

Evolución de los biocidas en el suelo

I. GIMENEZ VERDU

Son indicados los distintos factores que afectan a un biocida al entrar en contacto con el heterogéneo sistema suelo y en consecuencia su mayor o menor persistencia, siendo considerada la vía de degradación seguida por algunos compuestos de frecuente uso agrícola.

Por otra parte, el proceso general de evolución ha sido especialmente referido a la presencia de microorganismos, actividad enzimática del suelo e influencia de la naturaleza físico-química de éste.

Se ha tenido en cuenta asimismo, la interacción biocida-enzima y el efecto de éstos compuestos sobre el crecimiento de las plantas y dinámica de las poblaciones del suelo.

I. GIMENEZ VERDU. Instituto Universitario de Ciencias Ambientales. Universidad Complutense. Madrid 1986.

INTRODUCCION

El suelo, constituyente esencial del ecosistema, sufre continuamente perturbaciones en sus condiciones de equilibrio físicas, químicas y biológicas (SYLVESTRE y FOURNIER, 1979). En este sentido actúan numerosos productos químicos, orgánicos e inorgánicos, cada vez más utilizados en las prácticas agrícolas como es particularmente el caso de los biocidas, los cuales dan origen a problemas debido a su acúmulo en el terreno o al de sus productos de descomposición, así como a la aparición de fenómenos de toxicidad sinérgica y a variaciones en el tiempo de persistencia (KEARNEY y HELLING, 1969).

Desde el punto de vista químico, se establecen relaciones entre biocidas y suelo, donde asume particular significado la materia orgánica. Efectivamente, ésta mediante mecanismos de diverso tipo, tales como fuerzas de Van der Waals, adsorción nucleofílica o electrofílica, puentes de H., ejerce un enorme poder de absorción; provocando la parcial inactivación

del biocida y rindiendo a veces como consecuencia necesaria el uso de cantidades notablemente superiores a las que serían suficientes. De esto se deduce, el interés que puede tener cualquier indicación útil en la aplicación práctica de elegir un producto menos sensible a sufrir este tipo de fenómenos, siendo por otra parte necesario tener en cuenta, según trabajos de HAYES (1970), que las diversas fracciones húmicas actúan de manera totalmente diferente, incluso frente al mismo biocida, estableciendo con él enlaces de diversa naturaleza e intensidad.

ENZIMAS ENDOCELULARES Y EXOCELULARES DEL SUELO

Desde el punto de vista de la actividad enzimática del suelo, se sabe que esta puede venir representada por la carga enzimática del mismo (SKUJINS, 1967). Los enzimas moléculas de naturaleza proteica, se encuentran acumulados en el suelo formando parte de la materia

orgánica. Derivan de microorganismos proliferantes y muertos, animales del suelo y residuos de raíces y de otras partes de la planta. En cuanto a su función en el suelo, sabemos que en conjunto, las reacciones enzimáticas del suelo vienen catalizadas por enzimas intracelulares o extracelulares.

Considerando sus actividades bioquímicas, el suelo puede ser considerado como una entidad biológica de la que es difícil aislar enzimas en forma pura e inalterada. Del mismo modo, es difícil diferenciar la actividad enzimática extracelular de la microbiana (determinante de la actividad biológica del terreno), así como de la actividad catalítica de la materia orgánica (MARIAN I, 1950; KUNIN, 1952; BAMANN, 1954) y en definitiva de otros fenómenos asociados, sin excluir el contributo de organismos vivos y proliferantes.

Para individualizar la actividad exocelular de la microbiana, se verifica la inhibición de esta última extrayendo simultáneamente enzimas inalterados; esto constituye un problema en metodología enzimática, por ser difícil de conseguir sin alterar las propiedades físico-químicas del suelo.

En el tentativo de llevar adelante dicha individualización, son usados gran cantidad de agentes bacteriostáticos, esterilizantes y anti-sépticos. Ha sido muy utilizado el tolueno por su interés bacteriostático y como técnica más eficaz de esterilización se considera la radiación mediante alta energía ionizante, introducida posteriormente en 1950, figurando entre sus aplicaciones estudios de DUNN *et al.* (1948), McLAREN *et al.* (1957) y otros autores.

Respecto al examen enzimático del suelo, aparte los métodos teóricos orientados al estudio de enzimas exocelulares, han sido usados otros métodos que han favorecido el avance de los conocimientos sobre la fisiología general del suelo, en especial de aquellos relativos a la fertilidad. Del mismo modo, se realizan experiencias encaminadas a investigar correlaciones entre las que figuran las que intentan relacionar la actividad enzimática con la fertilidad del suelo y con la actividad microbiana,

etc., con el fin de establecer un "índice biológico" en los suelos y aplicarlos a prácticas agrícolas.

RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA Y LOS PROCESOS BIOLOGICOS DEL SUELO

En general los estudios sobre correlaciones presentan dificultades debidas a que como se determina "in vitro", la actividad enzimática implica la determinación de varios parámetros biológicos del suelo, por lo que a veces los resultados experimentales son negativos.

Trabajos basados sobre la relación entre actividad enzimática y actividad biológica, tratan de considerar la actividad enzimática como medida de esta última si bien la actividad biológica viene regularmente determinada por la actividad de los microorganismos del suelo, siendo considerados como métodos de determinación respectivamente, el número de microorganismos y la respiración del suelo. De forma similar, se intenta relacionar el número de microbios con la respiración del suelo (MASHTAKAV *et al.*, 1954; GALSTYAN, 1959). Existen incluso ensayos sobre correlaciones entre actividades enzimáticas y ciclos bioquímicos del suelo (DROBNIK y SEIFERT, 1955; SEIFERT, 1956; GALSTYAN, 1957 y otro autores).

Otra correlación observada, si bien en medida insuficiente, ha sido entre actividad catalítica y productividad del suelo, pero no se dispone todavía de suficientes pruebas como para que la actividad enzimática se pueda considerar como medida de productividad. Así pues HOFMANN (1952, 1953) y quizás otros autores, usaron la actividad enzimática como medida de la actividad biológica y de la productividad, no obstante en relación a lo dicho la bibliografía presenta discordancias. Según KUPREVICH (1958) son insuficientes los conocimientos sobre enzimología del suelo para afirmar esta idea, no obstante se conozca su utilidad práctica, por otra parte HORNS (1955)

considera difícil que esto se verifique en los casos en que exista en el suelo una fuerte absorción.

En general se piensa que en la búsqueda de la posible existencia de una estrecha correlación entre actividad enzimática, productividad del suelo y actividad biológica, son necesarios métodos muy eficaces.

En conclusión, se sabe que la actividad enzimática del suelo se debe mayormente a enzimas extracelulares, libres o no y que es importante en agricultura.

DEGRADACION DE BIOCIDAS

Aunque la mayoría de las transformaciones enzimáticas dependen especialmente de la presencia de organismos esenciales, fuentes bibliográficas indican que los enzimas existentes en el suelo intervienen en la degradación de ciertos biocidas, ya que algunos permanecen activos extracelularmente durante períodos indefinidos de tiempo (SKUJINS, 1976).

No obstante, dada la dificultad de aislar del suelo enzimas activos, su importancia en la degradación de un biocida es difícil de valorar, sin embargo, existe una creciente constatación de que los enzimas exocelulares del suelo catalizan la hidrólisis de ciertos biocidas (IWATA *et al.*, 1977).

Respecto a la microbiología y ecología de la degradación de un biocida en el suelo, es necesario considerar que los microorganismos constituyen un grupo diverso y ubicuario de organismos en el suelo, siendo los *Ascomycetos*, hongos y bacterias, responsables primarios de la descomposición microbiológica de varios herbicidas en el suelo. Entre las reacciones químicas que tienen lugar en la descomposición microbiana de varios herbicidas, se incluyen las de β -oxidación, rotura de enlaces éter, deshalogenación, hidroxilación, rotura de anillos, hidrólisis de enlaces éster y n-desalquilación. Los enzimas responsables de la catálisis de ciertas reacciones son inducidos por biocidas, ya que no son constituyentes esenciales de los microorganismos.

Los factores que determinan cuantitativamente las reacciones, son característicos de los enzimas del suelo y de las moléculas de herbicidas, siendo difícil conocer el contributo de cada una de estas variables en la persistencia de un biocida en el suelo, por ser este un sistema muy heterogéneo.

La configuración molecular está relacionada con el grado de descomposición, de esta forma, el número, posición y tipo de substituyentes, influencia notablemente la susceptibilidad de la molécula de biocida frente a un ataque microbiano.

Menos conocidas son las influencias electrónicas y estéricas sobre el grado de degradación. Del mismo modo, cuando uno de estos factores es puesto en relación con la tasa de desnaturalización, los resultados son con frecuencia inesperados, puesto que el medio físico en el que la molécula de herbicida existe en el suelo, puede en algún modo interferir la degradación microbiana.

a) Degradación de herbicidas

La acción de los enzimas del suelo sobre este grupo de biocidas es poco conocida. En el caso relativo a las transformaciones bioquímicas de las anilinas halógeno-substituidas, se sabe que son liberadas durante el catabolismo biológico de algunos herbicidas como fenilacilamida, fenilcarbamatos y ureas substituidas (GEISSBUHLER *et al.*, 1963; KAUFMAN y KEARNEY, 1965; DALTON *et al.*, 1966; BARTHA y PRAMER, 1967).

