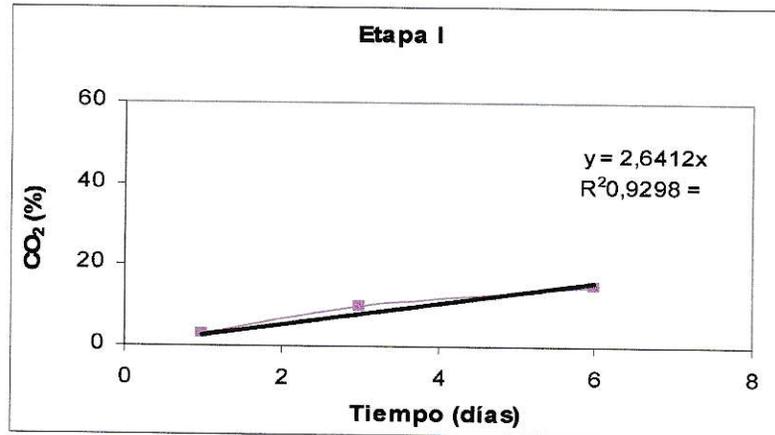
tiempo (días)	Residuos					Balance (%)
	Ligados (dpm)	Extraíbles (dpm)	Totales (dpm)	Ligados (%)	Extraíbles (%)	
0	2143,22	12388,90	15648,38	13,70	79,17	93
5	2412,49	4384,33	6495,82	37,14	67,49	105
22	2003,74	2099,48	3818,99	52,47	54,97	107
91	2105,09	918,88	2935,88	71,70	31,30	103

e. Testigos de Clorpirifos (datos correspondientes a Figura 37)

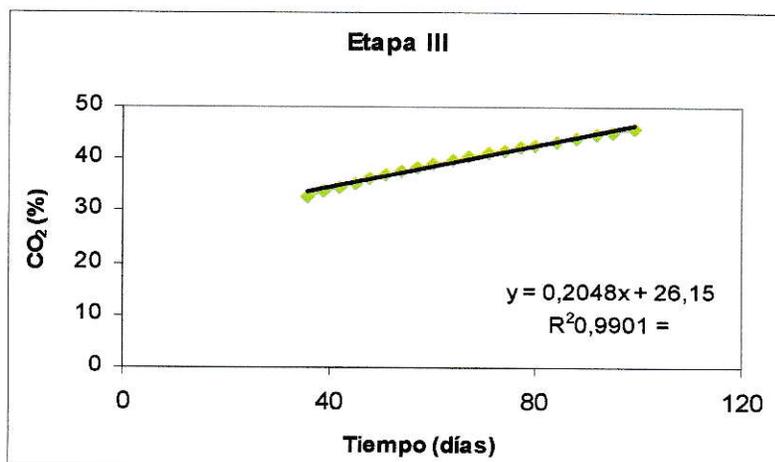
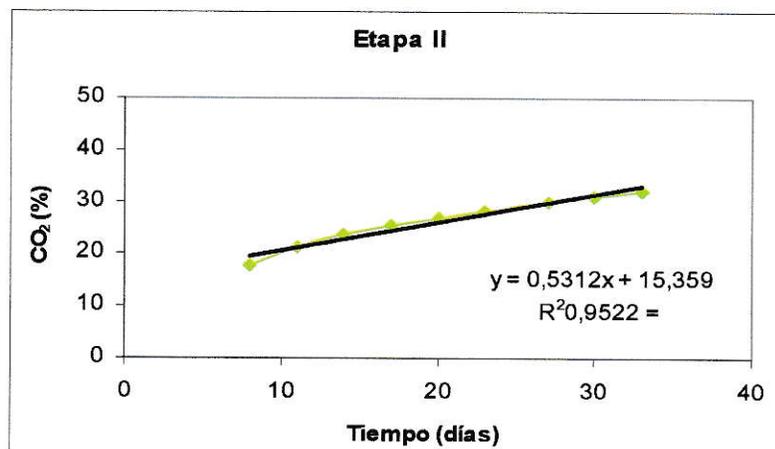
