



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA

**EFFECTO DEL USO DEL GLIFOSATO EN LA DINÁMICA DE NUTRIENTES Y
ACTIVIDAD MICROBIANA DE SUELOS AGRÍCOLAS EN EL VALLE DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ECOLOGÍA)**

PRESENTA:

PAMELA CHÁVEZ ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SOSTENIBILIDAD, UNAM.
COMITÉ TUTOR: DR. JOHN LARSEN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SOSTENIBILIDAD, UNAM.
DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA

EFFECTO DEL USO DEL GLIFOSATO EN LA DINÁMICA DE NUTRIENTES Y
ACTIVIDAD MICROBIANA DE SUELOS AGRÍCOLAS EN EL VALLE DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ECOLOGÍA)

PRESENTA:

PAMELA CHÁVEZ ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SOSTENIBILIDAD, UNAM.
COMITÉ TUTOR: DR. JOHN LARSEN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SOSTENIBILIDAD, UNAM.
DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2017. MORELIA, MICH.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de abril de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas** de la alumna **Chávez Ortiz Pamela** con número de cuenta **515015641** con la tesis titulada "Efecto del uso del glifosato en la dinámica de nutrientes y actividad microbiana en suelos agrícolas en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila", dirigida por el Dr. Felipe García Oliva:

Presidente: Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros
Vocal: Dra. Yunuen Tapia Torres
Secretario: Dr. John Larsen
Suplente: Dr. Noé Manuel Montaña Arias
Suplente: Dra. Gabriela Olmedo Álvarez

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de mayo de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada por los estudios de Maestría en Ciencias Biológicas (CVU 630699).

Al financiamiento del proyecto PAPIIT DGAPA-UNAM: Análisis de la vulnerabilidad de la dinámica de nutrientes en un ecosistema árido de México IN204013.

Al proyecto PAPIIT DGAPA-UNAM: Uso eficiente del fósforo en sistemas agroecológicos de México: ejemplos de sistemas áridos y templados IA206617 UNAM-PAPIIT, por el apoyo de la beca para poder terminar la tesis y obtener el grado de maestría.

A la Dirección del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas, CONANP por permitirme realizar los muestreos dentro del área protegida

Al Dr. Felipe Francisco García Oliva por aceptar ser mi tutor principal, por todas sus enseñanzas, su atención, su apoyo y su paciencia, por compartirme sus conocimientos sobre biogeoquímica y el gusto a esta ciencia, y también por todos sus comentarios, correcciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de tesis.

Al Dr. John Larsen por ser parte de mi comité tutorial durante la maestría, por el aprendizaje que me brindó, por sus enseñanzas, sugerencias y aportes a este trabajo.

Al Dr. Luis David Alcaraz Peraza, por ser parte de mi comité tutorial durante la maestría, por sus enseñanzas, sugerencias y comentarios que enriquecieron este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Laboratorio de Biogeoquímica de Suelos del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM

Al laboratorio de Microbiómica de la ENES-Morelia, UNAM.

Al Laboratorio de Agroecología por el apoyo de los análisis de ácidos grasos

Al Sr. Oscar Sánchez Liceaga por permitirme usar sus parcelas para realizar la presente tesis y por toda la disposición para realizar la caracterización del manejo.

A Rodrigo Velázquez Duran por el apoyo durante los análisis de laboratorio.

Al Mtro. Alberto Valencia por su apoyo en lo referente a cómputo e internet.

A la Dra. Yunuen Tapia Torres por el apoyo en los análisis microbiológicos y enzimáticos, por toda su ayuda y por todos sus consejos, sus ideas y nuestras pláticas que retroalimentaron mucho mi trabajo en el curso de la maestría.

A la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez, por los consejos e ideas brindados sobre como plantear los experimentos microbiológicos.

A Alberto Morón, por su apoyo durante todo el curso de mis estudios de maestría, sus consejos, sus pláticas, retroalimentación y por todo su apoyo en el laboratorio.

A quienes me ayudaron en mis muestreos: Felipe, Yunuén, Cristina, Beto, Laura, Brenda.

A Semiramis Gutiérrez y Marcela Sarabia por su apoyo en el laboratorio de Agroecología, por enseñarme a realizar la técnica de ácidos grasos y por todos los consejos que me dieron. A Semiramis también, por toda la retroalimentación que me dio sobre el glifosato.

A Emily Sol García, que durante su servicio social, me apoyó en algunas técnicas de laboratorio.

A mis compañeros con los que llegué a compartir el laboratorio de Biogeoquímica: a Cristina, Semiramis, Fanny, Brenda, Emily, Karla, Gaby. Por sus pláticas, aprendizajes, consejos, pláticas y sobre todo por brindarme su amistad.

A todos mis profesores de la maestría, por las enseñanzas que me brindaron y por todos los nuevos conocimientos que obtuve gracias a ellos.

A mis padres, porque me han apoyado durante todos mis estudios académicos, me han enseñado a superarme a mí misma, y me alentaron a ingresar a la maestría.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	11
5. OBJETIVOS	11
5.1 OBJETIVO GENERAL	11
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	11
6. ANTECEDENTES	12
6.1 DINÁMICA DE C, N Y P	12
6.2 DINÁMICA DEL GLIFOSATO EN EL SUELO	16
6.2.1. OCLUSIÓN DE P	16
6.2.2 FACTORES QUE FAVORECEN LA OCLUSIÓN	17
6.2.3 OCLUSIÓN DE P EN SUELOS DEL VALLE DE CUATRO CIÉNEGAS	17
6.2.4. OCLUSIÓN DE GLIFOSATO	18
6.2.5 CAPACIDAD DE MICROORGANISMOS DEL VALLE DE CUATRO CIÉNEGAS PARA CRECER UTILIZANDO DISTINTAS FUENTES DE P	19
6.2.6 CAPACIDAD DE MICROORGANISMOS DEL VALLE DE CUATRO CIÉNEGAS PARA CRECER UTILIZANDO GLIFOSATO	20
7. METODOLOGÍA	22
7.1 SITIO DE ESTUDIO	22
7.1.1 DISEÑO DE MUESTREO	24
7.2.1 ANÁLISIS BIOGEOQUÍMICOS.....	26
7.2.1.1 <i>Humedad y pH</i>	26
7.2.1.2 <i>Análisis de nutrientes</i>	27
7.2.2 ANÁLISIS ENZIMÁTICOS.....	31
7.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	33
7.3 EXPERIMENTO DE OCLUSIÓN DE P	34
7.3.1 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE OCLUSIÓN DE P EN EL SUELO	34
7.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	36
7.4 EXPERIMENTO INCUBACIONES DE SUELO Y MICROBIOLOGÍA	37
7.4.1 EXPERIMENTO DE INCUBACIONES DE SUELO	37
7.4.2 MEDICIÓN DE TASA DE MINERALIZACIÓN DE C EN EL SUELO	38
7.4.3 EXPERIMENTO MICROBIOLÓGICO	40
7.4.4 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.....	41
7.4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	42
8. RESULTADOS	44
8.1 CARACTERIZACIÓN DEL SITIO	44
8.1.1 ANÁLISIS BIOGEOQUÍMICOS Y ANÁLISIS ENZIMÁTICOS	44
8.2 OCLUSIÓN DE P	49

8.2.1 OCLUSIÓN DE P EN EL SUELO.....	49
8.3 EXPERIMENTO INCUBACIONES DE SUELO Y MICROBIOLOGÍA	53
8.3.1 MEDICIÓN DE TASA DE MINERALIZACIÓN DE C EN EL SUELO	53
8.3.2 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.....	59
8.3.3 EXPERIMENTO MICROBIOLÓGICO	62
9. DISCUSIÓN	65
9.1 CARACTERIZACIÓN DEL SITIO	65
9.2 OCLUSIÓN DE FÓSFORO	70
9.3 INCUBACIONES DE SUELO Y MICROBIOLOGÍA	73
9.3.1 TASA DE MINERALIZACIÓN POTENCIAL DE C	73
9.3.2 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.....	76
9.3.3 UTILIZACIÓN DE GLIFOSATO COMO FUENTE DE P	77
10. CONCLUSIONES	81
11. LITERATURA CITADA	83

Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación del Valle de Cuatro Ciénegas y del Ejido de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México.....	22
Figura 2. Diseño de muestreo llevado a cabo en Septiembre de 2014.....	25
Figura 3. Diseño de muestreo llevado a cabo en Junio de 2015	26
Figura 4. Análisis de componentes principales. La muestra 1 representa a la muestra del sitio abandonado. Las muestras 2 a la 11 corresponden al sitio de la nopalera	48
Figura 5. Agrupación de datos de acuerdo al análisis de componentes principales, donde "sm" representa la muestra del sitio abandonado y "n" corresponde a las muestras del invernadero con nopal.	48
Figura 6. Diferencias de oclusión de P entre los dos sitios, antes de realizar la fertilización de P.....	49
Figura 7. Diferencias en la oclusión de P en la interacción Sitio*Fertilización. La fertilización 1 corresponde a 1.09 mg de P/ml, la 2 a 2 mg de P/ml y la 3 a 4 mg de P/ml	50
Figura 8. Oclusión de P en la interacción tratamiento*fertilización. La fertilización 1 corresponde a 1.09 mg de P/ml, la 2 a 2 mg de P/ml y la 3 a 4 mg de P/ml	51
Figura 9. Fertilización vs oclusión (en μg de P g^{-1}) en los dos sitios (invernadero con nopal en rojo, sitio abandonado en azul) con los tres diferentes tratamientos a) Sin tratamiento, b) con glifosato, c) con herbicida Faena®	52
Figura 10. Oclusión de P (en μg de P g^{-1}) que muestra las diferentes pendientes entre los tres tratamientos. La línea azul pertenece al tratamiento sin herbicida, la línea verde al tratamiento con glifosato y la línea roja al tratamiento con Faena® en a) Sitio abandonado, b) Invernadero con nopal.	52
Figura 11. Marcha de la tasa potencial de mineralización de C durante la incubación de los suelos del sitio abandonado.....	54
Figura 12. Marcha de la tasa potencial de mineralización de C durante la incubación de los suelos del invernadero con nopal.	54
Figura 13. Promedio de la tasa acumulada de mineralización por tratamiento: sin tratamiento, glifosato y Faena®. Las barras con diferentes letras significan que son significativamente diferentes con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	55
Figura 14. Promedio por sitios de las actividades enzimáticas de las enzimas Fm, Fd y PO ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$).....	59
Figura 15. Promedio de concentración de ácidos grasos por grupos microbianos en los dos sitios.	61
Figura 16. Agrupación entre sitios de acuerdo a análisis de componentes principales de la estructura de la comunidad microbiana determinada con ácidos grasos. Los puntos representados con "n" se refieren al sitio del invernadero con nopal, mientras que los representados por "sm" se refieren al sitio abandonado.	62
Figura 17. Número de aislados con crecimiento en diferentes fuentes de P y de muestras provenientes de diferentes tratamientos.	63
Figura 18. Interacción Sitio*Incubación, donde "f" pertenece al sitio abandonado, y "n" pertenece al invernadero con nopal. La incubación "s" se refiere a las muestras de suelo incubadas sin herbicida, la incubación "g" se refiere a las muestras incubadas con glifosato y la incubación "f" a las muestras incubadas con herbicida Faena®	64

Figura 19. Interacción Incubación*Fuente, donde la incubación “s” se refiere a las muestras de suelo incubadas sin herbicida, la incubación “g” se refiere a las muestras incubadas con glifosato y la incubación “f” a las muestras incubadas con herbicida Faena®. La fuente “s” se refiere a las bacterias obtenidas en medio Sin P, la fuente “k” se refiere a las bacterias obtenidas en medio con KH ₂ PO ₄ , la fuente “g” se refiere a las bacterias obtenidas en medio con glifosato como fuente de P, y la fuente “fa” a las obtenidas en medio con herbicida Faena®.	64
Figura 20. Dinámica de nutrientes representando diferencias en concentraciones con el tamaño de los cuadros en a) el sitio abandonado y b) el invernadero de nopal. Los cuadros color verde representan nutrientes disueltos (COD= C orgánico disuelto, NOD= N inorgánico disuelto, POD= P orgánico disuelto), los cuadros naranjas representan nutrientes en biomasa microbiana (Cmic= C microbiano, Nmic= N microbiano, Pmic= P microbiano), los cuadros púrpura representan nutrientes inorgánicos disponibles (Dp-NH ₄ = Amonio disponible, Dp-NO ₃ = Nitrato disponible, Dp-PO ₄ = Fósforo inorgánico disponible). Los cuadros punteados color azul representan pérdidas a la atmósfera. Las flechas azules representan inmovilización de nutrientes. Las letras color rojo representan la actividad enzimática (PO= polifenol oxidasa, NAG= N-acetil glucosaminidasa, BG= Beta glucosidasa, Fm= Fosfomonoesterasa, Fd= Fosfodiesterasa, Fn= Fosfonatasa).....	66
Figura 21. Invernadero de nopal en el Ejido de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Fotografía tomada el mes de Septiembre de 2014 por Pamela Chávez Ortiz.	67
Figura 22. Interacciones de surfactantes los no iónicos clasificados como ANEOs, con diferentes compuestos del suelo. Imagen modificada de Krogh <i>et al.</i> , 2003	72
Figura 23. Estructura teórica del POEA (Tush <i>et al.</i> , 2013).....	72
Figura 24. Rutas de degradación del glifosato. Modificado de Boggaard y Gimsing, 2008.	78

Índice de Tablas.

Tabla 1. Enzima, sustrato, concentración del sustrato y tiempo de incubación.	32
Tabla 2. Diseño experimental para análisis de oclusión de P y número de réplicas por tratamiento.	35
Tabla 3. Diseño experimental para experimento de incubaciones de suelo y número de réplicas por tratamiento.	38
Tabla 4. Variables biogeoquímicas medidas para el sitio abandonado y el invernadero con nopal (promedio con error estándar para este último). El valor de p para determinar las diferencias significativas entre sitios se calculó con la prueba T para una muestra.	44
Tabla 5. Resultados obtenidos para la actividad enzimática de ambos sitios. Medias con error estándar para el sitio del invernadero con nopal.....	45
Tabla 6. Resultados del análisis de correlación de Spearman. En color rojo se muestran los valores de correlación significativas (p<0.05)	46
Tabla 7. Porcentaje de la varianza explicada por los dos primeros componentes (Eigenvalor) y el peso de las variables analizadas en los dos primeros componentes (Eigenvector). Las variables con mayor peso se marcan con color rojo.....	47

Tabla 8. Valores de las pendientes de las rectas de fertilización contra oclusión presentadas en la figura 9 y 10.	53
Tabla 9. Medias y error estándar de las variables Biogeoquímicas analizadas.	55
Tabla 10. Resultados del ANOVA de las variables biogeoquímicas y de la tasa potencial de mineralización de C. Se presenta el valor de F junto con el valor de p entre paréntesis. Los datos con diferencias significativas se encuentran en color rojo.....	56
Tabla 11. Media y error estándar de la actividad enzimática en los diferentes sitios y tratamientos.....	58
Tabla 12. Resultados del ANOVA de la actividad enzimática. Se presenta el valor de F junto con el valor de p entre paréntesis. Los datos con diferencias significativas se encuentran en color rojo.....	58
Tabla 13. Valores de F y de p resultados del ANOVA factorial para cada uno de los ácidos grasos obtenidos. Los valores significativos se muestran en color rojo.....	60
Tabla 14. Valores de F y de p (entre paréntesis) resultados del ANOVA factorial para la concentración de ácidos grasos por grupo microbiano. Los valores significativos se muestran en color rojo.....	61

1. Resumen

La alta demanda de la producción de alimentos en los últimos años ha ocasionado que la agricultura se expanda y se intensifique, la cual la va a hacer depender de mayor cantidad de agroquímicos, siendo los plaguicidas unos de los más utilizados. La utilización de este tipo de compuestos ha generado diversos efectos en el medio ambiente, influyendo en la degradación de los suelos, y en particular, en los organismos que lo habitan. En la actualidad, los plaguicidas más utilizados pertenecen al grupo de los organofosforados. Uno de estos plaguicidas con mayor demanda es un herbicida llamado glifosato, un fosfonato que se caracteriza por su enlace directo carbono-fósforo (C-P), el cual es más estable que el de otras moléculas orgánicas que contienen P (i.e. ésteres de fosfato) y le confiere más resistencia a la degradación. El glifosato, para su mineralización, requiere que los microorganismos produzcan las enzimas específicas para su degradación. Estos tipos de microorganismos se pueden encontrar en ecosistemas, donde el P es un nutriente limitante, como es el caso del sitio del presente estudio, el Valle de Cuatro Ciénegas, en Coahuila.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar los efectos del glifosato en la dinámica de nutrientes y en la actividad microbiana en suelos agrícolas donde se aplica el glifosato, así como la obtención de bacterias con capacidad de degradar herbicidas con glifosato. Para ello se colectó suelo proveniente de dos parcelas: a) una parcela agrícola con nopal, donde se ha utilizado el glifosato por un periodo de 5 años y b) una parcela con 5 años de abandono después de producir alfalfa con aplicación de glifosato. En el suelo, se cuantificaron el fósforo (P) y nitrógeno (N) en sus formas disponibles, el carbono (C), N y P orgánicos disueltos y su concentración inmovilizada dentro de la biomasa microbiana. También se midió la actividad de las enzimas que degradan compuestos con enlaces fosfoéster, fosfodiéster y enlaces C-P de fosfonatos, además la actividad de las enzimas B-glucosidasa, N-acetil glucosaminidasa y polifenol oxidasa. Además, se realizó un experimento de oclusión de P, para analizar cómo afecta el glifosato en la disponibilidad

del fósforo. Por último, se realizó un experimento de incubaciones de suelo utilizando tratamientos con glifosato, donde se midió la mineralización potencial de carbono, los cambios en diferentes variables biogeoquímicas y se caracterizó la comunidad microbiana utilizando un análisis del perfil de ácidos grasos. Así mismo, en este experimento, se extrajeron microorganismos del suelo para obtener aislados capaces de utilizar como fuente de P al glifosato y a un herbicida comercial con glifosato. Como resultados se obtuvieron diferencias significativas entre sitios tanto en la caracterización biogeoquímica y actividad enzimática, como en los análisis de oclusión de P, en la tasa potencial de mineralización de C y en los análisis del perfil de ácidos grasos. El herbicida comercial con glifosato resultó tener efecto positivo en la oclusión de P, pero efecto negativo en el P microbiano después de las incubaciones y en la concentración de un ácido graso específico para actinobacterias. Gran parte de los efectos ocasionados a los organismos vivos por el herbicida comercial son atribuidos a los surfactantes no iónicos que forman parte de los ingredientes de este producto, además de que se ha encontrado que estos surfactantes pueden afectar la movilidad de diferentes plaguicidas en el suelo, aumentando su adsorción. El glifosato afectó negativamente la mineralización potencial de C en el suelo, probablemente debido a los efectos inhibitorios que este tiene en la ruta del ácido shiquímico, responsable de la producción de aminoácidos aromáticos, que puede encontrarse en algunos microorganismos. En cuanto a la degradación de glifosato, un 88% de los microorganismos cultivables aislados pudieron utilizar el glifosato como fuente de P, mientras que sólo un 30% pudo utilizar el herbicida comercial, lo que indica que gran parte de las bacterias de los suelos agrícolas de Cuatro Ciénegas tienen las herramientas enzimáticas necesarias para mineralizar este compuesto puro, lo cual concordó con la presencia de actividad enzimática de fosfonatasa, pero son vulnerables a los demás ingredientes que constituyen el herbicida comercial, reduciendo su capacidad de degradación del producto comercial.