El propanil (3,4-dicloropropioanilina), es suministrado comúnmente como un herbicida de post-emergencia y controla selectivamente gramináceas, plantas forrajeras y otras hierbas anuales dañosas del arroz, siendo hidrolizado a DCA (3,4-dicloroanilina) y TCAB (3,3', 4,4'-tetracloroazobenceno) (BARTHA y PRAMER, 1967 (Fig.1), BURGE 1972), obtuvo DCA hidrolizando el enlace amida del propanil con arilacilamidasa, observando que al sonificar aumentaba la actividad hidrolítica, lo que le hizo pensar que un enzima endocelular

era el responsable de la degradación. Por otra parte, el hecho de no encontrar relación entre el número de bacterias degradantes y el porcentaje de DCA formado, le sugirió la presencia de alguna cantidad de enzima libre en el suelo.

HOGLAND (1974) extrajo arilacilamidasa de raíces de "diente de león", observando que el catecol la inhibía en un 70%.

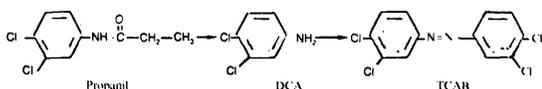


Fig. 1.— Transformación del propanil en el suelo.
(BARTHA y PRAMER, 1967.)

En cuanto a peroxidasas, SAUNDERS *et al.* (1964) las extrajeron de rábano estudiando su efecto catalítico sobre anilinas sustituidas. Otros estudios sobre estos enzimas (BARTHA *et al.*, 1968; BARTHA y BORDELEAU, 1969 a, b), han demostrado que las peroxidasas transforman las cloroanilinas en cloroazobenceno. Estos y otros estudios abrieron una vía a posteriores investigaciones, encaminadas a revelar el probable modelo químico de transformación.

SPROT y CORKE (1971) demostraron que la transformación aerobia de las cloroanilinas tiene lugar biológicamente. Igualmente observaron que por sucesivas irradiaciones o adiciones de azida de sodio, el TCAB tiende primero acumularse y luego a desaparecer, indicando que probablemente la desaparición se deba a la actividad microbiana tras decaer la acción de la azida de sodio. Posteriormente KELLEY y RODRIGUEZ-KABANA (1975), encontraron una reducción de poblaciones bacterianas en el suelo 2 semanas después del tratamiento con dicho compuesto, si bien 5 semanas más tarde, dichas poblaciones eran más numerosas en los terrenos tratados que en los no tratados.

BORDELEAU y BARTHA (1972 a, b) estudiaron actividades microbianas responsables de la transformación del DCA en TCAB. Así del

cultivo de *Geotrichum candidum* aislaron peroxidasas y anilina oxidasa extracelular, estudiando su comportamiento frente a temperatura, pH y otros parámetros cinéticos. Por otro lado BURGE (1973), no encontró ninguna relación entre la cantidad de TCAB producido y el número de hongos y bacterias capaces de sintetizar peroxidasas. Estas y otras observaciones le llevaron a suponer que no todas las peroxidasas del suelo catalizan dicha conversión.

Otros estudios se deben a PLIMER *et al.* (1970), los cuales demostraron la formación de polímeros más altos del DCA durante la formación del propanil, entre los que figura el 1,3-bis (3,4-diclorofenil) triazeno, considerándose como consecuencia (BURGE, 1973) el poco TCAB producido. ROSEN *et al.* (1970) y LINKE (1970) han descrito la formación de 4-(3,4-dicloroanilina)-3,3', #4'-triclorobenceno asimétrico. BARTHA (1975) esquematizó la vía de transformación microbiana del propanil en el suelo.

Según BARTHA (1971), las cloroanilinas pueden unirse a las sustancias húmicas del suelo mediante diversos enlaces (HSU y BARTHA, 1974). La existencia de tales complejos así como la formación de grandes polímeros de DCA, podría explicar porqué no se forma TCAB a partir de DCA (SOKOLOV *et al.*, 1974; SPROT y CORKE, 1971; HUGHES y CORKE, 1974) y la falta de correlación entre las peroxidasas del suelo y el TCAB formado (BURGE, 1973).

Relativo al mecanismo de transformación del DCA, BORDELEAU y BARTHA (1970) propusieron la formación de un compuesto intermedio, sobre la base de los procesos de oxidación biológica:

El transporte de un electrón en los procesos naturales tiene lugar a través de distintas etapas, por tanto la transferencia de los 4 electrones requeridos para la conversión de 2 moléculas de DCA en 1 de TCAB, debe implicar la formación de un producto intermedio con un estado de oxidación más alto del DCA y menor que el TCAB, pareciendo ser proba-

blemente fenilhidroxilamina, a causa de su capacidad de reacción con el DCA para formar azocompuestos.

El mecanismo de transformación que establecieron implicaba 2 etapas:

1) Una peroxidasa catalizaría la oxidación de DCA a clorofenilhidroxilamina.

2) tendría lugar una reacción no enzimática entre el DCA y la fenilhidroxilamina.

Posteriormente, (BORDELEAU *et al.*, 1972), propusieron una vía modificada (Fig. 2) que presentaba diversos productos intermedios, de los que ha sido demostrada la existencia de los compuestos 1, 2 y 5. Las reacciones A y A' son catalizadas por una peroxidasa, mientras que las reacciones A'', B' y C son de naturaleza no enzimática.

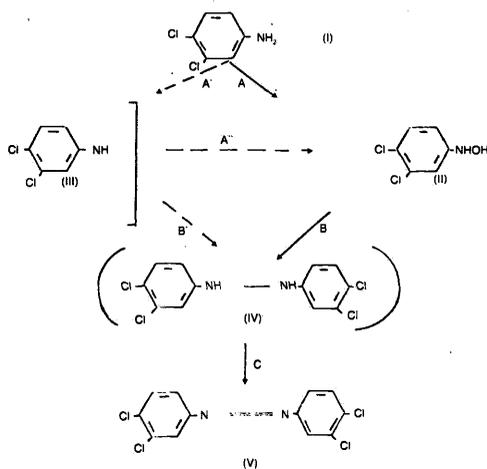


Fig. 2.— Vía de formación de TCAB en el suelo, propuesta por BORDELEAU *et al.* (1972).

Degradación de insecticidas

GETZIN y ROSFIELD (1968) han estudiado la degradación en el suelo de un cierto número de insecticidas, malathión, ciodrin, dichlorvos, mevinphos, metil parathión, dimethoato zínophos, dursban GS1 3005, observando que el parathion, dimethoato y GS1 3005, no fueron hidrolizados; metil parathion, zínophos y dursban eran solo parcialmente resistentes; mien-

tras que malathion, ciodrin, dichlorvos y mevinphos eran fácilmente hidrolizados. También señalaron que la radiación γ , inhibe menos la capacidad de hidrólisis de los suelos que la esterilización en autoclave. Al parecer este tipo de radiación inhibe el crecimiento de los microorganismos, pero no tiene efecto sobre la actividad de muchos enzimas (MCLAREN *et al.*, 1957; PETERSON, 1962).

Los citados autores intentaron asimismo extraer un enzima hidrolítico del suelo, tratando éste con una serie de soluciones normalmente usadas en la extracción de material orgánico, resultando activo solamente el NaOH 0,2 N, que extrajo malathión esterasa, la cual hidrolizó como cabe suponer el malathión. Las otras actividades esterásicas o no fueron extraíbles o se inactivaron por el débil tratamiento alcalino (generalmente los enzimas son rápidamente inactivados por éste tratamiento). Por otra parte, el enzima extraído mostró una actividad persistente incluso en suelos irradiados, confirmando así ser un constituyente permanente del suelo, un exoenzima.

Asimismo, BURNS y GIBSON (1976) han referido que el malathión es rápidamente degradado en suelos no esterilizados. A este respecto y sobre la base de las propiedades ureásicas del suelo BURNS *et al.*, 1972; PETTIT *et al.*, 1976; BURNS y GIBSON, 1976, señalaron que la degradación en suelos no esterilizados pero privados de la materia orgánica, implica metabolismo microbiano y no biológico, mientras que la malathión esterasa es responsable de la rápida hidrólisis de los biocidas en fracciones de suelo orgánicas y organominerales.

La malathion esterasa del suelo es de naturaleza carboxílica y muy resistente a los enzimas proteolíticos e insensible a los inhibidores, como por ejemplo, metales pesados. Su persistencia y estabilidad en el suelo como enzima exocelular, es atribuida a las propiedades del complejo proteína-carbohidrato. También MAYAUDON *et al.*, (1975) encontraron que la resistencia de las proteasas del suelo a la proteolisis, era debida a la unión de glúcidos al enzima. El malathión es hidrolizado a un mo-

noéster según la cinética típica de Michaelis-Menten (SATYNARAYANA y GETZIN, 1973).

INFLUENCIA DE LOS BIOCIDAS SOBRE LOS ENZIMAS, CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y DINAMICA DE LAS POBLACIONES DEL SUELO

a) Efectos sobre los enzimas

Diversos trabajos señalan la reducción en la actividad, que productos químicos utilizados en agricultura tienen sobre los enzimas, por ejemplo, la antracina reduce la actividad de las fosfatasas, sacarosas, así como tienen un efecto similar ciertos insecticidas órgano-fosforados sobre las ureasas (LETBRIDGE y BURNS, 1976).