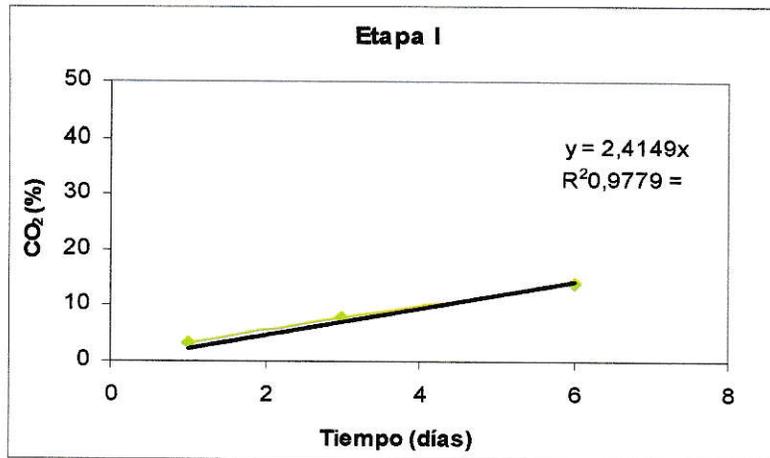
Tiempo (Días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	SD	CV (%)	Residuos (%)
0	1	3645,61	3564,49	72,66	2,04	100
	2	3596,84				
	3	3537,55				
	4	3477,97				
1	1	2695,98	2933,35	250,87	8,55	86,42
	2	3044,87				
	3	2759,51				
	4	3233,02				
8	1	2926,56	2950,10	68,19	2,31	83,78
	2	2896,81				
	3	3026,94				
37	1	3066,28	2998,48	201,55	6,72	84,46
	2	3201,43				
	3	2727,75				
	4	2937,55				
91	1	2404,16	2449,30	61,84	2,52	67,75
	2	2423,96				
	3	2519,79				