2. Abstract

In the past years, the high demand of food worldwide promote that the agriculture must to be expanded and intensified, characterized by a strong dependence to agrochemicals, being pesticides the most used. The use of this kind of compounds has generated diverse environmental effects, influencing on the soil degradation and in the living organisms that inhabit it.

The most commonly used pesticides belong to the group of organophosphates. Today, one of the most demanded pesticides is glyphosate, a phosphonate characterized by its carbon-phosphorus (C-P) bond, a more stable bond than other P-containing organic molecules such as phosphate esters, therefore more resistant to degradation. The mineralization of glyphosate requires microorganisms with specific enzymes. These microorganisms can be found in ecosystems where P is a limiting nutrient as is the case of the site chosen for this study, Cuatro Ciénegas Basin (CCB), in Coahuila.

The aim of this work was to evaluate the effects of this herbicide on nutrient dynamics and microbial activity, in two sites with different management history, as well as the identification of bacteria species with the ability to degrade this herbicide.

Soil was collected from a nopal agricultural plot in the CCB, where glyphosate had been used for the last 5 years, and a composite sample was also obtained from a site after 5 years since it was abandonment, localized outside the nopal plot, to analyze the differences between sites. Phosphorous (P) and nitrogen (N) were quantified in their available forms, dissolved organic carbon (C), N and P, and the amount of C, P and N within microbial biomass. Activity of enzymes that degrade compounds with phosphoester, phosphodiester bonds and C-P bonds of phosphonates was quantified; also the enzymatic activity of B-glucosidase, n-acetyl glucosaminidase and poliphenol oxydase was quantified. Using soil from the same sites, a P occlusion experiment was performed, to observe how glyphosate affects in the P availability. Finally, an incubation

experiment was done, using soil with glyphosate treatments, where carbon potential mineralization and changes in different biogeochemical variables were analyzed and the microbial community was characterized by using a fatty acids profile. Microorganisms were extracted from soil incubations to obtain bacterial isolates capable of use glyphosate and a commercial herbicide with glyphosate as sole source of P.

As results, significant differences were obtained in the biogeochemical characterization, in the analysis of the P occlusion, in the potential rate of C mineralization and in the fatty acid profile analysis between both plots. The commercial herbicide with glyphosate was found to have an effect on P occlusion, on microbial P after incubations and on a specific fatty acid for actinobacteria. Many of the effects caused on living organisms by the commercial herbicide, are attributed to the non-ionic surfactants that are part of the ingredients in this product, besides, it has been found that these surfactants can affect the mobility of different pesticides in the soil, enhancing their adsorption. Glyphosate affected negatively the soil potential C mineralization, probably because of the inhibitory effects of this compound in the shickimic acid pathway, which is responsible of the aromatic aminoacids production and can be found in some microorganisms. About the degradation of glyphosate, 88% of the isolated microorganisms were able to use glyphosate as a source of P, but only 30% of the isolates were able to use the commercial herbicide. This suggest that a great part of bacteria from agricultural soils of CCB have the enzymatic tools needed for mineralizing the glyphosate, but also most of them are susceptible to others ingredients that are part of the commercial herbicide.

3. Introducción

En los últimos 30 años, la producción agrícola se ha duplicado y la superficie de tierras de cultivo se ha incrementado en un 15% (FAO, 2013). Actualmente, los campos de producción agrícola ocupan un 12.6% de la superficie terrestre (FAO, 2015). La agricultura es una de las principales actividades primarias de producción, sin embargo, su alta demanda ha conllevado a su expansión e intensificación de métodos, los cuales implican utilizar mayores volúmenes de agua, energía, fertilizantes, plaguicidas, herbicidas y especies no nativas (Ren-Benayas, 2011), lo cual ha tenido efectos ambientales negativos. Algunos de estos impactos negativos son la deforestación, la emisión de gases de efecto invernadero de origen antropogénico, además de la pérdida de biodiversidad, de las funciones de los ecosistemas y la degradación de los recursos hídricos (Ren-Benayas *et al.*, 2007; Rohr *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2010). Así mismo, la agricultura es una de las causas de la degradación química del suelo (SEMARNAT, 2003), la cual genera la disminución de la fertilidad, la salinización y alcalinización, como la eutrofización del suelo (SEMARNAT, 2012).

Se estima que a nivel mundial, la superficie de suelos degradados debido a las actividades agrícolas es aproximadamente de 1.24×10^7 km² (Lepers *et al.*, 2005). En México, cerca del 45% de los suelos están afectados por algún proceso de degradación (erosión hídrica y eólica y degradación química y física), de la cual, la degradación química ocupa el primer lugar (18% del territorio nacional). La degradación química involucra procesos que conducen a la disminución o eliminación de la productividad biológica del suelo. En nuestro país, el 97% de la superficie con degradación química corresponde a suelos con problemas de fertilidad (SEMARNAT, 2012).

Una de las causas de la degradación química en los suelos se relaciona con el uso de compuestos xenobióticos a gran escala destinados a la agricultura. El uso de estos compuestos, propiciado por la revolución verde que comenzó en 1960 (FAO, 1996), ha generado gran variedad de problemas ambientales, tales como contaminación del aire,

del agua y de los ecosistemas terrestres, efectos dañinos en la biota y la alteración de la dinámica de nutrientes en la mayoría de los ecosistemas (Singh *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la agricultura en los últimos años se ha caracterizado por una fuerte dependencia a los agroquímicos (Villalba, 2009). Dentro de los agroquímicos, los plaguicidas son los productos más ampliamente utilizados. Un plaguicida se define como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier peste o plaga, incluyendo a diferentes especies de plantas (EPA, 2009).

Los plaguicidas son uno de los insumos agrícolas más importantes que fueron desarrollados en la segunda mitad del siglo pasado, incrementando la producción agrícola. Sin embargo, la utilización excesiva de los plaguicidas ha generado la contaminación de los ecosistemas en distintas partes del mundo (Post, 1998). Aunado a lo anterior, su uso tiene altos riesgos, ya que la mayoría son altamente tóxicos para los humanos y para la biota (Singh *et al.*, 2006; Galloway *et al.*, 2003) y en la mayoría de los casos, el costo de su uso es mayor al beneficio obtenido por su utilización. Debido a sus efectos dañinos, es importante remover estos compuestos del ambiente. Se han buscado estrategias para mitigar los problemas de contaminación por plaguicidas mediante técnicas de biorremediación, basadas en el uso de microorganismos con el fin de desnaturalizar a los compuestos contaminantes; pero para poder llevar a cabo estos procesos es esencial identificar a los microorganismos capaces de degradarlos (Iranzo *et al.*, 2001).

En la actualidad, los plaguicidas más utilizados pertenecen al grupo de los organofosforados (Singh *et al.*, 2006), reportándose más de 100 plaguicidas organofosforados usados a nivel mundial. El fósforo en este tipo de compuestos, está presente como moléculas de fosfonatos (Singh, 2006). Los fosfonatos se encuentran en un bajo estado de oxidación (+3) y se caracterizan por su enlace directo carbono-fósforo (C-

P), el cual es más estable que el de los ésteres de fosfato y por lo tanto, son más resistentes a la degradación por factores químicos, térmicos, fotolíticos y enzimáticos (Hayes *et al.*, 2000). Afortunadamente, algunas bacterias tienen la capacidad enzimática para la degradación de los fosfonatos (Kononova y Nesmeyanova, 2002). En los últimos 50 años, se han introducido distintos compuestos organofosforados sintéticos, en forma de insecticidas, herbicidas, fungicidas, antibióticos y armas químicas. Entre los diferentes tipos de plaguicidas, destaca el uso de herbicidas (Grube, 2011), como lo es el glifosato (N-fosfonometil glicina), un compuesto que se caracteriza por ser un fosfonato y que ha sido uno de los herbicidas más utilizados de los últimos años (Duke y Powles, 2008). El herbicida glifosato, actualmente es ampliamente utilizado en los países sudamericanos, centroamericanos y en México (Buffin y Topsy, 2002). Sin embargo en nuestro país, a pesar de su uso intensivo, existen pocos trabajos que busquen estrategias para mitigar los efectos que puede causar este herbicida.

El suelo es indudablemente el almacén más susceptible del ecosistema a estos compuestos, ya que se expone con mayor frecuencia a la influencia de los herbicidas (Gianfreda *et al.*, 2011). Cuando estos se aplican constantemente en el suelo durante las actividades agrícolas, la presencia de diferentes moléculas puede provocar efectos negativos en la comunidad microbiana del suelo, así como alterar procesos edáficos, tales como el flujo de energía, la dinámica de nutrientes, así como modificar la estructura de las comunidades microbianas (Wardle *et al.*, 1990), de las cuales dependen muchos de los procesos que se llevan a cabo en el suelo, tales como la descomposición de residuos orgánicos, la promoción del crecimiento de las plantas y la disponibilidad de nutrientes (Jacobsen *et al.*, 2014).

La disponibilidad del fósforo (P) depende de la mineralización bioquímica de las moléculas orgánicas con P (Walker y Syers, 1976), la cual está regulada por la actividad de microorganismos. Esta mineralización se realiza con exo-enzimas producidas por estos mismos, quienes al convertir los compuestos orgánicos en inorgánicos, pueden hacer uso

del P (Alexander, 1981). En los últimos años, se han reportado algunas bacterias que pueden utilizar compuestos organofosforados como fuente de carbono, nitrógeno o fósforo. Debido al potencial que tienen algunos microorganismos en la degradación de los herbicidas, se han realizado numerosas investigaciones que estudian su capacidad degradativa sobre estos compuestos. Por lo que el uso de microorganismos se ha considerado una opción viable y eficiente para la restauración de ecosistemas contaminados con herbicidas organofosforados (Singh *et al.*, 2006).

En particular, la utilización de microorganismos procedentes de ecosistemas oligotróficos puede ser una alternativa viable, ya que estos organismos tienen las herramientas a nivel genético y enzimático para mineralizar compuestos orgánicos más recalcitrantes, como los fosfonatos. Entre los ecosistemas oligotróficos destacan los desiertos, ya que el fósforo es el principal nutriente que limita la producción primaria neta después de que los requerimientos por agua y nitrógeno han sido satisfechos (Cross y Schlesinger, 2001).

Los ecosistemas áridos y semiáridos representan aproximadamente el 41% de la superficie continental del planeta y están habitados por cerca del 38% de la población mundial (MEA, 2005). Debido al continuo crecimiento poblacional y necesidad de incrementar la productividad agrícola en los países más pobres expuestos a la inseguridad alimentaria, se ha buscado ampliar la superficie agrícola, muchas veces a zonas poco aptas para esta actividad, como son los ecosistemas desérticos (SEMARNAT, 2012; Oldeman, 1998). Las zonas secas albergan alrededor del 44% de las tierras agrícolas del mundo (UNCCD, 2011; SEMARNAT, 2012) y forman parte del 10 al 20% de la superficie de suelos degradados en el mundo (Lepers *et al.*, 2005). En México, las zonas secas ocupan aproximadamente 102 millones de hectáreas, alrededor del 52% del territorio nacional (SEMARNAT, 2008) y además abarcan cerca del 50% de la superficie agrícola de nuestro país (SEMARNAT, 2012). Las zonas desérticas en México se encuentran principalmente en los desiertos Chihuahuense y Sonorense, así como la región del complejo del valle de

Tehuacán-Cuicatlán, ubicado entre los estados de Puebla y Oaxaca (Hernández, 2006).

Dentro del desierto Chihuahuense, se encuentra el Valle de Cuatro Ciénegas (VCC), Coahuila, donde sus suelos presentan concentraciones hasta 5 veces menores del P total a las reportadas en otros desiertos norteamericanos (Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). En estos suelos, la mineralización de formas orgánicas de P es fundamental para la disponibilidad del elemento, ya que en este ecosistema llegan a representar hasta un 49% del P total (Perroni *et al.*, 2014). Entre los compuestos orgánicos, los ésteres de fosfato son los más abundantes; sin embargo también se pueden encontrar otros compuestos como los fosfonatos, los que pueden representar una fuente alternativa de P disponible (Kolowitz *et al.*, 2001), ya que en condiciones de deficiencia de P inorgánico, se inducen genes involucrados en su adquisición y asimilación a partir de la mineralización de los compuestos orgánicos (Fischer *et al.*, 2006).

Alcaráz *et al.*, (2010), reportaron a la bacteria *Bacillus* sp. m3-13, obtenida de una laguna de desecación del VCC, la cual contenía los genes *phn*, que codifican para importadores de fosfonatos, permeasas y C-P liasas. Tapia-Torres *et al.* (2016) identificaron bacterias edáficas proveniente del VCC capaces de crecer utilizando diferentes fuentes de fósforo, entre estas el 2-aminoetil fosfonato (2-AEP), el fosfonato biogénico más abundante en la naturaleza, que requiere enzimas específicas para poder ser mineralizado (Konova y Nesmeyanova, 2002). En este trabajo, las bacterias degradadoras de 2-AEP principalmente pertenecieron a los phyla Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria. Posteriormente, utilizando los aislados con mejor crecimiento en el medio con 2-AEP, Morón (2014) probó la capacidad de crecimiento de los aislados bacterianos en el compuesto N-fosfonometil glicina (glifosato), obteniendo 10 aislados que potencialmente podrían ser utilizado en suelos expuestos con herbicidas que contienen glifosato.

En los trabajos anteriores se ha probado la capacidad degradativa de las bacterias

edáficas del VCC, tanto en fosfonatos naturales (2-AEP), como sintéticos (glifosato). En el presente trabajo se analizará la capacidad degradativa del herbicida comercial Faena® de nuevos aislados de bacterias, provenientes de suelos manejados y abandonados expuestos a este herbicida, además de identificar las bacterias con mayor capacidad degradativa del glifosato.

4. Pregunta de investigación

¿Cuál es la capacidad de la comunidad microbiana cultivable para degradar al glifosato bajo diferentes intensidades de manejo en un desierto oligotrófico del norte de México?

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Analizar la capacidad de la comunidad de bacterias edáficas en la degradación del herbicida con glifosato (Faena®) en dos sitios con diferente manejo agrícola (invernadero con nopal y de un suelo abandonado).

5.2 Objetivos Particulares

- Caracterizar la dinámica del P y la actividad enzimática en suelos contaminados con herbicidas organofosforados.
- Analizar los efectos del glifosato en la dinámica de nutrientes en el suelo de los dos sitios estudiados.
- Analizar los efectos del glifosato en la actividad microbiana del suelo.
- Seleccionar aislados bacterianos provenientes de un ecosistema árido oligotrófico abandonado y de un ecosistema árido con manejo agrícola para la degradación de herbicida con glifosato.

6. Antecedentes

6.1 Dinámica de C, N y P

El entendimiento de los ciclos biogeoquímicos se basa en estudiar los procesos entrelazados que tienen los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas para proporcionar las moléculas necesarias para el crecimiento y reproducción de los organismos vivos (Paul, 2014). Para la síntesis de estas moléculas, se requieren de seis elementos que se conocen como los principales bloques de construcción para todas las macromoléculas biológicas y que forman el 95% de la masa de la biósfera; estos elementos son Carbono (C), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N), oxígeno (O), Fósforo (P) y Azufre (S) (Schlesinger, 1997). Cada uno de estos elementos tienen su propia dinámica y provienen de distintas fuentes; por ejemplo para el C, N y S, la atmósfera es su fuente primordial, mientras que el intemperismo de los minerales que conforman las rocas parentales es la fuente principal para la obtención de P (Schlesinger, 1997). El C, N y P representan los elementos más importantes biológicamente, ya que forman parte de las biomoléculas que constituyen a los seres vivos (Paul, 2014).