Es sabido, que diferentes biocidas permiten estudiar el modo de acción de varios enzimas. Los herbicidas derivados de la urea como diuron, siduron, suelen actuar como halógenos substituidos en el anillo fenílico, o como impedimento estérico de substituyentes moleculares (CERVELLI *et al.*, 1975 c, 1976, 1977), ejerciendo así un efecto directo sobre las ureasas del suelo.

De forma análoga, igual que la matriz del suelo puede influenciar en gran medida el comportamiento de los biocidas, los inorgánicos en especial puede estar implicados en una variedad de reacciones y sus efectos sobre los enzimas del suelo se intentan dilucidar a partir de ensayos con extractos purificados de suelo. En éste sentido, los enzimas del suelo son generalmente considerados muy poco influenciados, frente a diversos factores que causan la activación o inhibición de los enzimas extraídos de microbios o tejidos de plantas o animales. Por ejemplo, la malathion esterasa parcialmente purificada de los extractos de suelo es solo en parte inhibida por altas concentraciones de metales pesados Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} (SATYNARAYANA y GETZIN, 1973), es decir un alto contenido de metales pesados podría tener un efecto secundario sobre la actividad de algunos enzimas.

ner un efecto secundario sobre la actividad de algunos enzimas.

Otros efectos de los biocidas sobre los enzimas del suelo tienen carácter indirecto, contribuyendo su estudio al conocimiento de la génesis de los enzimas del suelo.

Los biocidas alteran las funciones vitales de los microorganismos y así indirectamente pueden modificar la actividad enzimática del suelo, cualquiera que fuese el origen de los enzimas derivados de microorganismos, o de residuos de plantas por acción de bacterias, hongos o gusanos. El nivel de cada actividad enzimática podría variar según su específico "turnover" en el suelo.

Otra forma de acción, está basada en el hecho de que dichos productos son frecuentemente una fuente de nutrición, que estimula el crecimiento de las poblaciones del suelo y en consecuencia la degradación de los biocidas. Inversamente, un biocida hasta ser metabolizado en el suelo, puede ejercer un efecto fisiológico sobre los organismos y en caso de que éstos vengan lisados, aumenta la fracción de enzimas exocelulares.

De igual modo, los biocidas pueden modificar los mecanismos de biosíntesis de los enzimas, teniendo lugar muchos de ellos a nivel de la proteica. En este sentido, al incidir sobre la síntesis de los enzimas que segrega normalmente la célula, podrían inhibir la formación de enzimas endocelulares, efecto observado con chlordane y aminotriazol en la síntesis de endopeptidasas y aminopeptidasas por *Aeromonas proteolytica* (LICHFIELD y HUBEN, 1973).

También pueden actuar inhibiendo la síntesis de enzimas específicos, efecto que tiene gran importancia.

Un ejemplo es el de la actividad ureásica, que no es específicamente inducible en el suelo por parte de algunos compuestos, al contrario que la celulósica.

Otros efectos indirectos inciden sobre la membrana pudiendo ocasionarle desde la desorganización de las estructuras físicas, a mo-

dificaciones en el transporte o procesos de excreción.

De acuerdo con el concepto de membrana unitaria (ROVERTSON, 1957) y con el modelo lipoproteico particulado (VANDERKOOI y GREEN, 1970), se considera que las proteínas de la membrana están al menos parcialmente inmersas en esta fase, pudiendo en algunos casos circundar la membrana entera, como consecuencia de todo esto, las interacciones iónicas presentan una notable influencia en la estabilidad de la membrana. Así pues, un biocida capaz de disociar la estabilidad polar o los enlaces hidrófobos entre compuestos proteicos y fosfolopídicos, pueden llegar a desorganizar por completo la membrana, ejemplo guazatine, dodine.

Por otra parte, los agentes emulsionantes de los biocidas, hidrocarburos alifáticos saturados o insaturados, pueden también disociar la

membrana (CURRIER Y PEOPLES, 1954). Otra forma de alterar la estructura de la membrana celular puede ser resultado de la interacción entre lípidos y radicales libres, tal como es el efecto de herbicidas de biperidilium.

Asimismo, los biocidas pueden modificar los mecanismos de transporte, siendo éste efecto de gran importancia. Ejemplo, la acción del DDT (STOKES *et al.*, 1970). Otros estudios se deben a MONROD (1976), LOPPE y DELTOUR (1975).

El Cuadro 1 muestra la acción de algunos biocidas sobre los organismos del suelo.

b) Otros efectos de los biocidas tienen carácter fisiológico

En este sentido, algunos biocidas constituyen elementos reguladores del crecimiento de

Cuadro 1.— Esquema del efecto probable de algunos biocidas sobre los organismos del suelo . (CERVELLI *et al.*,

Biocidas	Fungicida vital alterada	Procesos primarios implicados	Observaciones
Herbicidas de biperidilium, petróleo aceite tiolcarbamatos	Organización estructural	Separación de membranas	
polioxin D	"	Inhibición de la síntesis de quitina	Sólo artrópodos y hongos
Herbicidas de biperidilium, ureasas, triazinas, acilamidas, uracilos, etc	Aporte energético	Derivación e inhibición del electrón de transporte fotosintético	Sólo organismos fotosintéticos (algas, etc.)
Arsenicales, ditiocarbamatos dialquílicos	"	Inhibición de la piruvato deshidrogenasa	
Antibióticos, benzimidazoles, N-fenilcarbamatos, dinitroanilinas	Crecimiento y reproducción	Inhibición de DNA, RNA o proteínas biosintéticas y división celular o nuclear	
Insecticidas fosforgénicos y carbámicos	Sistemas nervioso	Inhibición de la acetilcolinesterasa	Sólo organismos con sistema nervioso (gusanos del suelo, etc.)

las plantas a nivel del transporte del ácido indolacético, síntesis de giberelinas o tasas de etileno. Otros compuestos pueden interferir en los procesos de coordinación o de aporte energético. En todo caso es necesario considerar, que el modo de actuar de muchos biocidas es todavía poco conocido.

Muchas quinonas, como el dichlone, interfieren en la germinación de esporas de muchos hongos (McCALLAN y MILLEN, 1958) y de acuerdo con OWEN y NOVTONY (1958) actúan simultáneamente sobre una variedad de procesos metabólicos. Muchas clases de biocidas (fluoride, los que contienen Hg, biocidas con alquileno bis-ditiocarbamato, etc.) muestran un modo de acción no específico.

c) Efectos de los biocidas sobre la dinámica de las poblaciones del suelo

En relación a ésto, las modificaciones de los enzimas del suelo a través de las cadenas de alimentación y la sucesión de poblaciones microbianas, presentan gran importancia.

A excepción de tratamientos no frecuentes o drásticos, los biocidas raramente tienen un impacto permanente sobre el total de las poblaciones del suelo y de este modo pueden variar la actividad enzimática del suelo y las clases de enzimas producidos que este contenga, así estos compuestos pueden estimular el crecimiento de una clase de organismos en el suelo mediante la inhibición de otros. Por ejemplo, el aumento de ciertos pequeños Tisanuros en el suelo tras la aplicación del DDT, se debe a una reducción de pequeños predadores (EDWARDS y THOMPSON, 1973). Una situación más interesante, se presenta en el comportamiento de organismos que viven en obligada simbiosis o mutua cooperación en el suelo. Esto es particularmente importante en el caso de algunas asociaciones en agricultura, como la existente entre *Rhizobium leguminosarum* y legumbres y la mayoría de los efectos de la rizosfera.

En el suelo gran parte de los organismos vi-

ven en condiciones precarias, debido a que la biomasa es superior al substrato disponible. Esta situación puede ser interferida por biocidas de tres formas:

— La muerte de organismos sensibles, con la consiguiente utilización de sus residuos orgánicos por las poblaciones supervivientes.

— La utilización directa de los biocidas por los organismos capaces de degradarlos o metabolizarlos utilizándolos como fuente de C, lo que influencia de forma especial la dinámica de las poblaciones del suelo.

— El desarrollo de poblaciones microbianas que dependen de fuentes secundarias de nutrición, como es el caso de metabolitos producidos a partir de la descomposición de los biocidas excretados por la microflora proliferante.

Se piensa que los herbicidas tienen un efecto letal sobre un grupo de organismos vivos, considerándose las demás poblaciones microbianas completamente insensibles y capaces de proliferar utilizando residuos de las células muertas. La Fig. 3, muestra como el herbicida E_1 es degradado después de un intervalo de tiempo por los enzimas inducidos. Su efecto como fuente de nutrición en la proliferación de los microorganismos, ha sido simplificado separándolo de la influencia de la materia orgánica muerta, proveniente de los organismos sensibles.

El herbicida E_2 es degradado inmediatamente, siendo sus efectos aditivos.

El impacto del herbicida E_3 es similar al de E_1 , si bien una microflora secundaria puede multiplicarse usando un metabolito del herbicida, junto con los productos de la lisis celular y otras sustancias excretadas por la población primaria.

La utilización de la materia orgánica muerta y la consecuente proliferación de los microorganismos no es referida a una interrelación microbiana, ya que incluye los efectos debidos a los animales muertos del suelo y residuos de plantas sobre los microorganismos, así como al uso de materia orgánica por otros organismos vivos, gusanos de tierra, etc.