Anexo III. Etapas de la curva de Biodegradación en condiciones controladas de Glifosato y Clorpirifos

1. Biodegradación de Glifosato



2. Biodegradación de Clorpirifos

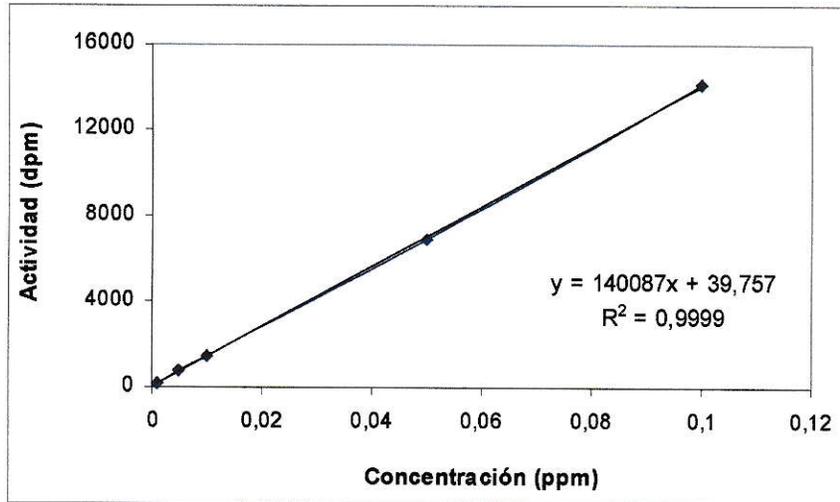


Anexo IV. Datos Meteorológicos

Día	Diciembre			Enero			Febrero		
	T° Máxima (°C)	T° Mínima (°C)	Rad. Solar Máx. (W m ⁻²)	T° Máxima (°C)	T° Mínima (°C)	Rad. Solar Máx. (W m ⁻²)	T° Máxima (°C)	T° Mínima (°C)	Rad. Solar Máx. (W m ⁻²)
1	22,9	9,7	777,8	30,3	11,8	968,5	33,3	15,3	928,5
2	28,5	8,2	957	29,7	13,2	916,8	33,3	15,7	789,83
3	31,2	9,2	1018,5	31,5	12,9	941,25	31,2	15,7	789,83
4	28,6	10,5	993,3	29,5	14,3	922,25	29,6	12,8	899,5
5	29,7	10,8	955,3	29,9	12,6	916,75	32,3	12,3	949
6	31,7	12,5	981,3	32	13,3	909,25	26,1	11,9	908
7	28	12,9	936	29,9	14,1	940,5	27,8	15,8	877,5
8	28	8,5	995,8	32	13,8	952,75	31,4	12,6	884,5
9	29,4	11,7	975,5	33,7	14,7	981,5	30,3	15,3	835,5
10	30,7	11,2	991	31	14,3	978,5	32,6	13,5	921,25
11	29,5	11,8	996	29,6	12,7	950,75	31,4	16,2	900,75
12	30,2	10,9	993,5	31,6	12,7	920	28,7	12,1	870,5
13	24,9	10,3	864	32	15,1	939,5	30,8	12,9	888,25
14	28,1	9,4	736,5	31,5	14,6	938,75	27,8	11,5	882,5
15	27,8	10,4	943	29,4	13,5	907,75	25,3	11,4	872,5
16	26,4	8,6	898	30,2	14,2	872	23	10	908,25
17	27,8	10,2	987	30,9	13,5	886,75	28,5	10,5	924,5
18	28,6	9,6	1000,5	30,2	14,3	925,5	28,3	11,9	917,5
19	30,2	10,2	980	26,2	14,5	769,13	24,5	10,4	856,75
20	28,6	14,2	941,3	31,1	12,4	946,5	25,1	13,3	743,85
21	26,4	11,4	895,8	28,4	12,1	947,75	28,9	9,8	932,75
22	29,9	11,9	958,5	26,1	13,2	627,65	31,5	11,8	904,5
23	24,1	11,6	569,6	30,7	11,5	951,25	34,2	14	921,5
24	25,3	13,6	1016	31,1	13,4	933,5	31,6	14,6	912,75
25	29,9	10,7	1012,3	28	12,5	943,75	28,4	13,8	884,5
26	31,6	11,8	988	29,1	10,6	948,5	28,5	11,1	851,25
27	32,3	13	987,3	30,9	12,5	949,25	26,7	12	826,5
28	33,3	13,3	967	28	12,7	922,75	27,1	8,7	886,5
29	34,1	14,7	963,5	29,6	9,9	961,25			
30	35,2	17	952,8	32,2	13,2	932,5			
31	33,3	16,6	982,3	32,2	13,8	922,75			

Anexo V. Curvas de Calibración del Contador de Centelleo Líquido

1. Curva de Calibración de Glifosato.



Concentración GLY (ppm)	Nº Repeticiones			Promedio (dpm)	SD
	1 (dpm)	2 (dpm)	3 (dpm)		
0,0003	228,78	221,24	226,29	225,44	3,84
0,001	187,41	183,99	185,20	185,53	1,73
0,005	759,06	752,20	759,61	756,96	4,13
0,01	1435,27	1570,56	1424,05	1476,63	81,54
0,05	6917,08	6952,95	6938,43	6936,16	18,04
0,1	14211,28	14069,10	14013,28	14097,89	102,09