Los suelos son los principales componentes de los ecosistemas terrestres donde ocurren los procesos sustanciales de los ciclos biogeoquímicos (Schlesinger, 1997). La entrada de C en los suelos es por medio de la incorporación de la materia orgánica producida principalmente por la fotosíntesis. Este proceso lo realizan las plantas y algunos microorganismos, los cuales fijan el C atmosférico (en forma de CO_2) y lo transforman en C orgánico (Wardle, 2004). En el suelo, la forma química de C orgánico que puede ser utilizado por los organismos heterótrofos es el C orgánico disuelto (COD), el cual puede estar en forma de moléculas pequeñas (como azúcares simples o aminoácidos) o en moléculas de alto peso molecular (como la celulosa; Neff y Asner, 2000), las cuales deben ser despolimerizadas para que puedan ser utilizadas por la comunidad microbiana heterótrofa. Una vez que estas moléculas son inmovilizadas en la biomasa microbiana son

oxidadas para producir energía por medio de la respiración y liberar nuevamente el C a la atmósfera en forma de CO₂ (Schlesinger, 1997).

Uno de los elementos que a menudo limitan la producción primaria neta es el Nitrógeno (N) (Schlesinger, 1997). El N se encuentra en la atmósfera en forma de N₂ gaseoso y la manera en la que este puede entrar a los ecosistemas terrestres es por medio del proceso de fijación biológica, la cual es llevada a cabo por bacterias fijadoras (*Cyanobacterias*, bacterias del género *Burkholderia*, *Frankia* y *Clostridia*) que tienen la capacidad de romper los enlaces covalentes triples del N₂ y reducirlo a amonio (NH₄⁺) (Falkowski, 2008; Fenchel *et al.*, 2012). Cuando los microorganismos lo liberan como amonio al suelo puede ser absorbido por las plantas y posteriormente este N contenido en la materia orgánica es degradado por microorganismos que a través de la acción de exo-enzimas, son capaces de romper los polímeros complejos como pueden ser proteínas, ácidos nucleicos y quitina, y los convierten en subunidades pequeñas y solubles en agua, como aminoácidos y nucleótidos, liberando de esta forma el N como N orgánico disuelto (NOD). El NOD puede nuevamente ser absorbido por microorganismos, los cuales dependiendo de la disponibilidad de C y N en los suelos, pueden inmovilizarlo o mineralizarlo, liberando NH₄⁺ a la solución del mismo (Chapin *et al.*, 2011). Finalmente el NH₄⁺ puede oxidarse por bacterias a nitritos (NO₂⁻) (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* y *Nitrosopumilus*), y posteriormente a nitratos (NO₃⁻), lo cual es llevado a cabo por un grupo restringido de bacterias nitrificantes (*Nitrospira*) (Fenchel *et al.*, 2012). Cuando el sistema se encuentra limitado por C, aumenta la proporción en la que el NOD es absorbido por microorganismos para soportar las demandas energéticas para el crecimiento y se desecha el N en exceso en forma de NH₄⁺, el cual lo utilizan bacterias nitrificantes como fuente de energía y por tanto, la nitrificación se convierte en el proceso dominante (Chapin *et al.*, 2011).

El ciclo global del P se caracteriza entre los otros ciclos, porque no tiene una fase gaseosa y es controlado principalmente por reacciones geoquímicas del P con los

minerales del suelo (Schlesinger, 1997). La mayor parte del P en el suelo es originado por la intemperización de minerales que contienen fosfatos, principalmente la apatita (Paul, 2014; Schlesinger, 1991). El anión ortofosfato (PO_4^{3-}) procedente del intemperismo de la apatita es la forma principal de P inorgánico disponible para la biota, sin embargo, esta forma química de P es poco abundante en el suelo, ya que es muy reactiva, y puede generar diferentes tipos de moléculas por procesos de precipitación, disolución y oclusión (Frossard *et al.*, 2000).

Los procesos de precipitación y oclusión dan lugar a que en las etapas posteriores del intemperismo y del desarrollo del suelo, dominen las formas de P orgánico y P ocluido en el sistema (Walker and Syers, 1976), siendo el P orgánico la principal fuente de P disponible, pero para ello primero debe ser mineralizado. La mineralización se lleva a cabo por las exo-enzimas producidas por bacterias, plantas y hongos, como las fosfomonoesterasas, fosfodiesterasas y fosfonatasas (Paul, 2014). La producción de estas enzimas por la microbiota, es dependiente del COD, ya que este representa la energía necesaria para que las bacterias produzcan las enzimas que mineralizan al P orgánico (Chapin *et al.*, 2011). Por lo tanto, en lugares donde haya una mayor concentración de COD, hay mayor capacidad para mineralizar al P orgánico.

Otro proceso importante para la disponibilidad del P es la solubilización, cuyo fin es volver soluble al P que reaccionó con los cationes presentes en el suelo y se precipitó en formas químicas no disponibles. La solubilización consiste en la liberación de formas inorgánicas de P por medio de la producción de ácidos orgánicos, los cuales acidifican la solución del suelo por la liberación de protones (H^+), lo cual ocasiona la transformación química del P insoluble a P inorgánico disponible para poder ser asimilado por la biota del suelo y las plantas (Plassard *et al.*, 2011; Paul, 2014).

Las actividades humanas han tenido impactos en la dinámica de los nutrientes, alterando la regulación de los procesos de los ecosistemas. En la agricultura, el uso de

fertilizantes y el cultivo de plantas fijadoras de N, ha aumentado los flujos de N, lo que ha duplicado las tasas de entradas de N y cuadruplicado las entradas de P a la biósfera (Chapin *et al.*, 2011, Falkowski, 2000).

Los ecosistemas áridos se caracterizan por tener pocas fuentes de energía y nutrientes disponibles para los microorganismos del suelo, y a menudo el N y P son los principales elementos limitantes de la productividad primaria de estos ecosistemas (López-Lozano *et al.*, 2012, Tapia-Torres *et al.*, 2015). En particular, los suelos del Valle de Cuatro Ciénegas (VCC) se caracterizan por tener baja concentración de P. Por ejemplo, en ecosistemas naturales de este Valle se han reportado concentraciones de este elemento que van de 70-90 $\mu\text{g g}^{-1}$ en suelos con pastizales y hasta 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ en suelos con matorrales, las cuales son muy bajas en comparación con otros desiertos de Norteamérica, donde los valores oscilan entre 500 y 1,000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). Sin embargo, a pesar de que la concentración de fósforo total (PT) es baja en los suelos con pastizales del VCC, la proporción de fósforo orgánico es muy alta, llegando a representar hasta el 49% del PT (Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). Por lo tanto, la disponibilidad de este nutriente depende de la mineralización de las formas orgánicas de P.

A pesar de la escasez de agua y de la poca disponibilidad de nutrientes, los suelos del VCC han sido ampliamente utilizados para actividades agrícolas. En cuanto al manejo agrícola que se lleva a cabo dentro del Valle con cultivos de alfalfa, Hernandez-Becerra *et al.* (2016) determinaron que las prácticas de manejo agrícola como el riego y el uso de fertilizantes, generaron mayor disponibilidad de agua y nutrientes que favorecerían la actividad de microorganismos heterótrofos, promoviendo mineralización e inmovilización de N y mineralización de POD. Hernandez-Becerra *et al.* (2016) también identificaron un proceso de acidificación del suelo en la parcela agrícola. Se compararon estos suelos con un sitio conservado y uno abandonado, los cuales presentaron limitaciones por agua, energía y nutrientes, lo que en la parcela abandonada, promovió la actividad de

microorganismos autótrofos que llevan a cabo la nitrificación, incrementando la concentración de NO_3^- , el cual es más susceptible a pérdidas por lixiviación y nitrificación. En contraste, en el sitio pastizal se encontró mayor N inmovilizado en biomasa microbiana (N_{mic}), lo que favorece la protección de este nutriente en el suelo.

Así mismo, se detectaron cambios en los cocientes C:N:P de la biomasa microbiana, presentando un cociente más cercano al determinado por Cleveland y Liptzin (2007) de 60:7:1 en los ecosistemas conservado y abandonado. Sin embargo, el sitio agrícola presentó un cociente de 99:33:1. Así mismo, Martínez-Piedragil (2013) encontró que había mayor concentración de COD, NOD y NH_4^+ disponible en el pastizal natural que en las parcelas abandonadas, pero estas parcelas tuvieron valores más altos de nitratos. En cuanto al P, las concentraciones de este elemento en las parcelas abandonadas fueron mayores en comparación con el sitio conservado, probablemente por sus antecedentes de fertilización (Martínez-Piedragil 2013, Hernández-Becerra *et al.*, 2016). Estos trabajos muestran como los sistemas de manejo agrícola actuales han modificado la dinámica de nutrientes en los suelos del VCC, así como las funciones de los microorganismos en este tipo de ecosistemas.

6.2 Dinámica del glifosato en el suelo.

6.2.1. Oclusión de P

El P dada su naturaleza reactiva, es atraído electrostáticamente a los sitios cargados positivamente de los minerales que se encuentran en el suelo, llegando a unirse fuertemente a ellos y dejando de estar disponible para las plantas al formar uno o dos enlaces covalentes con los metales de la superficie mineral (Chapin *et al.*, 2011), además el P puede adsorberse a la materia orgánica, óxidos, arcillas o carbonatos (Buckingham *et al.*, 2010) o unirse a minerales que se encuentran solubles para formar precipitados insolubles con hierro (Fe^{3+}), aluminio (Al^{3+}) y calcio (Ca^{2+}) (Chapin *et al.*, 2011). El P se define como P ocluído cuando este se encuentra estable en formas que resisten los

cambios físicos y químicos del suelo a corto y mediano plazo y por lo tanto, no se encuentra disponible para la biota (Buckingham *et al.*, 2010).

6.2.2 Factores que favorecen la oclusión

Entre los factores que influyen en la oclusión del P, uno de los más importantes es el pH, el cual afecta directamente a las diferentes formas químicas de P presentes en el suelo (Barber, 1984; Plassard *et al.*, 2011). En suelos con pH ácido, el Fe^{2+} , Al^{3+} y Mn^{2+} son muy solubles, y reaccionan con los iones fosfato (PO_4^{3-}) para formar compuestos insolubles (Barber, 1984). En cambio los suelos alcalinos tienen generalmente altas concentraciones de cationes de Mg^{2+} y Ca^{2+} intercambiables y de CaCO_3 , lo cual forma por ejemplo, precipitados de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3\text{H}_2\text{PO}_4$) reduciendo así la disponibilidad del P en la solución del suelo (Lathja y Schlesinger, 1988; Chapin *et al.*, 2011). La precipitación del fosfato de calcio es una de las principales razones por las que los fertilizantes fosfatados se vuelven no disponibles en ecosistemas agrícolas ricos en calcio. Por otra parte, los compuestos orgánicos también afectan la oclusión, ya que pueden formar complejos con el P unido a minerales como Fe y Al, y los protege de la acción de enzimas (Chapin *et al.*, 2011). Los procesos que influyen en la oclusión de P son afectados por el tamaño y estructura de las partículas a las que se adsorbe el P. Por ejemplo, las partículas pequeñas tienen mayor área superficial, por lo que forman enlaces más estrechos con el P, y por razones similares, los minerales amorfos adsorben el P de manera más rápida en comparación con los compuestos que tienen estructuras cristalinas (Carreira *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 1985; Buckingham *et al.*, 2010).

6.2.3 Oclusión de P en suelos del Valle de Cuatro Ciénegas

Perroni *et al.* (2013) reportaron que la concentración de PT era menor en el pastizal en comparación con el matorral, y que en ambos sitios, más del 80% del P estaba en formas no disponibles u ocluidas. Mediante un análisis de fraccionamiento de P,

demonstraron que solo una baja proporción del P estaba biodisponible. Se encontró que el suelo del pastizal tenía una mayor capacidad de oclusión de P en comparación con el matorral. Además, el suelo del pastizal también tenía mayor proporción de P orgánico y mayor biomasa radical de las plantas, lo que explica que los fenómenos de oclusión de P no están explicados únicamente por factores intrínsecos del suelo como pH y humedad, sino también por la alta concentración de compuestos orgánicos, ya que estos favorecen las formas amorfas minerales, las cuales tienden a adsorber el P más rápidamente que el material cristalino (Carreira *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 1985; Buckingham *et al.*, 2010).

6.2.4. Oclusión de glifosato

La adsorción ha sido uno de los factores más importantes que influyen en el comportamiento de los herbicidas en el suelo (Hensley *et al.*, 1978). El glifosato es uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial (Duke y Powles, 2008), el cual se caracteriza por ser un ion zwitteriónico con valores de pK_a de <2, 2.6, 5.6 y 10.6 (Sprankle *et al.*, 1975), los cuales son dados por los tres grupos funcionales que contiene el glifosato (ácido fosfónico, ácido carboxílico y amina secundaria) (Damonte *et al.*, 2007). Los valores de pK_a indican cómo el comportamiento de oclusión del glifosato depende del pH del suelo. Su oclusión disminuye al aumentar el pH dado que la interacción entre las arcillas y el glifosato disminuye, debido a que ambos adquieren cargas más negativas (McConnell y Hossner, 1985).

La fracción de ácido fosfónico de la molécula del glifosato, facilita la oclusión de este herbicida a las arcillas y a los hidróxidos (Sparkle, 1975; Morón, 2014), además de que le da un comportamiento de adsorción similar a la adsorción del PO_4^{3-} , la cual consiste en la formación de enlaces covalentes entre un oxígeno de un PO_4^{3-} y un óxido metálico, por lo cual el herbicida puede competir con los fosfatos por los mismos sitios de oclusión en el suelo (de Jonge *et al.*, 2001). Por lo tanto, las aplicaciones de fósforo inorgánico pueden influenciar la biodisponibilidad y transporte del glifosato en el suelo (Gimsing y Borggaard, 2002). Esto es importante dado que el uso desmedido actual de fertilizantes fosfatados

junto con la aplicación de herbicidas como el glifosato, conlleva a un aumento del P disponible en suelos agrícolas, que conlleva a una menor fuerza de oclusión del glifosato en el suelo, ya que el fosfato inorgánico excluye al glifosato de los sitios de oclusión en el suelo (Gimsing y Borggaard, 2001). El aumento de concentración de P disponible en el suelo, causa no sólo una disminución en la cantidad de glifosato adsorbido, si no también que las reacciones de oclusión sean más débiles o más reversibles (de Jonge *et al.*, 2001), lo cual aumenta la movilidad del herbicida, produciendo pérdidas de este por lixiviación, (Sviridov *et al.*, 2014) o bien aumenta la biodisponibilidad de este propiciando su degradación por los microorganismos del suelo (Schnürer *et al.*, 2006).

Otro factor en la adsorción del glifosato en los suelos, es la carga de los cationes que están presentes en el suelo (McConnell y Hossner, 1985). Se ha reportado que la influencia en la adsorción del glifosato de los cationes en las superficies de intercambio catiónico aumenta de la siguiente manera: $\text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Al}^{3+}$ (Sprankle *et al.*, 1975).

6.2.5 Capacidad de microorganismos del Valle de Cuatro Ciénegas para crecer utilizando distintas fuentes de P

Se han realizado experimentos con algunos microorganismos cultivables del VCC con el fin de demostrar su capacidad de adquirir el P a partir de distintos compuestos, tanto inorgánicos como orgánicos. Tapia-Torres *et al.* (2016) utilizaron 1,163 aislados provenientes de suelos de dos sitios (ubicados en Churince y Pozas azules) y sedimentos (de una laguna en Churince y una laguna fertilizada) para probar su capacidad de obtener el P a partir de distintos sustratos, los cuales fueron fosfato de potasio (KH_2PO_4), fosfato de calcio ($\text{Ca}_3\text{H}_2\text{PO}_4$), fosfito (H_3PO_3), ácido 2-aminometil fosfónico (2-AEP), 2-fosfonoacetaldehído (2-PA) y ADN. El 80% de los aislados de sedimentos y 60% de los aislados de suelo, pudieron crecer utilizando KH_2PO_4 . La mayor proporción de aislados que creció utilizando $\text{Ca}_3\text{H}_2\text{PO}_4$, se observó en los aislados provenientes del sedimento de la laguna sin fertilizar. El 50% de los aislados del sedimento sin fertilizar pudieron crecer con

H₃PO₃ como única fuente de P. Menos del 10% de los aislados de los dos sitios pudieron crecer utilizando 2-PA, pero alrededor de 20% de los aislados pudo crecer utilizando 2-AEP. El 90% de los aislados provenientes del suelo y de la laguna sin fertilizar pudieron utilizar ADN como fuente de P, pero solo 30% de los aislados provenientes del sedimento fertilizado tuvo esta capacidad. En este estudio, la distribución de la capacidad para obtener el P de distintas fuentes, no se relacionó a ningún grupo taxonómico particular. De este trabajo se puede decir que la variedad de comunidades bacterianas tanto del suelo, como del sedimento tienen una diversidad de estrategias para la adquisición de P y pueden utilizar especies de P tanto oxidadas, como reducidas. Las estrategias que utilizan estos microorganismos incluyen la mineralización de compuestos orgánicos con P utilizando distintas enzimas como la fosfatasa, fosfodiesterasa y fosfonatasa, la oxidación del fosfito y la solubilización de compuestos inorgánicos que contienen P.