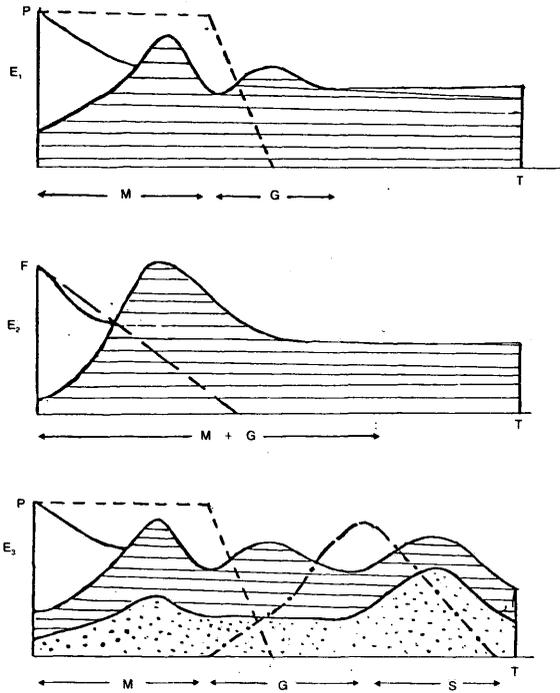


Fig. 3.— Algunas posibles influencias compuestas de 3 herbicidas (E_1 , E_2 , E_3 , línea discontinua) sobre poblaciones microbianas (P) durante un periodo de tiempo (T). Como efectos individuales se consideran, la muerte (M) de los organismos sensibles (en blanco) y su utilización por otros organismos: uso de los herbicidas por un grupo de poblaciones microbianas (G, zona rayada); el desarrollo de una comunidad secundaria de microorganismos (S, zona punteada), que no son capaces de degradar los biocidas, pero usan sus metabolitos y productos intermedios (línea de puntos y rayas) que son excretados por poblaciones primarias. El herbicida E_2 es degradado por los enzimas presentes en el suelo; los herbicidas E_1 y E_3 son degradados por los enzimas inducidos después de un periodo de latencia. (CERVELLI, *et al.*, 1978).

Pueden también tener importancia en la evolución de los enzimas en el suelo, las modificaciones inducidas por los biocidas sobre la composición de exudados de raíces de plantas y los excrementos de los animales del suelo (incluyendo gusanos de tierra).

Relativo a los efectos de los biocidas sobre los organismos del suelo poco sensibles o insensibles, pueden resultar varios efectos. CULLIMORE (1971) cita como caso más común, la

inhibición de los microorganismos insensibles por parte de los herbicidas, es decir de los organismos resistentes que no utilizan las células muertas y no se multiplican durante el período de inducción de enzimas.

La evolución de las poblaciones microbianas en el suelo es de interés considerable y puede a veces tener un papel de mayor importancia en la eliminación de los biocidas orgánicos. La investigación sobre esta tema, está generalmente orientada en el aislamiento de razas singulares de microorganismos, capaces de degradar biocidas específicos independientemente de otros organismos.

Un ejemplo de evolución enzimática en una comunidad microbiana en crecimiento sobre el herbicida dalapon (ácido 2,2'-dicloropropiónico), ha sido descrita por SENIOR *et al.* (1976). Este compuesto sufre la degradación microbiana (KEARNEY *et al.* 1964), pero es considerado como un herbicida parcialmente refractario. No obstante puede ser atacado por una comunidad microbiana aislada mediante un continuo aporte de nutrientes al cultivo. La comunidad microbiana incluye utilizadores primarios y secundarios, que pueden crecer sobre metabolitos producidos directamente, a partir del catabolismo de biocidas excretados por utilizadores primarios o sobre productos de lisis celular.

Los citados autores, mostraron asimismo la aparición de mutaciones en un miembro de la comunidad secundaria, identificada como *Pseudomonas putida*, que habían adquirido la habilidad de crecer usando el herbicida de nutriente como única fuente de C y energía, mediante la evolución de una deshalogenasa.

La mayoría de las indagaciones sobre la degradación de biocidas orgánicos en el suelo, ha ignorado la acción de poblaciones secundarias, que puede ser indudablemente importante para la estabilidad de una comunidad microbiana. Por otra parte, según CULLIMORE (1971), algunos de los metabolitos producidos a partir del catabolismo primario de biocidas orgánicos, podrían ser tóxicos del mismo modo para los utilizados primarios.

INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE EN LA INTERACCION BIOCIDA-ENZIMA

La interacción biocida-enzima, incluye como hemos citado la desnaturalización de los biocidas por los enzimas del suelo y el impacto directo o indirecto de los biocidas sobre la actividad enzimática. Un factor a considerar en este tipo de interacciones, es la influencia que sobre ellas tienen el medio ambiente físico y químico del suelo.

En las investigaciones conducidas sobre este argumento, se intenta distinguir la actividad enzimática en examen de los fenómenos de interferencia, no obstante se obtienen frecuentemente resultados discordantes o no fácilmente interpretables, debido a la dificultad ligada a la valoración de cada uno de los factores que influyen en la determinación de las condiciones de antagonismo entre "efecto enzima" y "efecto matriz" (CERVELLI *et al.*, 1978), por lo que también se realizan ensayos usando compuestos de alto grado de pureza, efectuando el estudio a nivel molecular.

Si un biocida suministrado no viene adsorbido por la matriz del suelo, su destino dependerá de otras condiciones ambientales como el pH, el contenido en agua del suelo, la temperatura, etc. Por el contrario, si el biocida es fuertemente adsorbido sobre las partículas del suelo, su concentración no será reducida mientras no sean posibles las reacciones de catálisis enzimática.

Los enzimas adsorbidos sobre las partículas coloidales y aquellas localizadas en el interior de las partículas húmicas, se comportarán diferentemente respecto a los enzimas libres en solución (McLAREN y PACKER, 1970; LADD y BUTLER, 1975). Desafortunadamente no han sido considerados los efectos del medio ambiente en la determinación de las constantes cinéticas, salvo excepciones (CERVELLI *et al.*, 1973, 1975 b, 1977; BENESI y McLAREN, 1975; IRVING y COSGROVE, 1976).

La influencia de la matriz del suelo en el destino de los biocidas puede ser representada mediante la competición de los dos efectos citados "enzima" y "matriz".

— El "efecto matriz" tiene lugar cuando la unión entre las partículas del suelo y el biocida no permiten al substrato reaccionar con el enzima para formar el producto (Fig. 4). Un ejemplo muy evidente de este hecho consiste en la hidrólisis de algunos insecticidas órgano-fosforados por fosfatasas. HEUER *et al.* (1976) añadieron fosfatasa ácida y alcalina a un suelo arcilloso irradiado, al que suministraron parathion y guthion con el fin de estudiar su persistencia, atribuyendo la falta de degradación observada en los suelos íntegros, a la adsorción de los enzimas y biocidas por la arcilla.

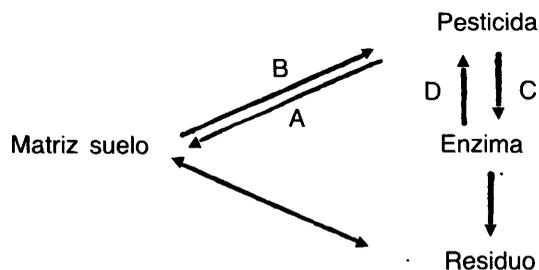


Fig. 4.— Esquema simplificado del efecto "matriz" y del efecto "enzima" sobre los biocidas en el suelo. Si A es mucho mayor que B y mucho mayor que C, el efecto "matriz" predomina y la reacción enzimática puede llegar a ser imposible. Si C es mucho mayor que A, la matriz no tiene efecto sobre la acción de los enzimas. Si B es similar a A, los efectos "matriz" y "enzima" pueden ser comparables incluso en el caso en que A sea mucho mayor que C. (CERVELLI *et al.*, 1978.)

— El "efecto enzima" tiene lugar cuando este prevalece sobre el "efecto matriz". En este caso el biocida es solo débilmente ligado a las partículas del suelo y puede reaccionar con el enzima para formar el producto. No obstante, esta prevalencia puede ser debida a otra causa, como ocurre en la hidrólisis de la urea por la ureasa. Cuando la urea es añadida a un suelo que contiene ureasa, su hidrólisis es menor que cuando está en solución, debido especialmente, según DURAN (1965), a las variaciones del pH próximo a las partículas.

Cuando el "efecto enzima" y "matriz" son comparables, se presenta un caso intermedio más complejo, a veces frecuente y los factores limitantes derivan de las concentraciones de

los biocidas en la solución del suelo (o de la actividad en el caso de iones) y de la capacidad del sistema suelo para saturar al biocida, cuando su concentración disminuye por la transformación debida a los enzimas del suelo. Así cada suelo puede tener un diverso "set" de parámetros que la definen. Un ejemplo puede ser observado en la Fig. 3, en que la intensidad del herbicida E₁ depende de la reactividad de sus constituyentes.

Un caso de la influencia de la absorción en el suelo, puede darse en la transformación de DCA en TCAB. La persistencia de DCA en el suelo, es solo un tanto explicable por la formación de TCAB y otros residuos poliméricos. KEARNEY y PLIMER (1972) sugirieron que la formación de TCAB viene limitada por el DCA disponible para las peroxidadas. Por otra parte se ha observado que cuando el DCA está en baja concentración en el suelo, está fuertemente ligado a este, no pudiendo ser extraído con solventes orgánicos ni soluciones salinas (BARTHA, 1971; CHISAKA y KEARNEY, 1970). HUGHES y CORKE (1974) estudiaron la influencia del pH en este proceso, indicando que solo se realizaba a pH 4-5,5.