$$\text{Límite Detección} = (S_m - \underline{S_{bl}}) / m$$

$$S_m = \underline{S_{bl}} + 3 \times s_{bl}$$

$$LD = 5,74 \times 10^{-5} \text{ ppm}$$

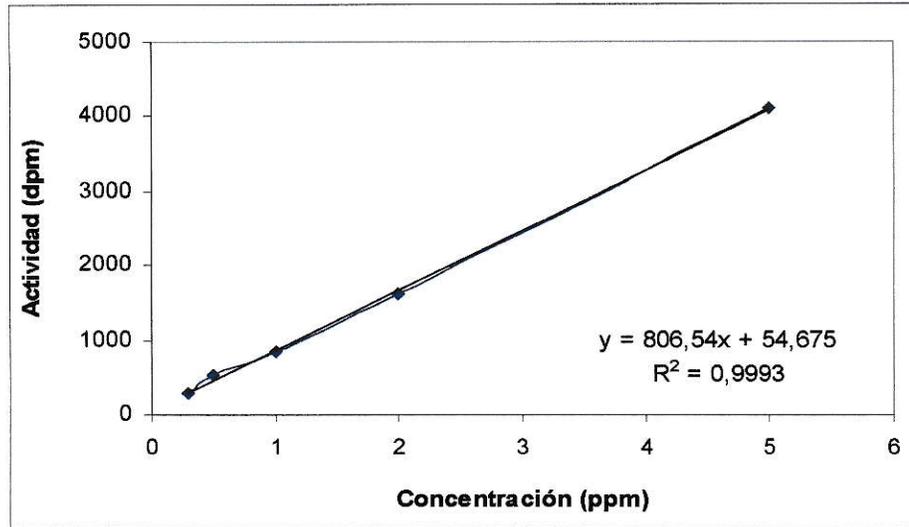
$\underline{S_{bl}}$ = promedio blanco	=	20,22 dpm
s_{bl} = desviación blanco	=	2,68 dpm
m = pendiente curva de calibración	=	140087

$$\text{Límite Cuantificación} = (*S_m - \underline{S_{bl}}) / m$$

$$*S_m = \underline{S_{bl}} + 10 \times s_{bl}$$

$$LC = 1,91 \times 10^{-4} \text{ ppm}$$

2. Curva de Calibración de Clorpirifos.



Concentración CLP (ppm)	Nº Repeticiones			Promedio (dpm)	SD
	1 (dpm)	2 (dpm)	3 (dpm)		
0,3	286,2633	280,0981	286,0455	284,14	3,5
0,5	522,4005	516,9539	519,9161	519,76	2,73
1	843,9282	815,5842	860,9408	840,15	22,91
2	1627,358	1612,478	1628,265	1622,70	8,86
5	4021,902	4208,98	4081,626	4104,17	95,55

$$\text{Límite Detección} = (S_m - \underline{S_{bl}}) / m$$

$$S_m = \underline{S_{bl}} + 3 \times s_{bl}$$

$$LD = 9,97 \times 10^{-3} \text{ ppm}$$

$\underline{S_{bl}}$ = promedio blanco	=	20,22 dpm
s_{bl} = desviación blanco	=	2,68 dpm
m = pendiente curva de calibración	=	806,54

$$\text{Límite Cuantificación} = (*S_m - \underline{S_{bl}}) / m$$

$$*S_m = \underline{S_{bl}} + 10 \times s_{bl}$$

$$LC = 3,32 \times 10^{-2} \text{ ppm}$$

Anexo VI. Recuentos de Microorganismos Aeróbicos Mesófilos (RAM)

1. Resultados del recuento microbiológicos de suelo seco sin fortificar.

	Suelo Control	Suelo Irradiado 25 KGy	Suelo Irradiado 50 KGy
Mediciones (ufc/g)	$4,10 \times 10^6$	$3,00 \times 10^1$	s/r
	$3,70 \times 10^6$	s/r	s/r
	$3,90 \times 10^6$	s/r	s/r
	$7,00 \times 10^6$	s/r	s/r
	$4,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^2$	s/r
	$6,00 \times 10^6$	s/r	s/r
	$3,00 \times 10^6$	s/r	s/r
	$3,00 \times 10^7$	s/r	s/r
Promedio (ufc/g)	$4,54 \times 10^6$	$6,50 \times 10^1$	s/r

ufc/g = unidades formadoras de colonias por gramo de suelo

s/r = sin registro

2. Resultados del recuento microbiológicos de muestras y testigos, realizado al final de los ensayos de biodegradación bajo condiciones controladas.

	Glifosato		Clorpirifos	
	Muestra 17	Testigo	Muestra 17	Testigo
Mediciones (ufc/g)	$2,5 \times 10^7$	$7,60 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	s/r
	$3,00 \times 10^7$	$9,80 \times 10^7$	$1,70 \times 10^7$	s/r
	$5,00 \times 10^7$	$1,70 \times 10^8$	$1,00 \times 10^7$	s/r
	s/i	$1,98 \times 10^8$	$1,00 \times 10^7$	s/r
Promedio (ufc/g)	$3,5 \times 10^7$	$1,36 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	s/r

s/i = sin información, ufc/g incontables.

s/r = sin registro