6.2.6 Capacidad de microorganismos del Valle de Cuatro Ciénegas para crecer utilizando glifosato

Morón-Cruz (2014) utilizó 45 de los aislados bacterianos provenientes del suelo del VCC, que previamente habían sido identificados en el trabajo de Tapia-Torres *et al.* (2016) como capaces de utilizar el 2-AEP como única fuente de P para probar la capacidad de estos aislados de utilizar el compuesto n-fosfometil glicinia (glifosato) como única fuente de P. Estos aislados se pusieron a crecer experimentalmente en diferentes medios de cultivo (sin P, medio con KH₂PO₄, medio con 2-AEP y medio con glifosato) para probar la capacidad de estas bacterias para utilizar al fosfonatos y glifosato como fuente de P. Como resultado de este experimento, se obtuvieron 10 aislados capaces de utilizar el glifosato como única fuente de P, los cuales correspondieron a las especies *Bacillus firmus*, *Bacillus sonoroensis*, *Bacillus cereus* (2 aislados), *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus licheniformis*, y 4 aislados identificados a nivel género los cuales fueron *Pantoea* sp., *Bacillus* sp. (2 aislados) y *Pseudomonas* sp. Este autor concluye que a pesar de que los 45 aislados pueden utilizar el fosfonato 2-AEP como fuente de P por acción de la enzima

fosfonoacetaldehído hidrolasa (fosfonatasa), probablemente no todas las bacterias seleccionadas tienen las enzimas específicas para la degradación del glifosato, como el complejo enzimático C-P liasa que rompe los enlaces C-P de la molécula, o la glifosato oxido-reductasa, que produce ácido metil fosfónico, el cual después puede ser mineralizado a ortofosfato por medio de una fosfonatasa o una C-P liasa. Por lo tanto, los grupos microbianos capaces de degradar el glifosato son pocos y su utilización puede representar una oportunidad para remediar suelos contaminados con este herbicida.

7. Metodología

7.1 Sitio de Estudio

El Valle de Cuatro Ciénegas se localiza en el estado de Coahuila, y pertenece al Desierto Chihuahuense. Se ubica en las coordenadas 26°59'10" de latitud Norte y 102°03'59" de longitud Oeste (Figura 1). Cuenta con una extensión aproximada de 40 km de este a oeste y 25-30 km de norte a sur (Pinkava, 1979) y una altitud de 740 m.s.m.n.m (CONAGUA, 2010). El tipo de clima según Köppen modificado por García es BWhwx'(w)(e'): muy seco, semi-cálido, con una temperatura media anual de 21.9 °C, la temperatura del mes más frío (Enero) es de 12.9 °C y la del mes más caliente es de 28.8 °C (Julio), con una oscilación térmica muy extrema. La lluvias anual es de 253 mm concentrada en los mese de verano y el porcentaje de lluvia invernal es de 9.3% (Montiel-González, Com. Pers.).



Figura 1. Ubicación del Valle de Cuatro Ciénegas y del Ejido de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México.

El Valle de Cuatro Ciénegas está formado principalmente por dos tipos de roca: el yeso (sulfatos de calcio) del lado oeste del valle y la caliza (carbonatos de calcio)

proveniente del periodo cretácico y que se encuentra en el este del valle (Lehmann *et al.*, 1999). De acuerdo a la clasificación WRB (2007), los suelos predominantes en esta región son los Gipsisoles y Calcisoles que corresponden a los yesos y calizas, respectivamente. El valle se encuentra rodeado de las sierras de La Madera y La Menchaca al norte, la Purísima y San Vicente al oeste, San Marcos y Pinos al sur y La Fragua al sureste. Debido principalmente a este aislamiento geográfico se ha permitido la conservación de grupos microbianos altamente diversos, que están adaptados a las condiciones oligotróficas del Valle (Cerritos *et al.*, 2011; Peimbert *et al.*, 2012; López-Lozano *et al.*, 2013).

A pesar del clima seco y condiciones oligotróficas presentes en el valle de Cuatro Ciénegas, las actividades agrícolas son muy importantes para esta región. En el 2010, se contaba con una superficie de cultivos de 3,233 ha, siendo la alfalfa el cultivo que ocupa más del 71% de la superficie sembrada (Beltrán, 2017). La alfalfa es producida dada su alta demanda para abastecer el ganado que se encuentra en la Comarca Lagunera, una de las cuencas lecheras más importantes del país que abarca 5 municipios de Coahuila y 10 de Durango (Beltrán, 2017).

El cultivo de alfalfa es uno de los factores que más ha contribuido a la degradación del suelo, por el uso de fertilizantes químicos, plaguicidas (Challenger, 1998) y los grandes volúmenes de agua requeridos por este cultivo que son aproximadamente de 219 L Kg⁻¹ de alfalfa (Ríos-Flores *et al.*, 2011) y la productividad es alrededor de 55 a 60 toneladas de alfalfa por hectárea (Beltrán, 2017). Por estos amplios requerimientos de agua, se ha recurrido a la sobre explotación de recursos hídricos como son la perforación no regulada de pozos (Hernández-Becerra, 2014), lo que ha provocado la desecación de los principales lagos y humedales (DOF, 2008), representando la producción de la alfalfa como uno de los principales factores de degradación del valle (Souza *et al.*, 2006).

La zona agrícola que se designó como sitio de estudio, se localiza dentro del ejido del Valle de Cuatro Ciénegas, y se encuentra ubicado al norte sobre CaCO₃, en suelos

Calcisoles (CONANP, 2007). El sitio de estudio tenía un historial de manejo que consistía en la producción de cultivo de alfalfa, bajo condiciones de riego por inundación y fertilización química. Sin embargo, debido a los motivos antes mencionados, se han buscado alternativas en el tipo de cultivo, y ha sido recomendado para los agricultores de esta región el cultivo de nopal forrajero por la menor cantidad de demanda de agua. En este sitio de estudio, la alfalfa había sido reemplazada por el cultivo de nopal forrajero desde hacía 5 años. Debido a un periodo de heladas que se presentó en Cuatro Ciénegas, los cultivos de nopal se encontraban dentro de invernaderos.

El cambio de cultivo no sólo ha implicado un cambio en el manejo de sistemas de riego, sino también un cambio en los insumos químicos para la producción del nopal. Anteriormente, se utilizaban los herbicidas Select (ciclohexadiona), Cedrus (ciclohexadiona) o Pivot (imazethapyr) para el cultivo de alfalfa (Hernández-Becerra, 2014) y actualmente se utilizan herbicidas que contienen glifosato como ingrediente activo, ya que debido a que este es un herbicida foliar no selectivo de amplio espectro, no era adecuado para el cultivo de alfalfa.

7.1.1 Diseño de muestreo

Muestreo para caracterización del sitio y análisis de oclusión de P

El muestreo se llevó a cabo en el mes de septiembre de 2014. Las muestras fueron obtenidas de un invernadero de nopal, el cual contenía 11 camellones de 56 m de largo, con 1 m de ancho por camellón y 1.2 m de ancho entre camellones.

Para este muestreo, en cada camellón se tomó una muestra cada 5 m, obteniendo 10 submuestras, las cuales se mezclaron homogéneamente para obtener una muestra compuesta por camellón, obteniendo un total de 10 muestras (Figura 2).

Se tomó una muestra fuera del invernadero, de manera paralela a este, formando un transecto de 56 m de largo, e igualmente se tomó una submuestra cada 5 m, formando

al final una muestra compuesta, designando este sitio como “sitio abandonado” puesto que anteriormente formaba parte de los cultivos de alfalfa.

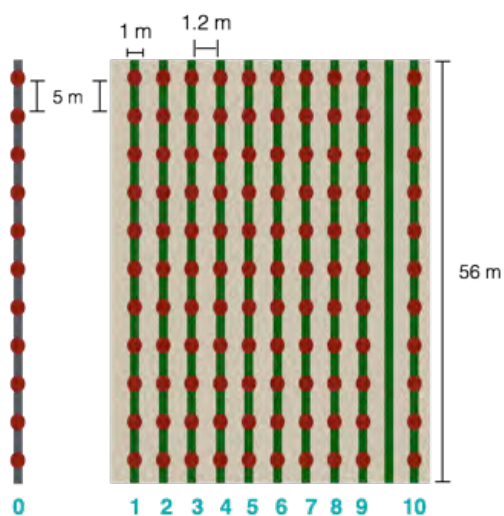


Figura 2. Diseño de muestreo llevado a cabo en Septiembre de 2014.

Muestreo para experimento de incubaciones de suelo

El segundo muestreo se llevó a cabo en el mes de Junio de 2015 y su diseño se observa en la figura 3. Se muestrearon 5 de los 11 camellones muestreados en Septiembre de 2014, y fueron seleccionados de acuerdo a los resultados de los análisis biogeoquímicos del primer muestreo. Por cada camellón se tomó una muestra cada 5 m, obteniendo 10 sub-muestras, las cuales se mezclaron homogéneamente para obtener una muestra compuesta por camellón.

Se tomaron 3 muestras al exterior del invernadero, de manera paralela a este formando un transecto de 56 m de largo, y también se tomó una sub-muestra cada 5 m, formando al final tres muestras compuestas del sitio abandonado.

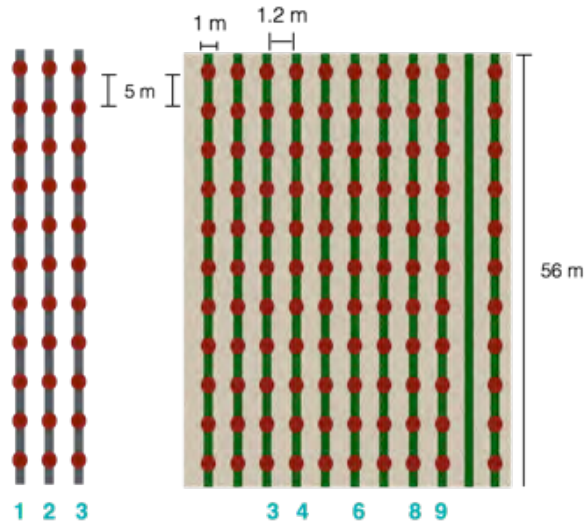


Figura 3. Diseño de muestreo llevado a cabo en Junio de 2015

5.2 Caracterización del Sitio

7.2.1 Análisis Biogeoquímicos

7.2.1.1 Humedad y pH

La humedad se obtuvo por medio de un análisis gravimétrico, en el cual se pesó un alícuota de cada muestra y se colocaron en un horno a 80°C por 48 h, registrando el peso del suelo húmedo y el peso del suelo seco al final de las 48 h. Se calculó el porcentaje de humedad con la ecuación 1.

Ec. 1:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso suelo húmedo} - \text{Peso suelo seco}}{\text{Peso suelo húmedo}} \times 100$$

Para determinar el pH del suelo se utilizó una solución 1:10 p/V de suelo con agua desionizada y se leyó en un potenciómetro previamente calibrado (Thermo Scientific, modelo Orion 3star Plus).

7.2.1.2 Análisis de nutrientes

Las formas de carbono (C) contenidas en el suelo se determinaron utilizando un Analizador de Carbono Total (UIC-COULOMETRICS mod. 50120; Chicago, E.U.A.); mientras que para la determinación de todas las formas de nitrógeno (N) y fósforo (P), a excepción del P microbiano, se utilizó un Autoanalizador Bran-Luebbe III (marca Bran-Lubbe, modelo AA3; Nordestedl, Alemania). La determinación del P contenido en la biomasa microbiana se realizó con un fotospectrómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 201)

Determinación de C, N y P totales

Para la determinación de los nutrientes totales de C, N y P, una alícuota de cada muestra fue secada en un horno a 80°C por 48 h. Posteriormente, las muestras secas se molieron en un mortero de ágata.

El carbono total (CT) fue determinado por combustión y detección coulométrica (Huffman, 1997). Se cuantificó el CT utilizando el Analizador de Carbono Total y el C inorgánico total (CIT) se determinó por medio del módulo de acidificación que utiliza 10 ml de H₂SO₄ 4 N por muestra. La medición del CT y el CIT fue calibrada con CaCO₃ puro. El C orgánico total (COT) fue determinado por la diferencia entre CT y el CIT.

Para la cuantificación de N y P totales (NT y PT respectivamente), se realizó una digestión ácida a 360°C con H₂SO₄ y H₂O₂ (20:1) y una mezcla pre-digestora de K₂SO₄ y CuSO₄ (10:1) como catalizador. El NT se determinó por el método macro-Kjeldahl (Bremmer, 1996) y se leyó por colorimetría a 660 nm en un autoanalizador Bran-Luebbe III (marca Bran-Lubbe, modelo AA3; Nordestedl, Alemania). El PT se determinó por el método colorimétrico de molibdato de amonio y reducción con ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962) y se leyó a 660 nm en un autoanalizador Bran-Luebbe III (marca Bran-Lubbe, modelo AA3; Nordestedl, Alemania).

Determinación de C, N y P disueltos

Para la cuantificación de C, N y P disueltos se siguió el método propuesto por Jones y Willet (2006). Para ello se pesó una submuestra de 20 g de suelo fresco, se adicionaron 80 ml de H₂O desionizada y se agitaron por 30 min a 350 rpm. Al terminar, las muestras se filtraron con papel Whatman No. 42 y después se filtraron por vacío con membranas millipore de 0.45 µm. De este extracto se leyó el C inorgánico disuelto (CID) en el analizador de carbono utilizando el módulo de acidificación CM50120, con 10 ml de H₂SO₄ 4N. El N inorgánico disuelto (NID) se leyó como NH₄⁺ y NO₃⁻ (amonio disuelto D- NH₄⁺ y nitrato disuelto D- NO₃⁻) y el fósforo inorgánico disuelto (PID) como PO₄⁻³ en el autoanalizador Brann-Lubbe III.

Para la determinación del C total disuelto (CTD) las muestras fueron leídas en el analizador de C en el módulo para líquidos (UIC-COULOMETRICS; Chicago, E.U.A.). Para la extracción de N y P total disuelto (NTD y PTD), se tomó una alícuota de 25 ml del extracto anterior y fue digerido utilizando 1ml de H₂SO₄ concentrado a 275°C durante 2 h. Posteriormente se adicionó 1 ml de H₂O₂ al 30% y se volvió a calentar hasta terminar la digestión. Después se neutralizaron las muestras utilizando fenolftaleína al 0.5% como indicador, NaOH al 20%. Y H₂SO₄ 5 N. Las muestras se aforaron a 50 ml y se filtraron con papel Whatman No. 42. Los extractos de NTD se leyeron como NH₄⁺ y el PTD como PO₄⁻³ en el autoanalizador Brann-Lubbe III.

Las formas orgánicas disueltas de C, N y P (COD, NOD y POD) se determinaron calculando la diferencia entre el total disuelto y el inorgánico disuelto, con excepción del NOD que fue calculado por la diferencia del NTP y el D- NH₄⁺.

Determinación de Nitrógeno disponible

Para determinar las formas inorgánicas disponibles de N en el suelo (Dp-NH₄⁺ y Dp-NO₃⁻) se pesaron 10 g de suelo fresco de cada muestra y se añadieron 50 ml de KCl 2 N. La

mezcla se agitó por 30 min a 350 rpm y al terminar se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 1. Se cuantificaron estas formas inorgánicas de N utilizando el método colorimétrico del hipoclorito-fenol propuesto por Robertson *et al.* (1999) en un autoanalizador Bran-Lubbe III (marca Bran-Luebbe, modelo AA3; Nordestedl, Alemania).

Determinación de Fósforo disponible

El P inorgánico disponible (Dp-Pi) se determinó con el método de fraccionamiento secuencial de Hedley y Stewart (1982). Se utilizaron 5 g de suelo fresco y 30 ml de NaH_2CO_3 0.5 M ajustado a un pH de 8.5, como extractante. Las muestras se agitaron por 16 h, y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm (centrífuga Thermo Scientific SL 16). El sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 42. El Dp-Pi se obtuvo tomando una alícuota del extracto y acidificándose con 0.55 ml de HCl 10 M. Se adicionó fenolftaleína y se añadieron gotas de NaOH 10 M hasta que el color viró a rosa y posteriormente, las muestras se neutralizaron utilizando HCl 5 M y se aforaron a 25 ml. El P disponible se leyó como PO_4^{3-} en un autoanalizador Brann-Luebbe III.

Determinación de Nutrientes en biomasa microbiana

Los nutrientes en biomasa microbiana se determinaron utilizando el método de extracción por fumigación con cloroformo (Vance *et al.*, 1987).

Para C y N microbianos, se pesaron 20 g de cada muestra de suelo por duplicado para tener muestras fumigadas y no fumigadas. Se colocaron todas las muestras a capacidad de campo y se incubaron 24 h a 27°C. Posteriormente a la incubación, se realizó una extracción utilizando 80 ml de K_2SO_4 0.5 M con agitación a 350 rpm por 30 min (Brookes *et al.*, 1985). Las muestras se filtraron al vacío utilizando membranas Millipore de 0.45 μm .

Para cuantificar el Carbono microbiano (Cmic) se tomó una alícuota del extracto

obtenido de las muestras fumigadas y sin fumigar para determinar Carbono total (CTmic) y C inorgánico microbiano (CITmic) en un Analizador de Carbono Total (UIC Mod. Cm 50120; Chicago, E.U.A.). Para la fracción de CITmic, se utilizó el módulo de acidificación CM513 con H₂SO₄ 4N del Analizador de Carbono. El C orgánico microbiano (COTmic) se calculó por diferencia de CTmic menos CITmic.