Por otra parte, la matriz del suelo puede también modificar el comportamiento de los inhibidores de sus enzimas. CERVELLI *et al.*

(1977), estudiaron el efecto de los herbicidas derivados de la urea, fenuron, monuron, diuron y linuron, (Fig. 5), sobre la ureasa del suelo y ureasa extraída de judías verdes (CERVELLI *et al.*, 1975 a, 1976), observando que se comportaban como inhibidores de naturaleza heterogénea.

El objetivo que les llevó a realizar dicho trabajo, fue conocer la relación entre herbicidas y fertilizantes, ya que se da una tendencia creciente en suministrarlos juntos, eligiendo

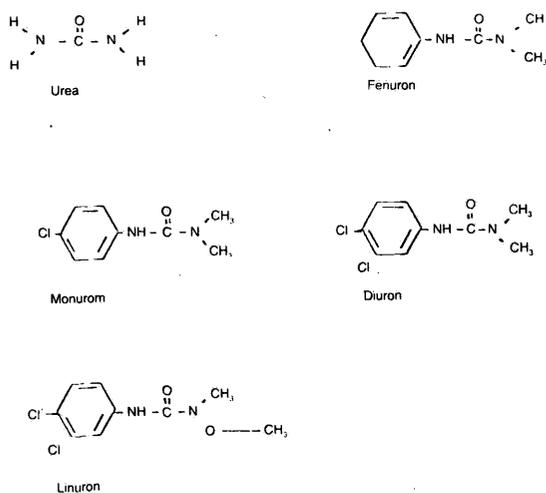


Fig. 5.— Urea y algunas ureas sustituidas.

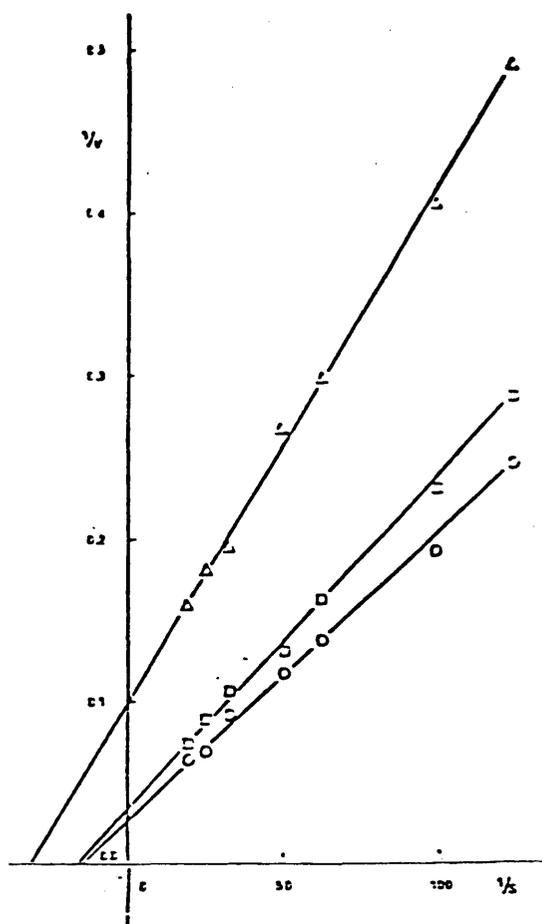


Fig. 6.— Representación de Lineweaver-Burk relativos a la ureasa del suelo. Los valores de $1/v$ representan las inversas de la velocidad ($\text{ppm}\cdot\text{h}^{-1}$) y los valores de $1/S$ las inversas de la concentración de urea (molar). (CERVELLI *et al.*, 1977.)

para ello el caso de la urea, debido a su amplio uso y a ser hidrolizada a amonio por la ureasa del suelo.

Así pues, averiguaron las relaciones cinéticas entre la ureasa del suelo y los herbicidas, así como entre éstos y la ureasa procedente de judías verdes, comparando luego las constantes cinéticas obtenidas y sugiriendo a partir de las diferencias observadas, un posible efecto de la matriz del suelo sobre el complejo enzima-herbicida.

De igual modo, al ser los citados compuestos de semejante composición y estructura, supusieron un mecanismo de inhibición similar. De esta forma, considerando esta hipótesis y

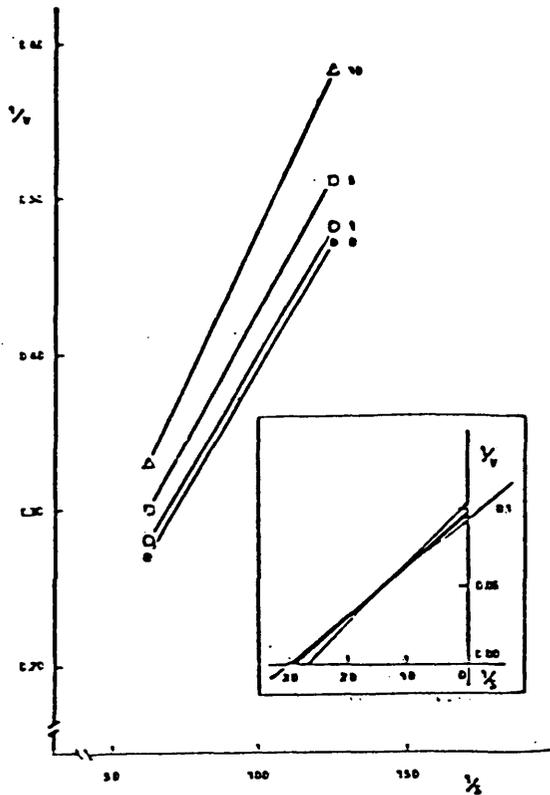


Fig. 7.— Representación de Lineweaver-Burk correspondientes a la inhibición de ureasa del suelo de Corleto (Italia) por fenuron. Los valores $1/v$ constituyen las inversas de la velocidad ($\text{ppm}\cdot\text{h}^{-1}$) y la inversa de la concentración de urea ($1/S$) viene expresada en moles/litro. (CERVELLI *et al.*, 1977.)

por otro lado el hecho de que en el suelo se produce un fenómeno de adsorción sobre los productos, desarrollaron una relación cinética para calcular las constantes de inhibición. Asimismo obtuvieron una relación lineal entre los valores σ de Hammett y el $\log K_i$ para fenuron, monuron y diuron, a partir de lo cual propusieron la formación de un complejo entre herbicidas y enzimas.

La Fig. 6 muestra una representación doble recíproca que enfrenta v y S para 3 suelos seleccionados en los que frente a los compuestos en estudio, observaron un mismo comportamiento cinético del enzima.

Los resultados obtenidos para la actividad ureásica de los tres suelos frente a los diversos compuestos, indicaron un mismo comportamiento cinético. En efecto, esto se puede apreciar en la Fig. 7, puesto que observando la velocidad de hidrólisis de la urea frente a su concentración, a varias concentraciones de herbicida, la intersección de las líneas rectas no tiene lugar ni en la ordenada ni en la abscisa.

En la inhibición de tipo mixto, tanto la K_m y V_m como los datos cinéticos, adquieren características de inhibición competitiva y no competitiva. La afinidad del enzima por el substrato es reducida y la rotura del complejo EIS impedida. Teniendo en cuenta tales características, CERVELLI *et al.*, (1977) describieron dicho tipo de inhibición mediante las siguientes ecuaciones:



donde I_s es el inhibidor en solución y α representa el cambio de afinidad inducido por el inhibidor ($1 < \alpha < \infty$).

A partir de las ecuaciones anteriores dedujeron la siguiente:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left[1 + \frac{(I_s)}{K_i} \right] + \frac{K_s}{V_m} \left[1 + \frac{(I_s)}{K_i} \right] \frac{1}{(S)} \quad (1)$$

Por otra parte añadieron, que cuando existe una adsorción de superficie, si la adsorción del inhibidor viene descrita por la Ley empírica de Freundlich, se ha de considerar otra ecuación:

$$I_a = I_s \quad (I_a) = K(I_s)^{1/n}, \quad (2)$$

donde (I_a) corresponde a x/m e (I_s) a C en la isoterma de Freundlich.

A partir de las ecuaciones (1) y (2) obtuvieron la ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left[1 + \frac{K_s}{(S)} \right] + \frac{1}{V_m K_i K^n} \left[\frac{1}{\alpha} + \frac{K_s}{(S)} \right] (I_a)^n \quad (3)$$

Para dos determinadas concentraciones de substrato (S_1 y S_2), las líneas rectas descritas por la ecuación (3) se cortan cuando $1/v_1 = 1/v_2$, siendo $1/v_1$ la inversa de la velocidad a la concentración de substrato (S_1) y $1/v_2$ a la concentración (S_2). En cuanto a la abcisa, su valor en el punto de intersección será $K_i K^n$, obteniéndose K_i conociendo K y n en la ecuación de Freundlich. Es decir, a partir de la ecuación (3) el correspondiente valor de la abcisa será:

$$(I_a)_{S_1}^n = (I_a)_{S_2}^n = -K_i K^n \quad (4)$$

Por lo tanto, es posible averiguar los valores de K_i sabiendo las constantes de absorción de los productos, las cuales en este caso es posible calcular (CERVELLI, 1975 b), ya que la absorción de los compuestos derivados de la urea siguen la isoterma de Freundlich.

Así pues, dichos autores hallaron la velocidad de hidrólisis de la urea y los valores $(I_a)^n$ para los distintos herbicidas, a las dos concentraciones de urea (S_1) y (S_2) consideradas para cada suelo.

De igual modo determinaron mediante análisis de regresión lineal, las constantes de las 2 rectas correspondientes a (S_1) y (S_2) y los coeficientes de correlación. Igualmente, a partir de la intersección de la abcisa y teniendo en cuenta la ecuación (4) hallaron las constantes de inhibición.

La Fig. 8 muestra la relación entre $\log K_i$ y los valores sigma de Hammett de los distintos herbicidas, para cada suelo. CERVELLI *et al.* (1975c) propusieron fórmulas de resonancia

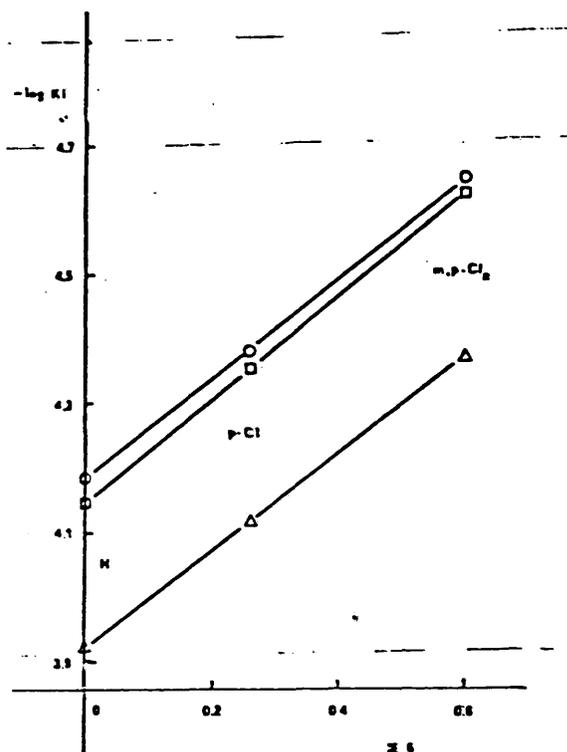


Fig. 8.— Gráfica de los valores sigma de Hammett en relación a $-\log K_i$ para fenuron, monuron y diuron. (O) Suelo de Campeda; (C) suelo de Madonna di Vaggiano; (Δ) suelo de Corleto. (CERVELLI *et al.*, 1977.)

para complejos inhibidores de ureasas, en las que la molécula de enzima reacciona con el agente inhibidor a través del átomo de oxígeno del grupo carbonílico, formando un complejo que puede ser fácilmente estabilizado por resonancia (Fig. 9). Considerando todo esto, los valores negativos de ρ obtenidos indican que los sustituyentes que tienen capacidad de retirar electrones del anillo fenólico, estabilizarían una carga positiva sobre el átomo adyacente al anillo aromático, la cual se formaría durante la reacción entre enzima e inhibidor.

En la Fig. 9 vienen expresadas dos posibles formas moleculares del complejo enzima-herbicida. La resonancia deslocaliza la carga positiva entre los dos átomos de N, con la consecuente dispersión de la misma sobre la estructura molecular del inhibidor.

El hecho de que CERVELLI *et al.* (1975a), encontraron mayores valores de K_i para la ureasa extraída de los suelos que para la proveniente de las judías, les hizo suponer que se debía a un efecto de la matriz, el cual podría en uno u otro caso incrementar la carga positiva parcial nuevamente formada, o causar el desplazamiento de la nube de electrones hacia el átomo de N adyacente al anillo fenólico.

Por otra parte, aunque fuesen superiores los valores de la K_i correspondientes a los suelos, ésto no significa que no pudieran ser iguales a los valores de la K_i relativa al enzima extraído de las judías, ya que muchos enzimas, según su procedencia, presentan diferentes constantes cinéticas. Así las diferencias observadas entre la ureasa absorbida y la no absorbida, podría ser causada por un fenómeno de difusión (LILLY *et al.*, 1966; McLAREN y PACKER,

1970; SUNDARAM *et al.*, 1970; KASCHE *et al.*, 1971; SHULER *et al.*, 1972; KOBAYASHI y MOOYOUNG, 1973), en consecuencia habría que tener en cuenta este fenómeno al explicar el comportamiento de los enzimas en el suelo. Así pues, considerando los fenómenos de adsorción y difusión que influyen enormemente la actividad enzimática del suelo, se puede llegar a una más precisa determinación de K_i y en general de sus constantes cinéticas.

Cualquier otra evidencia sobre los efectos del microambiente en la relación enzima-biocida es circunstancial, por ejemplo, pueden tener lugar interacciones carga-carga entre la matriz del suelo y los biocidas.

Recientemente LADD y BUTLER (1975) han comparado el sistema enzima-humus con sistemas enzimáticos polianiónicos sintéticos. Las concentraciones de biocida con una carga opuesta a la de la matriz, son mayores en el microambiente circunstante que en la solución del suelo, por lo que menores cantidades de biocidas serían suficientes para modificar la actividad enzimática del suelo. Contrariamente, los enzimas podrían ser modificados solamente por mayores cantidades de biocidas, con una carga igual a la de la matriz que circunda a la proteína.

Por otro lado, la interrelación biocida-enzima puede ser modificada indirectamente a través de la influencia de la matriz del suelo sobre los microbios. La matriz puede influenciar la ecología de los microorganismos del suelo y consecuentemente el origen de los enzimas del mismo. Un ejemplo de adsorción entre microorganismos y partículas del suelo, es la rápida propagación de *Fusarium oxysporum* e *Histoplasma capsulatum* en suelos deficientes

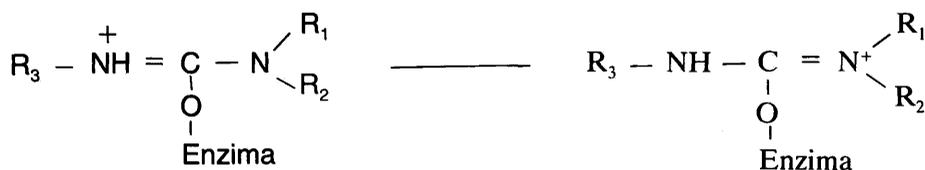


Fig. 9.— Fórmulas propuestas de resonancia de complejos inhibidores de ureasas. (CERVELLI *et al.*, 1977c.)

en arcilla (STOTZKY, 1972). Otro ejemplo de este efecto, ha tenido lugar en los denominados "suelos de larga vida" de América Central, en los que dicha especie de *Fusarium* no se diseminaba a causa del carácter arcilloso del suelo.

Según STOTZKY (1972) los microhábitat que difieren en la composición de los minerales de arcilla, influyen en la ecología de los microorganismos mediante su capacidad de tamponamiento. Si al microhábitat se le añade sustrato, se induce un crecimiento inicial de bacterias asporógenas y sucesivamente aparecen bacterias, *Actinomicetos* y finalmente hongos. Estos son los colonizadores más lentos, ya que además de germinar con mayor lentitud, pueden requerir factores de crecimiento procurados por poblaciones precedentes.

Como se ha visto anteriormente, la adición de biocidas inhibidores del crecimiento de los hongos o de poblaciones primarias o secundarias, puede cambiar totalmente cualquier secuencia ecológica. Por otra parte, si el movimiento de los biocidas hacia el microhábitat viene impedido (a causa de la carga opuesta o de las roturas estéricas), es difícil que se de interacción entre biocidas y microorganismos.

En definitiva, si no existen interacciones entre los biocidas y la matriz del suelo, la cantidad de ellos en la solución del suelo, es más alta y la posibilidad de un efecto sobre una secuencia microbiana mayor.

CONCLUSIONES

El reciente uso agrícola de compuestos químicos, tales como fertilizantes y biocidas, origina con frecuencia fenómenos de toxicidad, debido, especialmente en el caso de biocidas, a su acumulo en el terreno o al de sus metabolitos.

En la relación que se establece entre biocidas y suelo influye considerablemente la materia orgánica, la cual mediante diversos mecanismos y enlaces químicos realiza una fuerte

absorción, inactivando parcialmente dichos compuestos y disminuyendo así su rendimiento.

Por su parte, las reacciones enzimáticas de suelo son catalizadas por enzimas endocelulares o exocelulares, intentándose individualizar las respectivas actividades mediante diferente metodología y tratamientos.

Asimismo, se pretende relacionar la actividad enzimática del suelo con sus procesos biológicos, con el fin de establecer un "índice biológico" que permita obtener una mayor fertilidad.

En cuanto al proceso de degradación de un biocida en el suelo, éste viene realizado por enzimas exocelulares o endocelulares, incluyendo diversas reacciones químicas, tales como, β -oxidación, rotura de enlaces éster, hidroxilación, etc. Ciertas reacciones son catalizadas por enzimas inducidos por biocidas y otras por enzimas constituyentes esenciales de los microorganismos. Los factores que determinan cuantitativamente las reacciones de degradación de un biocida, son característicos de los enzimas del suelo y de las moléculas de los productos de un compuesto, debido a la heterogeneidad del suelo.

Relativo a la degradación de herbicidas, viene considerado el catabolismo de las anilinas halógeno substituidas, figurando el propanil y en cuanto a insecticidas el malathión.