Para la extracción del N microbiano (Nmic), se tomó otra alícuota del extracto obtenido después de la filtración y se realizó una digestión utilizando 10 ml de H₂SO₄ concentrado y 0.6 ml de CuSO₄ 0.19 M como catalizador. La digestión se llevó a cabo a 300°C (Brookes, 1985). Se determinó el N microbiano, cuantificando N Total de las muestras fumigadas y sin fumigar, por el método colorimétrico en un autoanalizador Bran-Luebbe III (marca Bran-Lubbe, modelo AA3; Nordestedl, Alemania).

Para obtener el P en biomasa microbiana (Pmic), se pesaron 5 g de muestra por duplicado con el fin de realizar un tratamiento de fumigación con cloroformo y otro sin fumigar (Anderson y Domsch, 1978; Cole *et al.*, 1978). Después de la fumigación, las muestras se colocaron a capacidad de campo y se incubaron 24 h a 27°C. Posterior a la incubación, se añadieron 30 ml de NaH₂CO₃ 0.5 M a pH de 8.5 para extraer la fracción de P lábil de cada muestra (Hedley y Stewart, 1982) y se agitaron por 16 h a 350 rpm. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 25 minutos (centrífuga Thermo Scientific SL 16), se filtraron con papel filtro Whatman No. 42 y se digirieron utilizando 1.11 ml de H₂SO₄ 11 N y 0.6 ml de persulfato de amonio al 50% en un autoclave a 121°C durante una hora. Posteriormente, las muestras se neutralizaron en un rango de pH entre 6.5 y 7 utilizando NaOH 5N, 1N y 0.5 N. Para la lectura se utilizó el método de cuantificación de fosforo inorgánico por colorimetría utilizando el sistema reductor de ácido ascórbico y antimonio como catalizador (Murphy y Riley, 1962), utilizando una solución para desarrollo de color que contiene molibdato de amonio, tartrato de antimonio y potasio, H₂SO₄ 14 N y ácido ascórbico. Se colocaron 5 ml de esta solución con 5 ml de muestra y la mezcla se aforó a

50 ml. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 201) a una longitud de onda de 882 nm.

Las concentraciones finales de C, N y P microbianos se calculan de acuerdo a la ecuación 2.

Ec. 2:

$$[]_{\text{microbiano}} = \frac{[]_{\text{fumigado}} - []_{\text{sin fumigar}}}{\text{Coeficiente de extracción}}$$

Donde [] representa la concentración de C, N o P.

El coeficiente de extracción es el factor de recuperación y varía de acuerdo al tipo de suelo. Se utilizó un coeficiente de extracción distinto para cada nutriente, los cuales fueron 0.54 para Nmic (Joergensen y Mueller, 1996) ,0.45 para el C mic (Joergensen, 1996) y 0.4 para P mic, el cual es recomendado para suelos con pH de 6.2 a 8.2 (Hedley y Stewart; Lajtha *et al.*, 1999).

7.2.2 Análisis Enzimáticos

El método para medir la actividad enzimática en el suelo se basó en una determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado por gramo de suelo por unidad de tiempo, cuando el suelo es incubado con un sustrato (pNP-sustrato) en una solución buffer (Tabatabai y Bremner, 1969; Verchot y Borelli, 2005; Fioretto *et al.*, 2009), este proceso fue utilizado para 4 de las 6 enzimas que se analizaron, las cuales fueron la fosfodiesterasa (Fd), fosfomonoesterasa (Fm), beta-glucosidasa (BG) y n-acetil glucosaminidasa (NAG). Para la polifenol oxidasa o lacasa (PO), se siguió la metodología empleada por Sinsabaugh (2001) y para la determinación de fosfonatasa (Fn) se siguió la metodología mencionada anteriormente (Tabatabai y Bremner, 1969; Fioretto *et al.*,

2009), seguida de la cuantificación de Pi por colorimetría (Murphy y Riley, 1996). En la Tabla 1 se muestran las enzimas cuantificadas, así como las variables más importantes para la determinación de la actividad enzimática.

La extracción de las exo-enzimas de los microorganismos del suelo se realizó pesando 2 g de suelo fresco de cada muestra y adicionando 30 ml de buffer MUB (Modified Universal Buffer) a pH de 8. El buffer MUB contiene Tris-HCl, ácido maléico, ácido cítrico, ácido bórico y agua y el pH se ajustó utilizando NaOH y un potenciómetro calibrado (Thermo Scientific, modelo Orion 3star Plus). La mezcla se agitó 15 min y posteriormente se tomaron 670 µl de extracto, los cuales se colocaron en microtubos de 1.5 ml, además se agregaron 670 µl de una solución que contiene el sustrato para cada enzima (Tabla 1). Se colocaron controles de sustrato y de la muestra. Se prosiguió a incubar a una temperatura de 30°C y a tiempo específico dependiendo de la enzima (Tabla 1). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 min. El procedimiento llevado a cabo para lectura de la actividad enzimática fue diferente para sustratos unidos a p-nitro fenol, para la PO y para la Fn.

Tabla 1. Enzima, sustrato, concentración del sustrato y tiempo de incubación.

ENZIMA	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
B-Glucosidasa (BG)	pNP-glucopiranoside	10 mM	2 h
N-acetil glucosaminidasa (NAG)	pNP-B-n-acetyl-glucosaminide	4 mM	3 h
Polifenol oxidasa (PO)	ABTS	10 mM	2.5 h
Fosfomonoesterasa (Fm)	pNP-phosphate	10 mM	1.25 h
Fosfodiesterasa (Fd)	B-pNP-phosphate	10 mM	1.25 h
Fosfonatasa (Fn)	2-aminoetil fosfonato	10 mM	2 h

Para la lectura de actividad enzimática utilizando sustratos unidos a p-nitrofenol (para las enzimas BG, NAG, Fm y Fd) se tomaron 750 µl del sobrenadante para colocarlos en tubos con 2 ml de agua y 75 µl de NaOH 1 N y se leyó en un espectrofotómetro de UV-

Visible (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 201) a una longitud de onda de 410 nm.

El sustrato ABTS para la enzima PO, se leyó directamente en el espectrofotómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 201) a una longitud de onda de 480 nm.

La enzima Fn se determinó por medio de cuantificación de P inorgánico por el sistema reductor de ácido ascórbico y antimonio como catalizador, utilizando la metodología propuesta por Tapia-Torres y García-Oliva (2015) para la cuantificación de la actividad de la fosfonoacetaldehído hidrolasa en suelos y sedimentos de sistemas oligotróficos. Se utilizó una solución de desarrollo de color que contiene molibdato de amonio, H_2SO_4 14 N, tartrato de antimonio y potasio y ácido ascórbico. Para la preparación de la muestra de lectura se tomaron 750 μl del sobrenadante anteriormente mencionado y se adicionaron 1675 μl de agua desionizada con 75 μl de NaOH. Las muestras se agitaron, se añadieron 2.5 ml de la solución para desarrollo de color, se aforaron a 25 ml y se dejaron reposar 15 min. Las lecturas de absorbancia de Pi se realizaron en el espectrofotómetro UV-visible (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 201) a una longitud de onda de 882 nm.

7.2.3 Análisis Estadísticos

Se utilizaron los programas STATISTICS y R para realizar los análisis estadísticos. Se realizó una correlación de Spearman entre las variables medidas tanto biogeoquímicas como enzimáticas, para buscar relaciones entre los parámetros del suelo.

Se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el objetivo de determinar cuáles variables explicaban la varianza de los resultados, y para comprobar la separación entre las muestras del invernadero con nopal y las muestras del sitio abandonado. La matriz se hizo con los datos del sitio abandonado junto con el sitio del

invernadero con nopal. Debido a que se tenían 11 datos, se tomaron en cuenta 11 variables suponiendo como variables principales algunas de las cuales tenían correlación de Spearman mayor a 0.8 entre sí y eliminando a las enzimas PO, NAG y BG. Las variables que se eligieron fueron nutrientes microbianos, nutrientes disueltos, $Dp-NH_4^+$, $Dp-Pi$, Fm, Fn y Fd. La matriz de datos utilizada para ejecutar el análisis fue estandarizada y basada en correlaciones. Posteriormente se llevó a cabo una correlación de Pearson entre el componente principal 1 y las variables $Cmic$, $Dp-Pi$ y $Dp-NH_4^+$ para comprobar realmente cuales eran las variables más importantes.

Así mismo, por cada variable se realizó una prueba de T para una muestra, para comprobar si fue significativa la separación entre grupos obtenida en el ACP. En este análisis se compararon los promedios del invernadero con nopal con el dato obtenido de cada variable para el sitio abandonado.

7.3 Experimento de Oclusión de P

7.3.1 Análisis de la capacidad de oclusión de P en el suelo

Para llevar a cabo este experimento, se utilizó el procedimiento llevado a cabo por Perroni *et al.* (2014) adaptada con base en Lajtha *et al.* (1999) para la obtención de P fijado en la parte no biológica del suelo. Este consistió en aplicar tratamientos con fertilización de P en cantidades conocidas y medir el P disponible para poder obtener el P ocluido.

A diferencia de la metodología propuesta por Perroni *et al.* (2014) se cambiaron las concentraciones de fertilización de P, utilizando concentraciones de 1.09, 2 y 4 mg de P ml^{-1} , basados en las concentraciones de $Dp-Pi$ obtenidas en los análisis biogeoquímicos. A cada concentración de fertilizante, se le añadió un tratamiento con glifosato con 96% de pureza y otro con el herbicida comercial Faena. Así mismo se prepararon controles sin tratamiento.

El diseño experimental llevado a cabo, consistió en 6 réplicas de muestras de suelo provenientes de un invernadero con nopal, y 6 réplicas provenientes de una parcela agrícola abandonado del ejido de Cuatro Ciéneas, Coahuila (Tabla 2), colectadas del primer muestreo.

Tabla 2. Diseño experimental para análisis de oclusión de P y número de réplicas por tratamiento.

		Sin P	1,09 (mg P ml ⁻¹)	2 (mg P ml ⁻¹)	4 (mg P ml ⁻¹)
Invernadero de nopal	Sin herbicida	6 muestras	6 muestras	6 muestras	6 muestras
	Glifosato	6 muestras	6 muestras	6 muestras	6 muestras
	Faena	6 muestras	6 muestras	6 muestras	6 muestras
Sitio abandonado	Sin herbicida	6 muestras	6 muestras	6 muestras	6 muestras
	Glifosato	6 muestras	6 muestras	6 muestras	6 muestras
	Faena	6 muestras	6 muestras	6 muestras	6 muestras

Para la extracción del fósforo disponible del suelo, se preparó una solución Stock A de fosfato de potasio monobásico (17.56 g de KH₂PO₄ en 1L de KCl 0.01M) a la que se le añadieron 2 gotas de cloroformo (CHCl₃) para evitar el crecimiento de algún organismo en la solución. Se preparó una solución de cloruro de potasio KCl 0.01M para aforar las soluciones de trabajo de P inicial. El KCl se utiliza para evitar la precipitación de P. Para el control se utilizaron 30 ml de la solución KCl 0.01M. A partir de la solución Stock A, se prepararon las soluciones de trabajo con concentraciones de 1.09, 2 y 4 mg P ml⁻¹, preparadas cada una el mismo día de la determinación de P disponible.

Posteriormente se pesaron 3 g de suelo de las muestras provenientes del primer muestreo, y se añadió una solución de glifosato o Faena a cada solución de trabajo, excepto a los controles, con concentraciones de glifosato de 7.26 g de glifosato L⁻¹, equivalentes a 4 L de herbicida ha⁻¹ diluidos en 200 L de agua; lo cual tomando en cuenta

la densidad del suelo, correspondió a 1.03448 µl de glifosato a la concentración anterior para 3 g de suelo.

Se agregaron 30 ml de la solución de trabajo a cada réplica, mas 1 gota de cloroformo. Las muestras se agitaron por 24 h y posteriormente se centrifugaron 20 minutos a 3500 rpm. Se filtraron con papel filtro Whatman No. 42 y se hizo la lectura de las muestras como PO_4^{3-} en un autoanalizador Bran-Luebbe III (marca Bran-Luebbe, modelo AA3; Nordestedl, Alemania).

Se utilizó la ecuación 3 para obtener la fracción de P ocluido en el suelo:

$$\text{Oclusión} = F - (C - S) \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde :

$$F = [P \text{ fertilizante}] * \frac{30 \text{ ml}}{3g \text{ de suelo} * \text{fraccion de suelo seco}} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$C = P \text{ disponible}$$

$$S = P \text{ disponible} - P \text{ disponible sin fertilización} \quad (\text{Ec. 5})$$

Se corrigieron los gramos de suelo utilizados multiplicando los 3 g de suelo por la fracción de suelo seco obtenida de acuerdo a la metodología para la medición de la humedad descrita en el capítulo 1.

7.3.2 Análisis estadísticos

Se utilizaron los programas STATISTICS y R para realizar los análisis estadísticos. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para los datos de las muestras no fertilizadas, utilizando como factores el sitio que tuvo dos niveles (sitio abandonado e invernadero con nopal) y el tratamiento con tres niveles (sin herbicida, con glifosato al 96% de pureza, con herbicida Faena®).

Se realizó un ANOVA triple factorial para los resultados de oclusión de P de las muestras fertilizadas, teniendo a la oclusión de P como variable de respuesta y utilizando como factores el tratamientos con tres niveles (glifosato, herbicida Faena® y sin tratamiento), la fertilización que tuvo 4 niveles (Sin P, 1.09 mg P ml⁻¹, 2 mg P ml⁻¹ y 4 mg P ml⁻¹) y el sitio con dos niveles (sitio abandonado e invernadero). Cuando se obtuvieron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Se realizaron gráficas de donde en el eje de las abscisas se encontraba la concentración de fertilización de P y en el eje de las ordenadas, se encontraba la oclusión entre sitios para los datos obtenidos de los tres tratamientos con herbicidas, donde se obtuvieron las pendientes de las rectas. Así mismo, se realizaron gráficas donde en el eje de las abscisas se encontraba la concentración de fertilización de P y en el eje de las ordenadas se encontraba la oclusión entre tratamientos dentro de cada uno de los sitios, y se obtuvieron las pendientes de las rectas. Se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar si había diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de los dos sitios y entre las pendientes de las rectas de los tres tratamientos de herbicidas.

7.4 Experimento Incubaciones de suelo y microbiología

7.4.1 Experimento de incubaciones de suelo

Se realizaron incubaciones utilizando las muestras de suelo provenientes del invernadero con nopal y del sitio abandonado del segundo muestreo. A estas muestras se les aplicaron tres tratamientos diferentes: Glifosato (n-fosfometil glicina al 96 % de pureza), herbicida comercial con glifosato (Faena®) y un control sin herbicida. El diseño estadístico fue un factorial 2x3 completo con dos factores principales: sitio (con dos niveles) y herbicida (con tres niveles) con 5 réplicas para cada tratamiento (Tabla 3). Se realizó la medición de pH y humedad de las muestras antes y después de la incubación, con la metodología descrita en la sección anterior.

Tabla 3. Diseño experimental para experimento de incubaciones de suelo y número de réplicas por tratamiento.

Sitio de muestreo	Control	Glifosato	Faena®
Invernadero	5 muestras	5 muestras	5 muestras
Sitio abandonado	5 muestras	5 muestras	5 muestras

7.4.2 Medición de tasa de mineralización de C en el suelo

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 27 días a 28°C. Se pesaron 100 g de suelo por cada réplica, los cuales se colocaron en tubos de PVC con un extremo cerrado con una malla de diámetro de poro <0.05 mm. Se humedecieron a capacidad de campo por capilaridad, y se añadió agua ocasionalmente durante el periodo de la incubación, para mantener las muestras a capacidad de campo .

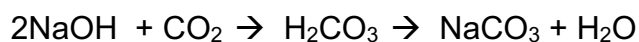
Para la aplicación de glifosato, se tomaron en cuenta las indicaciones del herbicida comercial Faena Fuerte® (Producido por la empresa Monsanto) que contiene 363 g l⁻¹ de ácido de glifosato como ingrediente activo (i.a.) cuya dosis máxima indicada en su etiqueta corresponde a 1.452 kg de i.a. ha⁻¹. Utilizando esta tasa de aplicación, una densidad del suelo de 1.16 g cm⁻³ y una movilidad de glifosato al suelo de 1 cm de profundidad (Ratcliff *et al.*, 2006); la cantidad de glifosato aplicado en suelos fue de 12.517 µg g⁻¹ de suelo, por lo que en 100 g de muestra se utilizaron 1.251 mg de glifosato. Se añadieron 400 µl de una solución que contenía esta cantidad de glifosato como i.a. por muestra (concentración de glifosato de 18 mM) a 10 réplicas para glifosato y 10 réplicas para Faena®.

Los PVC se introdujeron en frascos de vidrio con capacidad aproximada de 1 L y dentro de cada frasco, se colocó un vial con 10 ml de una solución de NaOH 0.2 N como trampa de CO₂. Esta trampa se cambió cada dos días durante la incubación. La concentración de NaOH se modificó para algunas muestras después de las primeras lecturas de mineralización de C debido a la saturación de las trampas, por lo que las

concentraciones finales utilizadas fueron 0.2 N, 0.4 N y 0.6 N. Todo el material utilizado fue previamente esterilizado.

Para cuantificar el CO₂ capturado, se adicionó BaCl₂ a cada trampa (con el fin de detener la fijación de CO₂) y se titularon los 10 ml de la solución de NaOH con HCl a la misma normalidad, utilizando fenolftaleína como indicador. Esta medición se llevó a cabo cada 2 días por un periodo de 27 días. Se utilizó un control para el manejo de muestra que consistió en un vial con 10 ml de NaOH que se colocó abierto dentro de un frasco de vidrio que no contenía muestra y se sometió al mismo manejo que las demás muestras y otro control de NaOH, el cual consistió en 10 ml de NaOH a las concentraciones utilizadas sin exponerse al manejo de las muestras.