Por otra parte, son referidos algunos efectos de los biocidas sobre los enzimas del suelo, los cuales resultan en cambio poco influenciados, frente a diversos factores que causan la actividad o inhibición de los enzimas extraídos de los microbios o tejidos de plantas y animales, como metales pesados. Algunos biocidas actúan directamente sobre los enzimas, ejemplo: herbicidas derivados de la urea.

Otros efectos de los biocidas inciden sobre las funciones vitales de los microorganismos, modificando así indirectamente la catálisis enzimática del suelo. Igualmente un biocida puede ser tóxico o fuente de nutrición para los microorganismos. Otro tipo de acción puede incidir sobre los mecanismos de biosíntesis de

los enzimas, disminuyendo su producción, caso del chlordane y aminotriazol. En ciertas ocasiones, la inhibición incide sobre la biosíntesis de enzimas específicos induciéndola o inhibiéndola.

Algunos biocidas actúan a nivel de la membrana desorganizándola (guazatine, dodine, herbicidas de bupiridilium) y otros modificando el transporte (DDT) o los procesos de excreción.

Existen efectos que tienen carácter fisiológico y regulan el crecimiento de las plantas a nivel del ácido indolacético, síntesis de giberelinas, tasas de etileno, germinación de esporas. Algunos son de actividad no específica (fluoride, compuestos con Hg, alquileno bis-ditiocarbamato).

Ciertos productos inciden sobre la dinámica de las poblaciones del suelo, ejemplo, dala-pón, DDT. Salvo determinados tratamientos, los biocidas raramente afectan de forma permanente a todas las poblaciones del suelo, por lo que al inhibir una pueden incrementar otras. Un ejemplo claro de esto es producido por el DDT en la simbiosis entre leguminosas y *Rhizobium leguminosarum*.

La utilización de los biocidas por los microorganismos primarios capaces de metabolizarlos y en segundo lugar de los secundarios (ya que se nutren de los metabolitos producidos por los primarios), o la muerte de los sensibles y su utilización por otros microorganismos (con la consecuente proliferación de éstos), modifica la evolución de las poblaciones microbianas del suelo y por consiguiente su actividad enzimática, todo esto sin descontar la aparición de mutaciones.

En la interacción biocida-enzima se incluye

un efecto inhibitorio de los biocidas sobre los enzimas, teniendo lugar por otra parte la desnaturalización de dichos compuestos por éstos. Sobre esta interacción influye el medio ambiente físico y físico-químico del suelo. Así pues, dada la heterogeneidad del medio, resulta difícil distinguir la actividad enzimática de los fenómenos de interferencia.

En el destino de un biocida en el suelo, en caso de que se originen fenómenos de adsorción, influirán 2 efectos antagónicos: "enzima" y "matriz" y según que predomine el primer efecto o el segundo, el compuesto será degradado o menos. Si dichos efectos son comparables, la acción resultante derivará de otros factores que actúan como delimitantes, como la concentración de biocida, etc. Si el producto no es absorbido por la matriz del suelo, su evolución dependerá de otras condiciones ambientales tales como pH, temperatura, etc.

Algunos biocidas se comportan en el suelo como inhibidores de naturaleza heterogénea, ejemplo, los derivados de la urea, por lo que al ser adsorbidos por las partículas del suelo su concentración dependerá del equilibrio de adsorción.

Aparte de los fenómenos de adsorción, la cinética enzimática del suelo puede venir influenciada asimismo por fenómenos de difusión, por lo que deben ser considerados ambos fenómenos en la determinación de las constantes cinéticas.

Finalmente, la interrelación biocida-enzima puede ser modificada indirectamente por la influencia del suelo sobre los microbios, ejemplo, *Fusarium oxysporum* es difícilmente propagable en suelo arcillosos.

ABSTRACT

GIMENEZ VERDU I., 1987. Evolución de los biocidas en el suelo. *Bol. San. Veg. Plagas* 13: 99-116.

The different factors which affect a biocide when it comes into contact with soil, are indicated, and the consequent persistence of the biocide in that heterogeneous system is described. The degradation pathways of certain compounds commonly used in agriculture are discussed.

Further, the general evolution of biocides is considered in relation to the presence of microorganisms, enzymic activity in the soil and the effects of the physical-chemical composition thereof.

The interaction between biocide and enzymes and the effect of the latter compounds on the growth of plants, as well as the population dynamics of soil organisms, are discussed.

REFERENCIAS

- BAMANN, E. El mismo trabajo publicado por: 1950: *Arch. Pharm.*, 283, 4. 1954: *Biochem. Z.*, 325, 413.
- BARTHA, R. 1971: Fate of herbicide derived chloroanilines in soil. *J. Agric. Fd. Chem.* 19, 385-387. 1975: Microbial transformations and environmental fate of some phenylamide herbicides. *Rocz. Glebozn.* 26, 17-24.
- BARTHA, R. y L. BORDELEAU. 1969a: Cell-free peroxidases in soil *Soil Bio. Biochem.* 1, 139-143. 1969b: Transformation of herbicides-derived chloroanilines by cell free peroxidases in soil. *Bact. Proc.* 4, A26.
- BARTHA, R.; H.A.B. LINKE y D. PRAMER. 1968: Pesticides transformations: production of chloroazoberzénés from chloroanilines. *Science* 161, 582-583.
- BARTHA, R. y D. PRAMER. 1967: Pesticide transformation to aniline and azocompounds in soil. *Science* 156, 1617-1618.
- BENSI A. y A.D. McLAREN. 1975: Redox dependence of papain enzyme activity on charged kaolinite surfaces and in solution. *Soil Biol. Biochem.* 7, 379-381.
- BORDELEAU L. M. y R. BARTHA. 1970: Azobenzene residues from aniline-based herbicides; evidence for labile intermediates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 34-37. 1972a: Biochemical transformations of herbicide-derived anilines in culture medium and in soil. *Can. J. Microbiol.* 18, 1857-1864. 1972b: Biochemical transformations of herbicide-derived anilines: purification and characterization of causative enzymes. *Can. J. Microbiol.* 18, 1865-1871.
- BORDELEAU, L.M., J.D. ROSED y R. BARTHA. 1972: Herbicide-derived chloroazobenzene residues: pathway of formation. *J. Agric. Fd. Chem.* 20, 573-578.
- BURGE, W.D. Microbial populations hydrolysing propanil and accumulation of 3,4-dichloroanilin and 3,3', 4, 4'-tetrachloroazobenzene in soils. *Soil Biol. Biochem.* 4, 379-386. 1973: Transformation of propanil-derived 3,4-dichloroaniline in soil to 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene as related to soil peroxidase activity. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 37, 392-395.
- BURNS, R.G. y W.P. GIPSON. 1976: The disappearance of 2,4-D, diallate and malathion from soil and soil components. Abstr. I.S.S.S. Conference "Agrochemicals in Soils". Jerusalem, 13-18 June.
- BURNS, R.G. A.M. PUKITE y A.D. McLAREN. 1972: Concerning the location and persistence of soil urease. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 36, 308-311.
- CERVELLI, S., P. NANNIPIERI, B. CECCANTI y P. SEGUI. 1973: Michaelis constant of soil acid phosphatase. *Soil. Bio. Biochem.* 5, 841-845.
- CERVELLI, P. NANNIPIERI, G. GIOVANNINI y C. CIARDI. 1975a: La sostanza organica el'assorbimento degli erbicidi ureici nel terreno. *Agr. Ital.* 104, 291-303.
- CERVELLI, P. NANNIPIERI, G. GIOVANNINI y A. PERNA. 1975b: Concerning the distribution enzymes in soil organic matter. Studies about Humus, *Trans. Int. Symp. Humus et Planta VI*, Prague, 291-296. 1975c: Jack bean urease inhibition by substituted ureas. *Pest. Biochem. Physiol.* 5, 221-225. 1976: Relationship between substituted urea herbicides and soil urease activity. *Weed Res.* 16, 365-368. 1977: Effects of soil on urease inhibition by substituted urea herbicides. *Soil Biol. Biochem.* 9, 393-396.
- CERVELLI, P. NANNIPIERI y P. SERGUI. 1978: *Soil Enzymes*, 251-293.
- CHISAKA H. y P.C. KEARNEY. 1970: Metabolism of propanil in soils. *J. Agric. Fd. Chem.* 18, 854-858.
- CULLIMORE D.R. 1971: Interaction between herbicides and soil microorganisms. *Residue Rev.* 35, 65-80.
- CURRIER H.B. y S.A. PEOPLES. 1954: Phytotoxicity of hydrocarbons. *Hilgardia* 23, 155-173.
- DALTON R.L., A.W. EVANS y R.C. RODHIES. 1966: Disappearance of diuron from cotton field soils. *Weeds* 14, 31-33.
- DROBNIK J. y J. SEIFERT. 1955: *Folia. Biol. Prage*, 1 41.
- DUNN C.G., W.L. CAMPBELL, H. FRAM y A. HUTCHINS. 1948: *J. Appl. Phys.* 19 605.
- DURANG G. 1965. Les enzymes dans le soil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 2, 141-205.
- EDWARDS C.A. y A.R. THOMPSON. 1973: Pesticides and the soil fauna. *Residue Rev.* 45, 1-79.
- GALSTYANA A. Sh. 1957: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 25, 261. 1959: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 127, 1099.
- GEISSBÜHLER H., C. HASELEACH, H. AEB y L. EBNER. 1963: The fate of N-(4-chlorophenoxy)-phenyl-N, N-dimethylurea in soil and plants. *Weed Res.* 3, 227-297.
- GETZIN L.W. y I. ROSEFIELD. 1968: Organophosphorus insecticide degradation by heat-labile substances in soil. *J. Agric. Fd. Chem.* 16, 598-601.
- HAYES M.H.B. 1970: *Residue Rev.*, 32, 131.
- HEUER B., I. BIRK y B. YARON. 1976: Effect of phosphatases on the persistence of organophosphorus insecticides in soil and water. *J. Agric. Fd. Chem.* 24, 611-614.
- HOAGLAND R.E. 1974: Hydrolysis of 3', 4'-dichloropropionamide by an aryl acylamidase from *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 14, 383-386.
- HOFMAN E. 1952: Enzymreaktionen und ihre Bedeutung für die Bestimmung der Bodenfruchtbarkeit. *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, 56, 68. 1963: *Recent Progress in Microbiology*, (ed. M.E. Gibbons), 8, 216. Univ. Toronto Press.
- HORNS. 1955: Die Bodenatmung und ein kolorimetrisches Verfahren zur ihrer sienenna Bigen Bestimmung im Freiland. *Z. Acker-Pflanzenbau*, 99, 1.
- HU T.S. y R. BARTHA. 1974: Interaction of pesticide-derived chloroaniline residues with soil organic matter. *Soil Sci.* 116, 444-452. 1976: Hydrolysable and nonhydrolysable 3, 4-dichloroaniline-humus complexes and their respective rates of bio-degradation. *D. Agric. Fd. Chem.* 24, 118-122.
- HUGHES F. y C.T. CORKE. 1974: Formation of tetrachloroazobenzene in some Canadian soils treated with propanil and 3,4-dichloroaniline. *Can. J. Microbiol.* 20, 35-39.
- IRVING G.C.J. y D.J. COSGROVE. 1976: The kinetics of soil acid phosphatase. *Soil Biol. Biochem. B* 335-340.
- IWATA, Y., M. ITTIG y F.A. GUNYHER. 1977: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 6, 1.
- KASCHE V., LUNDOVIST H. y BERGMAN R. (1971). A theoretic