El cálculo para obtener la mineralización de CO₂ se realizó con la ecuación 6, utilizando el volumen del gasto de HCl para neutralizar la muestra, el HCl gastado para neutralizar el control, tanto de NaOH, como de la muestra y la relación estequiométrica de la reacción:



Ec. 6

$$\text{Mineralización de C} = \frac{a - b - (a - c)}{2000} * 12\text{gC/mol}$$

Coficiente de peso seco

Donde:

a = Volumen gastado de HCl para el control de NaOH de cada concentración

b = Volumen gastado de HCl para cada muestra

c = Volumen gastado de HCl para el control de muestra

Para la corrección por peso seco, los gramos de suelo utilizados (100 g) fueron corregidos con el contenido de humedad medida antes de la incubación. Para obtener la tasa potencial de mineralización de C, los resultados de mineralización se dividieron entre los días de incubación totales para cada lectura.

Al final de las incubaciones se midieron C, N y P totales, C, N y P en biomasa microbiana, N y P disponibles, C, N y P disueltos y los análisis de actividad enzimática descritos en la sección 7.2.1.

7.4.3 Experimento microbiológico

Para identificar la capacidad de degradación del glifosato que tienen los microorganismos obtenidos de las incubaciones de suelo se realizaron cultivos de estos en medios donde se utilizaron el glifosato al 96% de pureza y el herbicida Faena® como únicas fuentes de P.

La extracción de bacterias del suelo se basó en el procedimiento llevado a cabo por Tapia-Torres *et al.* (2016). Para la obtención de microorganismos del suelo, se pesaron 6.6 g de suelo proveniente de las incubaciones y se añadieron 30 ml de Modified Universal Buffer (MUB) previamente esterilizado. Se agitaron las muestras durante 60 minutos (Tapia-Torres, 2016) y se colocaron 33 μ l del extracto en cajas Petri que contenían medio marino, extendiendo el extracto con perlas de vidrio. Para cada muestra se hizo una dilución utilizando 100 μ l de extracto y diluyendo en 900 μ l de MUB (dilución 1:10) y de esta dilución se tomaron 100 μ l que también fueron diluidos en 900 μ l de MUB teniendo una segunda dilución (dilución 1:100). Cada dilución de cada muestra fue sembrada en cajas con medio marino de la misma manera. Las cajas fueron incubadas a 28°C por 3 días.

Posteriormente, se preparó medio LPDM (Low Phosphate Defined Medium) sin fósforo en cajas divididas en cuadros enumerados y se eligieron 20 colonias por muestra

que fueron resembradas en cada cuadro (la mayoría de las colonias elegidas se tomaron de la dilución 1:100), teniendo un total de 600 aislados. Estas cajas fueron incubadas a 28°C durante 7 días debido a que su crecimiento fue más lento. El objetivo de este paso fue de realizar un pase de limpieza para que los microorganismos agotaran sus reservas de fósforo.

Después se prepararon cajas de Petri igualmente cuadrículadas y enumeradas con medio LPDM pero con diferentes fuentes de P:

- KH_2PO_4 : Control positivo. Debe haber crecimiento bacteriano.
- Sin P: Control negativo. No debe haber crecimiento bacteriano o este debe ser muy poco comparado con las fuentes de P.
- Glifosato: Como n-fosfometil glicina de grado analítico, al 96% de pureza.
- Herbicida Faena®, cuyo ingrediente activo es el glifosato.

La concentración que se utilizó fue de 2 mM de P para todas las fuentes de P. Cada aislado de cada muestra, fue resembrado en cada fuente de P, de modo que el aislado 1 en el medio sin P, correspondía al cuadro 1 en todas las fuentes de P.

Los aislados fueron incubados a 28°C por 7 días. Posteriormente, se realizó un segundo pase de crecimiento a las mismas fuentes de P anteriormente utilizadas y a las mismas condiciones y se contaron los aislados de cada fuente de crecimiento obtenidos después de 7 días. Los aislados que crecieron en medio LPDM con Faena® como fuente de fósforo se sembraron en medio marino líquido y se incubaron a 28°C por 7 días. Se les añadió glicerol al 15% y fueron almacenados a -80°C.

7.4.4 Análisis de ácidos grasos

Para determinar los cambios en la comunidad microbiana del suelo al aplicar glifosato en las muestras, se realizó el análisis de ácidos grasos de las muestras antes de

ser incubadas y sin ningún tratamiento (tiempo cero), y después de un periodo de 27 días de incubación con los diferentes tratamientos antes mencionados.

Las 30 muestras provenientes de las incubaciones y las 8 muestras del tiempo cero (muestras antes de la incubación) fueron almacenadas en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente liofilizadas y pulverizadas.

Para la extracción de los ácidos grasos, se utilizó 1 g de suelo de cada réplica y se llevó a cabo una saponificación de las muestras con una solución de NaOH, metanol y agua, para producir la lisis de las células, separar los ácidos grasos y convertirlos en sus correspondientes sales de sodio. Posteriormente, se llevó a cabo una metilación con metanol, para incrementar la volatilidad de los ácidos grasos para el análisis por cromatografía de gases. Después se llevó a cabo un proceso de extracción líquida-líquida con una solución 1:1 v/v hexano:éter metil terbutílico y posteriormente se realizó un lavado básico para eliminar ácidos grasos libres y agentes residuales, con una dilución de NaOH.

Los ácidos grasos se leyeron utilizando un cromatógrafo de gases, utilizando el software Sherlock. Se utilizaron 100 μl de estándar interno 19:0 por muestra en una concentración de $0.025\text{ }\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$. El peso molecular del estándar es de 312 g mol^{-1} y por lo tanto, se tienen 8.013 nmol de estándar por muestra.

7.4.5 Análisis estadísticos

Se realizó un ANOVA de dos vías para los datos de mineralización de C, utilizando como variable de respuesta la tasa potencial de mineralización de C y como factores el sitio (con dos niveles: sitio abandonado e invernadero de nopal) y el tratamiento del herbicida (con tres niveles: sin herbicida, glifosato y herbicida Faena®). Cuando se obtuvieron diferencias significativas, se realizó la prueba de Tukey. Utilizando los mismos

factores, se realizaron ANOVAs de dos vías a cada una de las variables biogeoquímicas medidas de las muestras incubadas, así como a la actividad enzimática.

Para los aislados obtenidos de la incubación que crecieron en las diferentes fuentes de P se realizó un análisis de regresión logística con distribución binomial con 3 factores, los cuales fueron el sitio, que contó con dos niveles (invernadero de nopal y sitio abandonado), la incubación, que tuvo tres niveles (sin herbicida, con glifosato y con herbicida Faena®) y la fuente de P, con cuatro niveles (Sin P, KH_2PO_4 , glifosato y herbicida Faena®).

Se llevó a cabo un ANOVA de dos vías para analizar cada ácido graso. En este análisis estadístico, la concentración de cada ácido graso fue la variable de respuesta, y se utilizaron como factores los mencionados anteriormente (sitio y tratamiento). Posteriormente, se agruparon los ácidos grasos de acuerdo a los grupos funcionales que corresponden para cada tipo de microorganismo. Los ácidos grasos cíclicos, con grupos funcionales hidroxilo y el ácido graso 16:1 w 5, correspondieron a las bacterias Gram-, los ácidos grasos ramificados (iso y ante iso) correspondieron a las bacterias Gram+, los ácidos grasos con grupos metilos correspondieron a las actinobacterias, y los ácidos grasos clasificados como Summed Feature 5 correspondieron a los hongos saprófitos. De cada grupo microbiano se realizó un ANOVA de dos vías para conocer el efecto de los factores sitio y tratamiento. Para conocer el agrupamiento de las muestras, se realizó un análisis de componentes principales. La matriz se hizo con los datos del sitio abandonado junto con el sitio del invernadero con nopal y como variables se utilizaron los diferentes ácidos grasos obtenidos.

8. Resultados

8.1 Caracterización del sitio

8.1.1 Análisis biogeoquímicos y análisis enzimáticos

En la Tabla 4 se muestran los promedios de las variables analizadas del suelo de las muestras provenientes del invernadero con nopal y del sitio abandonado. Se obtuvo una mayor concentración significativa de los nutrientes en el invernadero con nopal en comparación con el sitio abandonado con excepción de NH_4 disponible (Dp-NH_4^+). También se muestran los cocientes C:N, C:P y N:P para nutrientes totales y los cocientes entre los nutrientes en biomasa microbiana Cmic:Nmic , Cmic:Pmic , Nmic:Pmic . Los valores de los cocientes fueron significativamente más altos para el sitio abandonado excepto en la relación Nmic:Pmic , donde el invernadero de nopal presentó un valor significativamente mayor y en la relación COT:NT y Cmic:Pmic donde no hubo diferencias.

Tabla 4. Variables biogeoquímicas medidas para el sitio abandonado y el invernadero con nopal (promedio con error estándar para este último). El valor de p para determinar las diferencias significativas entre sitios se calculó con la prueba T para una muestra.

	Sitio abandonado	Invernadero de nopal	Valor de p
pH	8.3	7.9 (0.02)	2.28E-06
% Humedad	18	31 (0.83)	1.20E-07
COT (mg g^{-1} suelo seco)	29	66 (5.02)	3.748E-05
NT (mg g^{-1} suelo seco)	18	51 (5.68)	0.0002824
PT (mg g^{-1} suelo seco)	5.6	26 (2.7)	2.875E-05
Cmic ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	773	1383 (120)	0.0006844
Nmic ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	84	851 (116)	9.83E-05
Pmic ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	15	79 (21)	0.01604
Dp-NH_4^+ ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	0.95	0.85 (0.07)	0.2362
Dp-NO_3^- ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	5.79	242 (59)	0.003305
Dp-Pi ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	5.38	307 (31)	4.55E-06
NOD ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	3.09	49 (7.68)	2.00E-04

POD ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	0.47	20 (1.6)	4.04E-07
COD ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo seco)	16.95	175 (44)	0.006491
Cocientes			
COT:NT	1.55	1.38 (0.1)	0.1369
COT:PT	5.22	2.63 (0.17)	1.116E-07
NT:PT	3.36	1.93 (0.08)	3.439E-08
Cmic:Nmic	9.20	1.77 (0.17)	1.092E-11
Cmic:Pmic	48.63	37 (10.86)	0.3117
Nmic:Pmic	5.29	20.42 (5.81)	0.02863

Los resultados de la actividad enzimática para el sitio abandonado y el invernadero con nopal se muestran en la Tabla 5. Se obtuvo una mayor actividad enzimática significativa en las muestras del invernadero con nopal en comparación con el sitio abandonado, con excepción de la enzima fosfodiesterasa. En el sitio abandonado no se registró actividad de la fosfonatasa, mientras que en el invernadero con nopal sí presentó actividad.

Tabla 5. Resultados obtenidos para la actividad enzimática de ambos sitios. Medias con error estándar para el sitio del invernadero con nopal.

	Abandonado	Invernadero de nopal	Valor de p
PO ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.057	0.851 (0.126)	0.0001422
NAG ($\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.132	0.254 (0.023)	0.0005539
BG ($\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.034	0.078 (0.015)	0.01749
Fn ($\mu\text{molPi h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.000	0.387 (0.135)	0.01877
Fd ($\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.066	0.406 (0.202)	0.1265
Fm ($\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.060	0.152 (0.027)	0.008167

PO: Polifenol oxidasa, NAG: N-acetil glucosaminidasa, BG: B-glucosidasa, Fn: fosfonatasa, Fd: fosfodiesterasa, Fm: Fosfomonoesterasa

En el análisis de correlación de Spearman, la humedad del suelo correlacionó significativamente Cmic, POD, COD y NAG (Tabla 6). Así mismo, los nutrientes en la biomasa microbiana tuvieron correlaciones positivas con algunas formas de nutrientes del

suelo. Por ejemplo, el Cmic correlacionó positivamente con Dp-NO₃⁻, Dp-Pi, NOD, POD, COD, las enzimas NAG y BG; por su parte el Nmic tuvo correlación positiva con la actividad de la enzima PO y por último el Pmic correlacionó positivamente con el fósforo disuelto (POD).

Los nutrientes inorgánicos disponibles correlacionaron positivamente con otras formas de nutrientes, por ejemplo el Dp-NO₃⁻ correlacionó con Dp-Pi, NOD, COD, y las enzimas, BG, Fn, Fd, y Fm. Por otra parte, el Dp-Pi correlacionó con el nutriente disuelto, COD, y la enzima Fd.

Para los nutrientes disueltos, el NOD correlacionó positivamente con el POD y COD. Se encontraron correlaciones positivas entre el COD y las enzimas NAG y BG.

Hubo correlaciones positivas entre la actividad de diferentes enzimas, por ejemplo, la actividad de la NAG correlacionó con las enzimas BG y Fn. La enzima BG correlacionó con la enzima Fn y Fm. La enzima Fd correlacionó positivamente con la Fm.

El pH del suelo correlacionó negativamente con el COD y con la actividad de las enzimas NAG y Fn

Tabla 6. Resultados del análisis de correlación de Spearman. En color rojo se muestran los valores de correlación significativas (p<0.05)

	pH	Humedad	Cmic	Nmic	Pmic	Dp-NH ₄	Dp-NO ₃	Dp-Pi	NOD	POD	COD	PO	NAG	BG	Fn	Fd	Fm
pH	1																
Humedad	-0.52	1															
Cmic	-0.59	0.69	1														
Nmic	-0.24	0.30	0.55	1													
Pmic	-0.14	0.44	0.34	0.40	1												
Dp-NH ₄	0.08	-0.28	0.06	-0.19	-0.24	1											
Dp-NO ₃	-0.55	0.48	0.74	0.55	0.28	-0.15	1										
Dp-Pi	-0.59	0.45	0.70	0.54	0.43	-0.42	0.81	1									
NOD	-0.48	0.60	0.74	0.33	0.55	0.13	0.70	0.58	1								

POD	-0.44	0.72	0.76	0.39	0.65	0.31	0.27	0.30	0.73	1							
COD	-0.67	0.65	0.88	0.45	0.32	-0.09	0.91	0.80	0.85	0.54	1						
PO	0.13	0.03	0.15	0.71	0.23	-0.25	0.40	0.20	0.22	0.07	0.23	1					
NAG	-0.78	0.69	0.66	0.15	-0.14	0.07	0.53	0.32	0.45	0.44	0.66	-0.05	1				
BG	-0.54	0.19	0.65	0.40	-0.10	0.30	0.72	0.41	0.35	0.22	0.64	0.22	0.64	1			
Fn	-0.64	0.27	0.29	0.15	-0.12	-0.25	0.71	0.46	0.30	-0.10	0.58	0.27	0.64	0.64	1		
Fd	-0.21	0.28	0.43	0.50	0.11	-0.10	0.73	0.63	0.38	0.09	0.51	0.34	0.23	0.39	0.43	1	
Fm	-0.11	0.37	0.50	0.45	0.27	-0.08	0.68	0.44	0.27	0.22	0.46	0.39	0.30	0.64	0.45	0.65	1

Los resultados del análisis de componentes principales (ACP) indican que el 61% de la varianza total está explicada por los componentes principales 1 y 2. Las variables con mayor peso en el CP1 fueron Cmic, el Dp-Pi y el Dp-NH₄⁺; mientras que el Pmic y Fosfonatasa tuvieron más peso en el CP2 (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de la varianza explicada por los dos primeros componentes (Eigenvalor) y el peso de las variables analizadas en los dos primeros componentes (Eigenvector). Las variables con mayor peso se marcan con color rojo.

	CP 1	CP 2
Eigenvalor	2.2	1.39
Porcentaje (%)	43	17.5
Porcentaje acumulado (%)	43	61
<i>Eigenvector de las variables</i>		
C microbiano	-0.422	
N microbiano	-0.342	0.378
P microbiano	-0.212	0.533
Dp-NH₄⁺	0.113	-0.232
Dp-Pi	-0.404	
NOD	-0.383	-0.186
POD	-0.336	0.293
COD	-0.356	-0.386
Fosfonatasa	-0.211	-0.490
Fosfodiesterasa		
Fosfatasa	-0.227	

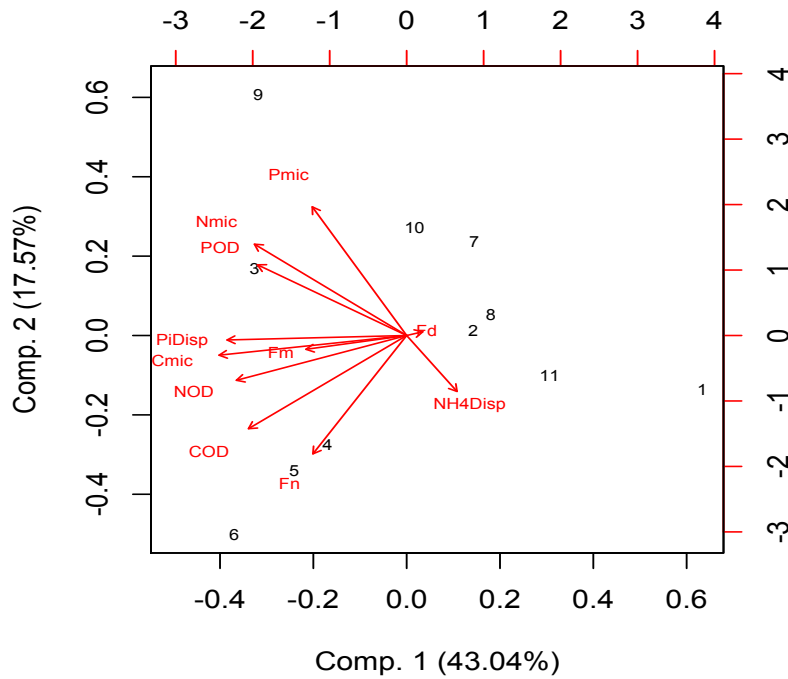


Figura 4. Análisis de componentes principales. La muestra 1 representa a la muestra del sitio abandonado. Las muestras 2 a la 11 corresponden al sitio de la nopalera

El sitio abandonado agrícola (sm en Figura 5) se separa claramente de las muestras correspondientes al suelo con nopal (Figura 5). Esto sugiere que la dinámica de nutrientes del SM es diferente a las muestras del invernadero con nopal.