- tical model describing steady-state catalysis by enzymes immobilized in spherical gel particles. Experimental study of -chymotrypsinsepharose. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 15, 615-621.
- KAUFMAN D.D. y P.C. KEARNEY. 1965: Microbial degradation of isopropyl-N-3-chlorophenyl carbamate and 2-chloroethyl-N-3-chlorophenyl carbamate. *Appl. Microbiol.* 13, 443-446.
- KEARNEY P.C. y C.S. HELLING. 1969: *Residue Rev.*, 25.
- KEARNEY P.C. y J.R. PLIMMER. 1972: Metabolism of 3,4-dichloroaniline in soils. *J. Agric. Fd. Chem.* 20, 584-585.
- KEARNEY P.C., D.D. KAUFMAN y M.L. BEALL. 1964: Enzymatic dehalogenation of 2,2-dichloropropionate. *Biochem-Biophys. Res. Commun.* 14, 29-33.
- KELLEY W.D. y R. RODRIGUEZ-KABANA. 1975: Effects of potassium azide on soil microbial populations and soil enzymatic activities. *Can. J. Microbiol.* 21, 565-570.
- KOBAYASHI T. y MOO-YOUNG M. (1972). The kinetic and mass transfer behavior of immobilized invertase on ion-exchange resin beads. *Biotechnol. Bioengng* 15, 47-67.
- KUNIN R. 1952: *Ind. Eng. Chem.*, 44, 79.
- KUPREVICH V.F. 1958: *Vestn. Akad. Nauk SSSR*, 28, (4), 52.
- LADD J.N. y J.H.A. BUTLER. 1975: Humus-enzyme systems and synthetic, organic polymer-enzyme analogs. In "Soil Biochemistry" (E.A. Paul and A. D. McLAREN, Eds.) Vol. 4, pp. 143-194. Marcel Dekker, New York.
- LETHBRIDGE G. y R.S. BURNS. 1976: Inhibition of soil urease by organophosphorus insecticides. *Soil. Bio. Biochem.* 8, 99-102.
- LICHFIELD C.D. y R.P. HUBEN. 1973: Effect of selected pollutants on the specific growth rate and extracellular enzyme synthesis of *Aeromonas proteolytica*. *Bull. Ecol. Res. Comm.* (Stockholm) 17, 464-466.
- LILLY M.D., HORNBY W.E. y CROOK E.M. (1966). The kinetics of carboxymethylcellulose-ficin in packed beds. *Biochem. J.* 100, 718-723.
- LINKE H.A.B. 1970: 3,3', 4'-trichloro-4-(3,4'-dichloroanilino) azobenzene, a degradation product of the herbicide propanil in soil. *Naturwissenschaften* 57, 307-308.
- LOPPES R. y R. DELTOUR. 1975: Changes in phosphatase activity associated with cell wall defects in *Chlamidomonas reinhardtii*. *Arch. Microbiol.* 103, 247-250.
- MARIANI. 1950: *8th. Intern. Congr. Ind. Agr.* Brussels, 275.
- MASHTAKAV S.M., T.M. KULAKOVAYA y S.M. GOLDINA. 1954: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 98, 141.
- MAYAUDON J., L. BATISTIC y J.M. SARKAR. 1975: Properties des activites propteolitiques extraites des sols frais. *Soil Biol. Biochem.* 7, 281-286.
- MCCALLAN S.E.A. y L.P. MILLER. 1958: Innate toxicity of fungicides. *Adv. Pest Control Res.* 2, 107-134.
- McLAREN A.D. y O.L. PACKER. 1970: Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous system *Adv. Enzymol.* 33, 245-308.
- McLAREN A.D., L. RESHETKO y W. HUBER. 1957: Sterilization of soil by irradiation with an electron beam and some observation on soil enzyme activity. *Soil Sci.* 83, 497-501.
- MORROD R.S. 1976: Effects on plant cell membrane structure and fructon. In "Herbicides" (L.J. Audus, Ed.), 292-295. Academic Press, London and New York.
- OWENS R.G. y H.M. NOVOTNY. 1958: Mechanisms of action of the fungicide dichlone (2,3-dichloro ,4-natphtquinone). *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 19, 462-482.
- PETERSON, G.H. 1962: Respiration of soil sterilized by ionizing radiations. *Soil Sci.* 94, 71-74.
- PETIT N.M., A.R.J. SMITH, R.B. FREEDMAN y R.G. BURNS. 1976: Soil urease: activity, stability and kinetic properties *Sci Biol. Biochem* 8, 479-484.
- PLIMMER J.R., P.C. KEARNEY, H. CHISAKA, J.B. YOUNT y U.I. KLINGEBIEL. 1970: 1,3-bis (3,4-dichlorophenyl) triazine from propanil in soils. *J. Agric. Fd. Chem.* 18, 859-861.
- ROBERTSON J.D. 1957: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. J.* 65, 43 p.
- ROSEN J.D., M. SIWIERSKY y G. WINNET. 1970: FMN-Sensitized photolyses of chloroanilines. *J. Agric. Fd. Chem.* 18, 495-496.
- SATYANARAYANA T. y L.W. GETZIN. 1973: Properties of stable cell-free esterase from soil. *Biochemistry* 12, 1566-1572.
- SAUNDERS B.C., A.G. HOLME-SIEDLE y B.P. STARK. 1964: "Peroxidase". Butterworth, Washington D.C. and London.
- SEIFERT J. 1956: *Cesk. Mikrobiol.*, 1, 74.
- SENIOR E., A.T. BULL y J.M. SLATER. 1976: Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide dalapon. *Nature* 263, 476-479.
- SHULER M.L., ARIS R. y TSUCHIYA H.M. (1972). Diffusive and electrostatic effects with insolubilized enzymes. *J. theoret. Biol.* 35, 67-76.
- SKUJINS J. 1967: Enzymes in soil. In "Soil Biochemistry" (A.D. McLaren and G.H. Peterson, Eds.), 1, 371-414. Marcel Dekker, New York. 1974: *Trans. 10 th Intern. Congress of Soils Science III.* 101-107. 1976: Extracellular enzymes in soil. *CRC Critical Rev. Microbiol* 6, 383-421.
- SOKOLOV M.S., L.L. KNYR, B.P. STREKOZOV, V.D. AGARKOV y B.A. KRIZHKO. 1974: Behavior of some herbicides under rice irrigation. *Agroknimiya* 3, 95-106.
- SPROTT G.D. y C.T. CORKE. 1971: Formation of 3,3', 4,4'-tetrachloroazobenzen from 3,4-dichloroaniline in Otario soils. *Can. J. Microbiol.* 17, 235-240.
- STOKES D.M., J.S. TURNER y H. MARKUS. 1970: Effects of the dipyrindyl diquat on the metabolism of *Chlorella vulgaris* II. Effects of diquat in the light of chlorophyll bleaching and plastid structure. *Aust. J. Sci.* 23, 265-274.
- STOTZKY G. 1972: Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 2, 49-137.
- SUNDARAM P.V., TWEEDALE A. y LAIDLER K.J. (1970). Kinetic laws for solid supported enzymes. *Can. J. Chem.* 48, 1498-1504.
- SYLVESTRE G.S. y J.C. FOURNIER. 1979: *Advan. Agronomy*, 31, 1-92.
- VANDERKOOI G. y D.E. GREEN. 1970: Biological membrane structure. I. The protein crystal model for membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 66, 615-621.