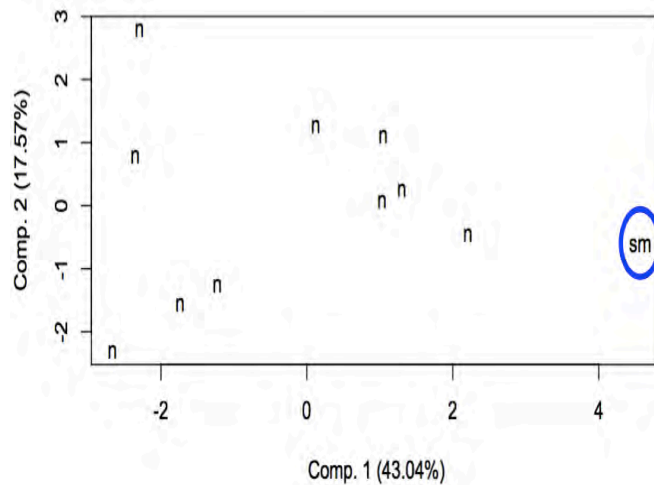


Figura 5. Agrupación de datos de acuerdo al análisis de componentes principales, donde "sm" representa la muestra del sitio abandonado y "n" corresponde a las muestras del invernadero con nopal.

En la correlación realizada entre el CP1 y las variables más importantes para este componente, el CP1 correlacionó negativamente con Cmic ($r = -0.918$) y con Dp-Pi ($r = -0.879$). En contraste, la correlación entre el CP1 con Dp-NH₄⁺ fue no significativa, sugiriendo que las variables Cmic y Dp-Pi fueron las que explican al eje del CP1.

8.2 Oclusión de P

8.2.1 Oclusión de P en el suelo

Para los tratamientos donde no había fertilización, se detectaron diferencias únicamente entre los sitios ($p = 0.00000$), siendo mayor la oclusión en el sitio del invernadero de nopal en comparación con el sitio abandonado (Figura 6).

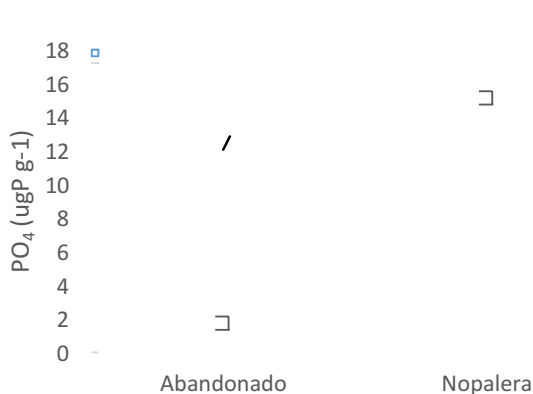


Figura 6. Diferencias de oclusión de P entre los dos sitios, antes de realizar la fertilización de P.

Al evaluar los efectos del sitio, fertilización y aplicación del herbicida (tratamiento) hubo resultados significativos en las interacciones de las variables sitio*fertilización ($p = 0.0000$) y tratamiento*fertilización ($p = 0.027$).

La figura 7, muestra los resultados de la interacción sitio*fertilización, donde hubo mayor oclusión de P en las muestras fertilizadas con la mayor concentración de P

(fertilización 3 que corresponde a 4 mg P ml⁻¹) en ambos sitios, y también hubo una mayor oclusión en el sitio del invernadero de nopal en comparación con el sitio abandonado, para todas las concentraciones de fertilización. La prueba de Tukey dio como resultado diferencias significativas en todas las fertilizaciones entre ambos sitios.



Figura 7. Diferencias en la oclusión de P en la interacción Sitio*Fertilización. La fertilización 1 corresponde a 1.09 mg de P/ml, la 2 a 2 mg de P/ml y la 3 a 4 mg de P/ml

La figura 8 muestra la interacción fertilización*tratamiento. La prueba de Tukey mostró únicamente diferencias significativas entre tratamientos en la fertilización 3, pues la oclusión de P del suelo donde fue aplicado el tratamiento con Faena[®] fue significativamente menor al tratamiento sin herbicida y al tratamiento con glifosato, mientras que estos dos últimos no fueron diferentes entre sí.



Figura 8. Oclusión de P en la interacción tratamiento*fertilización. La fertilización 1 corresponde a 1.09 mg de P/ml, la 2 a 2 mg de P/ml y la 3 a 4 mg de P/ml

Las gráficas de las concentraciones de P ocluido contra fertilización en las que se comparan el sitio abandonado y el sitio agrícola dentro de cada uno de los tres tratamientos se muestran en la figura 9. En los tres tratamientos, la interacción sitio*fertilización es de $p < 0.0001$; por lo tanto los valores de las pendientes entre sitios (Tabla 8) tienen diferencias significativas, siendo mayor en el suelo proveniente del invernadero con nopal en los tres tratamientos.

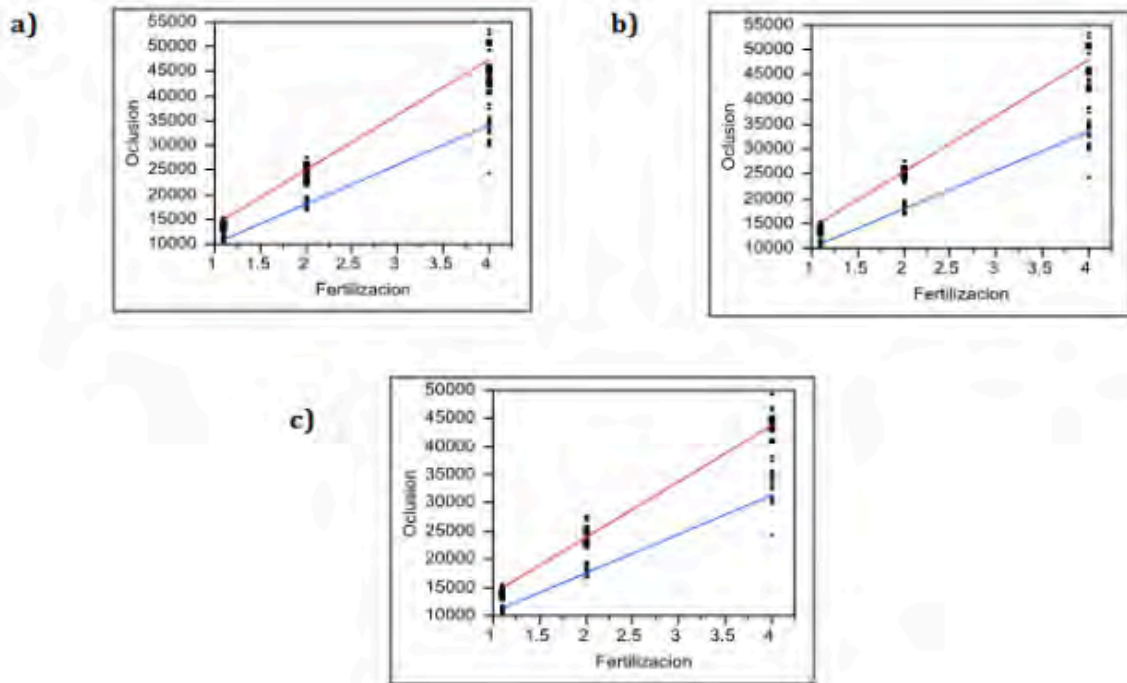


Figura 9. Fertilización vs oclusión (en μg de P g^{-1}) en los dos sitios (invernadero con nopal en rojo, sitio abandonado en azul) con los tres diferentes tratamientos a) Sin tratamiento, b) con glifosato, c) con herbicida Faena®.

La figura 10, muestra las gráficas de las rectas de fertilización contra oclusión en la que se compara cada uno de los 3 tratamientos dentro de los dos sitios. En el suelo proveniente del invernadero con nopal, la interacción tratamiento*fertilización dio como resultado una diferencia significativa marginal entre tratamientos ($p=0.0531$), por lo que la pendiente del tratamiento con Faena® fue menor.

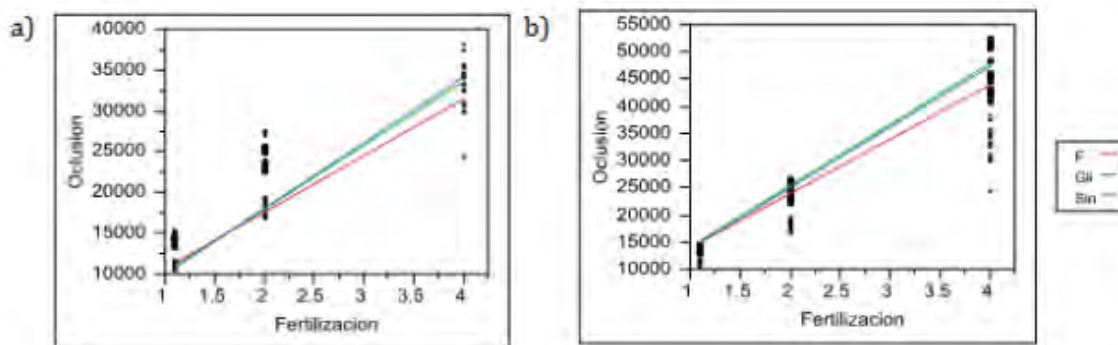


Figura 10. Oclusión de P (en μg de P g^{-1}) que muestra las diferentes pendientes entre los tres tratamientos. La línea azul pertenece al tratamiento sin herbicida, la línea verde al tratamiento con glifosato y la línea roja al tratamiento con Faena® en a) Sitio abandonado, b) Invernadero con nopal.

Tabla 8. Valores de las pendientes de las rectas de fertilización contra oclusión presentadas en la figura 9 y 10.

Sitio	Tratamiento	Pendiente
Abandonado	Sin herbicida	8013
Abandonado	Glifosato	7744
Abandonado	Faena®	6899
Invernadero	Sin herbicida	11212
Invernadero	Glifosato	11265
Invernadero	Faena®	9948

8.3 Experimento incubaciones de suelo y microbiología

8.3.1 Medición de tasa de mineralización de C en el suelo

Los resultados obtenidos del ANOVA de la tasa potencial de mineralización de C fueron significativos para el tratamiento y para el sitio (Tabla 9). Las muestras de suelo de la nopalera presentaron valores promedio más altos que el sitio abandonado ($198 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{d}^{-1}$ y $75 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{d}^{-1}$ para la nopalera y el sitio abandonado, respectivamente). En la figura 11 y 12 se presenta la marcha de la tasa potencial de mineralización durante la incubación para el sitio abandonado y la nopalera, respectivamente. En estas gráficas se observa que las concentraciones de CO_2 producido en los suelos de la nopalera fueron mayores (rango $135 - 285 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{d}^{-1}$) que las concentraciones de CO_2 emitido en los suelos del sitio abandonado (rango $16-151 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{d}^{-1}$).

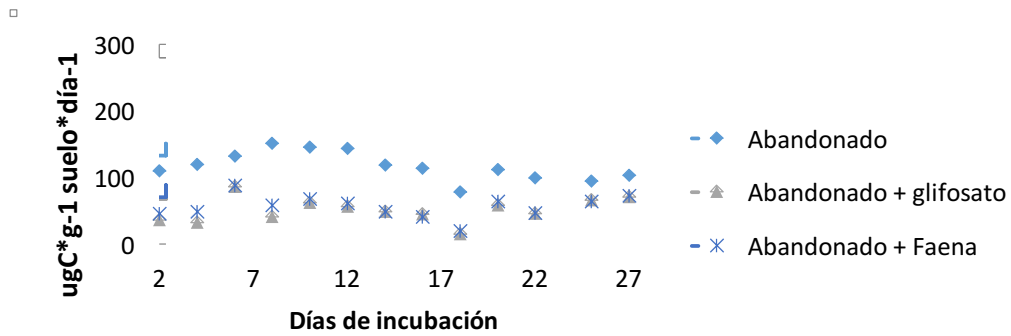


Figura 11. Marcha de la tasa potencial de mineralización de C durante la incubación de los suelos del sitio abandonado.

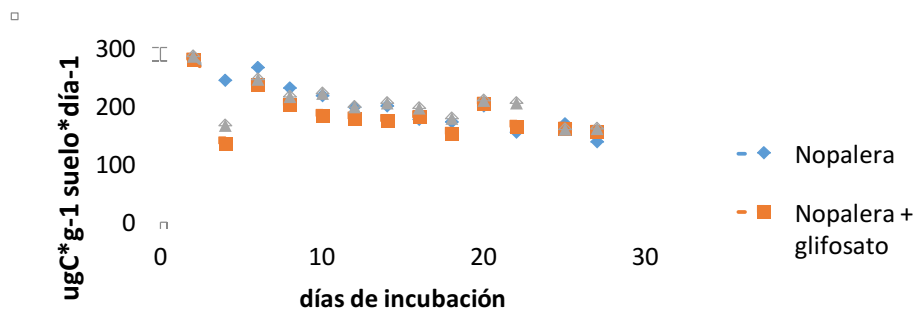


Figura 12. Marcha de la tasa potencial de mineralización de C durante la incubación de los suelos del invernadero con nopal.

Así mismo, el tratamiento control presentó una mayor tasa acumulada de mineralización de C que el tratamiento con glifosato, presentando valores intermedios el tratamiento con Faena® (Figura 13).

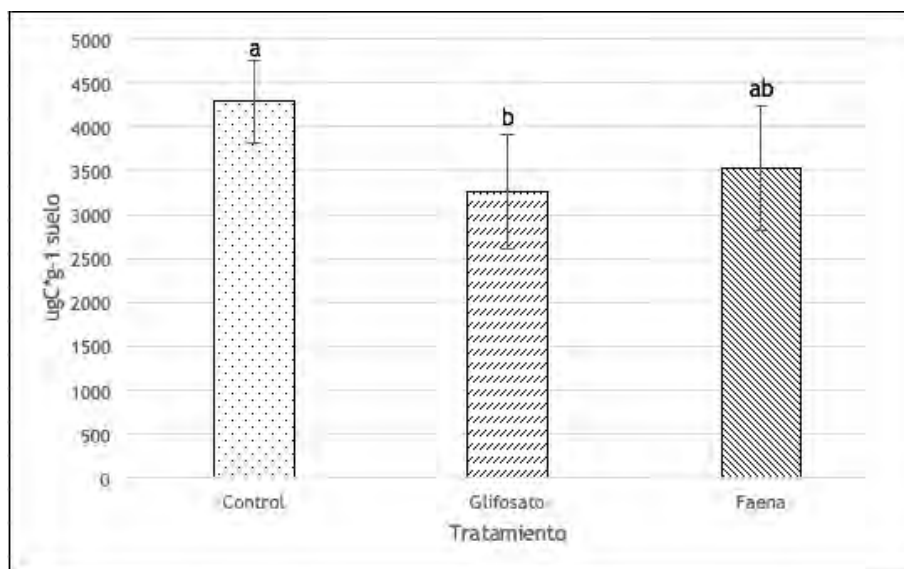


Figura 13. Promedio de la tasa acumulada de mineralización por tratamiento: sin tratamiento, glifosato y Faena®. Las barras con diferentes letras significan que son significativamente diferentes con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Análisis Biogeoquímicos

La tabla 9 muestra los promedios y error estándar de nutrientes totales (CT, COT, NT y PT), nutrientes en biomasa microbiana (Cmic, Nmic y Pmic), nutrientes disponibles (Dp-NH₄⁺, Dp-NO₃⁻ y Dp-Pi) y nutrientes orgánicos disueltos (POD, NOD y COD) para cada sitio y cada tratamiento.

Tabla 9. Medias y error estándar de las variables Biogeoquímicas analizadas.

	Abandonado	Abandonado + glifosato	Abandonado + Faena®	Invernadero de nopal	Invernadero de nopal + glifosato	Invernadero de nopal + Faena®
CT (mg g ⁻¹)	84.9 (0.6)	83.5 (1.4)	84.4 (1.7)	124.6 (8.1)	134.5 (9.6)	123.6 (10.9)
COT (mg g ⁻¹)	27.8 (1.2)	24.2 (1.6)	28.1 (1.9)	71.4 (11.1)	82.7 (11.7)	68.8 (13.8)
NT (mg g ⁻¹)	37.6 (3.5)	36.9 (1.75)	34.2 (2.05)	111.3 (17.4)	116.4 (24.4)	88.9 (11.6)
PT(mg g ⁻¹)	33.2 (1.6)	32.5 (0.7)	34.4 (2.4)	100.6 (10.5)	109.9 (15.2)	110 (14.2)
COD (µg g ⁻¹)	208.9 (55.7)	75.5 (20.5)	153.6 (52.5)	75.8 (25.2)	95 (29.4)	111.3 (54.6)
NOD (µg g ⁻¹)	7.7 (2)	5.1 (0.8)	5.6 (1.5)	12.4 (2.6)	10.8 (1.5)	10.7 (11.3)
POD (µg g ⁻¹)	3.2 (2.7)	4.8(0.6)	5.9 (1.8)	5.3 (3.4)	4.7 (2.1)	4.4 (2.1)
Dp-NH ₄ ⁺ (µg g ⁻¹)	1.15 (0.5)	1.4 (0.4)	4.4 (1.7)	1.6 (1.1)	1.8 (1)	2.2 (1)

1)						
Dp-NO₃⁻ (μg g⁻¹)	19.5 (3.9)	22.8 (1.2)	25.9 (1.9)	144.2(64.6)	133.4 (64.3)	136.1 (63.1)
1)						
Dp-Pi (μg g⁻¹)	1.8 (0.5)	1.9 (1)	2.9 (0.9)	21.6 (3.6)	27.5 (8.7)	31.4 (7.8)
Cmic (μg g⁻¹)	518.8 (140.1)	570.7 (301.6)	279.6 (51.1)	739.9 (189.6)	631.9 (84.1)	407.1 (127.3)
Nmic (μg g⁻¹)	400.4 (11.2)	218.2 (49.8)	268.9 (78.8)	755 (115)	878.8 (107.1)	1034.5 (175.7)
Pmic (μg g⁻¹)	18.7 (3.4)	19 (5.5)	2.7(0.6)	12.9 (6.6)	8.8 (3.1)	5.1 (2.3)

[CT= Carbono total, COT= Carbono orgánico total, NT= Nitrógeno total, PT= fósforo total, COD= Carbono orgánico disuelto, NOD= Nitrógeno orgánico disuelto, POD= fósforo orgánico disuelto, Dp-NH₄⁺= amonio disponible, Dp-NO₃⁻=Nitrato disponible, Dp-Pi= Fósforo inorgánico disponible, Cmic= Carbono microbiano, Nmic= Nitrógeno microbiano, Pmic=Fósforo microbiano]

En la mayoría de las variables se observaron diferencias significativas entre sitios, sin embargo, entre tratamientos sólo hubo diferencias significativas con el Pmic (Tabla 10). Así mismo, no hubo diferencias significativas para ninguno de los factores analizados para las concentraciones de COD, POD, Dp-NH₄⁺ y Cmic (Tabla 10). En las variables donde el factor sitio resultó significativo (CT, COT, NT, PT, NOD, Dp-NO₃⁻, Dp-Pi y Nmic) se presentaron valores mayores en el sitio del invernadero con nopal. Para el Pmic, donde el factor tratamiento fue significativo, se presentaron valores menores en las muestras con herbicida Faena® (2.6 μg P g⁻¹ para las muestras del sitio abandonado y 5.1 μgP g⁻¹ para las muestras provenientes del invernadero de nopal). La prueba de Tukey para esta variable nos mostró diferencias significativas entre las muestras sin tratamiento y las muestras con herbicida Faena® (p=0.019) y una diferencia significativa marginal entre las muestras con tratamiento de glifosato y las muestras con Faena® (p= 0.054).

Tabla 10. Resultados del ANOVA de las variables biogeoquímicas y de la tasa potencial de mineralización de C. Se presenta el valor de F junto con el valor de p entre paréntesis. Los datos con diferencias significativas se encuentran en color rojo.

Variable	Sitio	Tratamiento	Sitio*tratamiento
Tasa potencial de mineralización de C			
CT	112 (p<0.0001)	3.9 (0.034)	2.79 (0.081)
	60 (p<0.0001)	0.31 (0.74)	0.47 (0.63)

COT	45 (p<0.0001)	0.18 (0.84)	0.6 (0.56)
NT	41 (p<0.0001)	0.76 (0.48)	0.48 (0.62)
PT	88 (p<0.0001)	0.17 (0.84)	0.15 (0.86)
COD	2.26 (0.15)	1.04 (0.37)	1.64 (0.21)
NOD	13 (0.001)	0.96 (0.398)	0.05 (0.95)
POD	0.006 (0.94)	0.08 (0.92)	0.31 (0.74)
Dp-NH₄⁺	0.27 (0.6)	2.04 (0.15)	1.16 (0.33)
Dp-NO₃⁻	9.7 (0.005)	0.004(0.996)	0.017 (0.98)
Dp-Pi	36 (p<0.0001)	0.59 (0.56)	0.37 (0.69)
Cmic	0.97 (0.33)	1.73 (0.199)	0.11 (0.89)
Nmic	49 (p<0.0001)	0.53 (0.6)	2.12 (0.14)
Pmic	1.8 (0.19)	4.9 (0.016)	1.22 (0.31)

[CT= Carbono total, COT= Carbono orgánico total, NT= Nitrógeno total, PT= fósforo total, COD= Carbono orgánico disuelto, NOD= Nitrógeno orgánico disuelto, POD= fósforo orgánico disuelto, Dp-NH₄⁺= amonio disponible, Dp-NO₃⁻=Nitrato disponible, Dp-Pi= Fósforo inorgánico disponible, Cmic= Carbono microbiano, Nmic= Nitrógeno microbiano, Pmic=Fósforo microbiano]

Análisis enzimáticos

La actividad de las enzimas fosfomonoesterasa (Fm), fosfodiesterasa (Fd) y polifenol oxidasa (PO) presentaron diferencias significativas únicamente entre sitios (Tabla 12), mientras que para la actividad de las enzimas beta-glucosidasa (BG), n-acetil glucosaminidasa (NAG) y fosfonatasa (Fn) no hubo diferencias significativas en ninguno de los factores analizados. Los valores de actividad enzimática (Tabla 11) fueron mayores para el sitio del invernadero con nopal en comparación con el sitio abandonado para las enzimas que obtuvieron diferencias significativas en este factor. El promedio para la actividad enzimática de la Fm fue 0.052 $\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ en el sitio abandonado y 0.124 $\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ en el invernadero de nopal; para la actividad de la Fd fue de 0.1 $\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ en el sitio abandonado y 0.23 $\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ en el invernadero con nopal; para la actividad de la PO el promedio fue 0.05 $\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ en el sitio abandonado y 0.15 $\mu\text{mol PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ en el invernadero con nopal (Figura 14).

Tabla 11. Media y error estándar de la actividad enzimática en los diferentes sitios y tratamientos

	Abandonado	Abandonado + glifosato	Abandonado + Faena®	Invernadero de nopal	Invernadero de nopal + glifosato	Invernadero de nopal + Faena®
Fm (μmol PNP h⁻¹ g⁻¹)	0.049 (0.012)	0.052(0.007)	0.053 (0.010)	0.131 (0.017)	0.123 (0.014)	0.117 (0.018)
NAG (μmol PNP h⁻¹ g⁻¹)	0.017 (0.003)	0.140 (0.115)	0.022 (0.007)	0.050 (0.012)	0.035 (0.014)	0.056 (0.026)
BG (μmol PNP h⁻¹ g⁻¹)	0.038 (0.008)	0.016 (0.006)	0.052 (0.025)	0.040 (0.013)	0.056 (0.027)	0.111 (0.037)
Fn (μmol Pi h⁻¹ g⁻¹)	0.028 (0.005)	0.036 (0.001)	0.036 (0.006)	0.035 (0.008)	0.048 (0.012)	0.034 (0.002)
Fd (μmol PNP h⁻¹ g⁻¹)	0.111 (0.025)	0.074 (0.016)	0.118 (0.024)	0.200 (0.04)	0.222 (0.031)	0.270 (0.043)
Fn(μmol PNP h⁻¹ g⁻¹)	0.094 (0.022)	0.041 (0.011)	0.019 (0.006)	0.143 (0.034)	0.140 (0.038)	0.168 (0.041)

[Fm= fosfomonoesterasa, Fd= fosfodiesterasa, Fn= fosfonatasa, NAG= N-acetil glucosaminidasa, BG= B-glucosidasa, PO= polifenol oxidasa]

Tabla 12. Resultados del ANOVA de la actividad enzimática. Se presenta el valor de F junto con el valor de p entre paréntesis. Los datos con diferencias significativas se encuentran en color rojo.

Variable	Sitio	Tratamiento	Sitio*tratamiento
Fm	34 (p<0.0001)	0.06 (0.95)	0.21 (0.81)
NAG	0.092 (0.77)	0.73 (0.49)	1.32 (0.28)
BG	3.29 (0.08)	2.47 (0.1)	0.79 (0.46)
Fn	0.9 (0.35)	1.07 (0.36)	0.52 (0.6)
Fd	25 (p<0.0001)	1.2 (0.32)	0.61 (0.55)
PO	17 (0.0003)	0.57 (0.57)	1.52 (0.24)

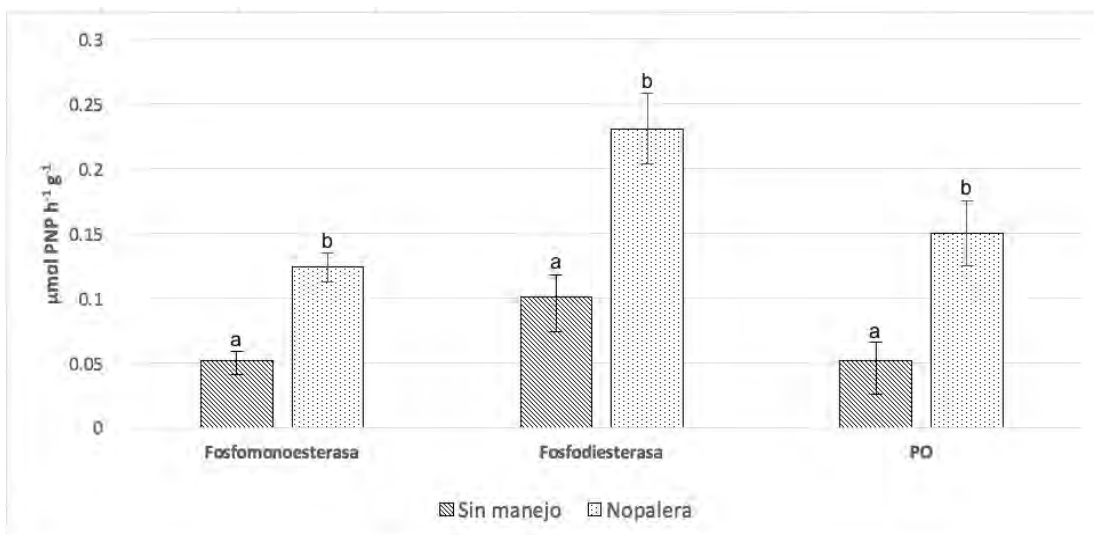


Figura 14. Promedio por sitios de las actividades enzimáticas de las enzimas Fm, Fd y PO ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)

8.3.2 Análisis de ácidos grasos

En la mayoría de los ácidos grasos hubo diferencias significativas entre sitios, mientras que entre tratamientos solamente presentaron diferencias significativas en el ácido graso 18:0 10 metil TBSA, el cual es un ácido graso correspondiente a las actinobacterias (Tabla 13). Para los ácidos grasos donde se obtuvieron diferencias significativas en el factor sitio, se obtuvieron mayores concentraciones de estos en las muestras provenientes del invernadero de nopal (concentración promedio de 1.18 nmoles de ácidos grasos g^{-1} de suelo) en comparación con las muestras provenientes del sitio abandonado (concentración promedio de 0.36 nmoles de ácidos grasos g^{-1} de suelo).

Para el ácido graso 18:0 10 metil TBSA, se realizó la prueba de Tukey y se encontraron diferencias significativas al comparar las muestras con tratamiento de glifosato y las muestras tratadas con Faena® ($p= 0.048$) obteniendo con este último la menor concentración promedio de este ácido graso (0.026 nmoles de 18:0 10 metil TSBA g^{-1} de suelo) en comparación con la concentración de las muestras tratadas con glifosato (0.12 nmoles de 18:0 10 metil TSBA g^{-1} de suelo).

Tabla 13. Valores de F y de p resultados del ANOVA factorial para cada uno de los ácidos grasos obtenidos. Los valores significativos se muestran en color rojo.

	Sitio	Tratamiento	Sitio*Tratamiento
10:0 3OH	60 (p<0.0001)	0.48 (0.627)	0.88 (0.43)
12:0 2OH	39 (p<0.0001)	0.93 (0.4)	0.88 (0.43)
12:0 3OH	42.5 (p<0.0001)	0.17 (0.84)	0.28 (0.76)
15:0 iso	50 (p<0.0001)	0.38 (0.69)	0.35 (0.71)
15:0 anteiso	52 (p<0.0001)	0.21 (0.81)	0.39 (0.68)
14:0 2OH	1.13 (0.29)	1.26 (0.3)	1.47 (0.25)
16:0 iso	22 (p<0.0001)	0.3 (0.74)	0.21 (0.81)
16:1 w5c	2.29 (0.14)	0.009 (0.99)	0.26 (0.77)
16:0	35 (p<0.0001)	0.33 (0.72)	0.25 (0.78)
17:0 iso	37 (p<0.0001)	0.2 (0.82)	0.35 (0.7)
17:0 anteiso	34 (p<0.0001)	0.5 (0.61)	0.75 (0.48)
17:0 cyclo	80 (p<0.0001)	0.05 (0.95)	0.09 (0.9)
16:0 2OH	41.4 (p<0.0001)	0.26 (0.77)	0.24 (0.79)
17:0 10_methyl	1.07 (0.31)	0.57 (0.57)	0.65 (0.53)
16:0 3OH	51 (p<0.0001)	0.035 (0.97)	0.15 (0.86)
18:1 w9c	26.4 (p<0.0001)	0.44 (0.65)	0.54 (0.59)
18:1 w7c 11_methyl	22 (p<0.0001)	1.14 (0.34)	0.71 (0.5)
18:0 10_methyl_ TBSA	19.5 (0.0002)	3.676 (0.041)	2.13 (0.14)
19:0 cyclo w8c	57 (p<0.0001)	0.38 (0.68)	0.3 (0.74)
18:0 2OH	0.69 (0.41)	0.27 (0.77)	0.18 (0.84)
19:0 10_methyl	14 (0.001)	0.06 (0.94)	0.06 (0.94)
18:0 3OH	25.5 (p<0.0001)	0.19 (0.82)	0.097 (0.91)
Summed Feature 3	42 (p<0.0001)	0.7 (0.5)	1.17 (0.33)
Summed Feature 5	18 (p<0.0001)	0.19 (0.82)	1.3 (0.29)

Los ácidos grasos se sumaron en cuatro grupos microbianos, los cuales tuvieron diferencias significativas solamente entre sitios (Tabla 14). La figura 15 muestra el promedio de la concentración de ácidos grasos por grupo microbiano y por sitio. En todos

los grupos microbianos se obtuvo mayor cantidad de ácidos grasos para el sitio del invernadero de nopal (con una concentración promedio de los grupos microbianos de 4.06 nmoles de ácidos grasos g^{-1} de suelo) en comparación al sitio abandonado (con una concentración promedio de los grupos microbianos de 1.17 nmoles de ácidos grasos g^{-1} de suelo).

Tabla 14. Valores de F y de p (entre paréntesis) resultados del ANOVA factorial para la concentración de ácidos grasos por grupo microbiano. Los valores significativos se muestran en color rojo.

	Sitio	Tratamiento	Sitio*Tratamiento
Gram positivo	43.5 (p<0.0001)	0.31 (0.74)	0.36 (0.7)
Gram negativo	26.5 (p<0.0001)	0.07 (0.93)	0.25 (0.7)
Actinobacterias	25.8 (p<0.0001)	0.29 (0.75)	0.36 (0.69)
Hongos	18 (p<0.0001)	0.19 (0.82)	1.3(0.29)
Saprófitos			

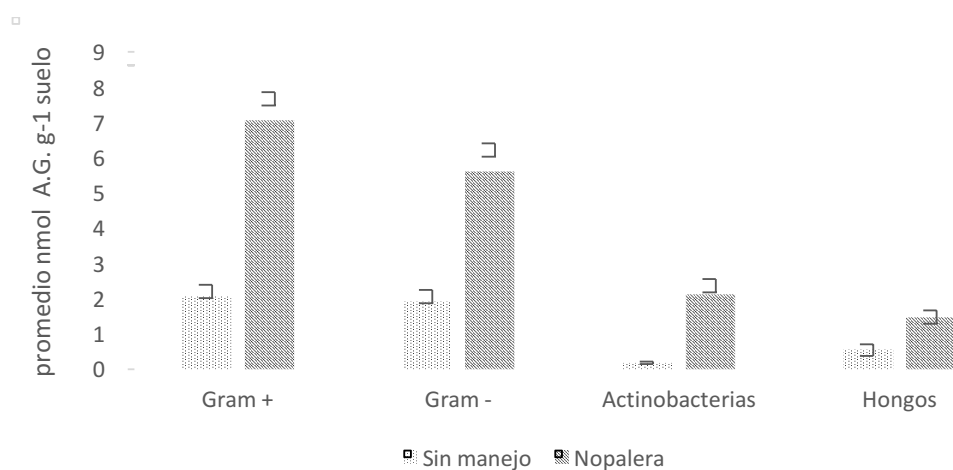


Figura 15. Promedio de concentración de ácidos grasos por grupos microbianos en los dos sitios.

En el análisis de componentes principales de la estructura de la comunidad determinada con los ácidos grasos, los primeros dos componentes representaron el 55.43% de la varianza, de la cual 35.98% correspondió al primer componente y 19.45% al segundo componente. La estructura de la comunidad fue diferente significativamente ($t = -11.289$, $p < 0.0001$) entre ambos sitios analizados (Figura 16).

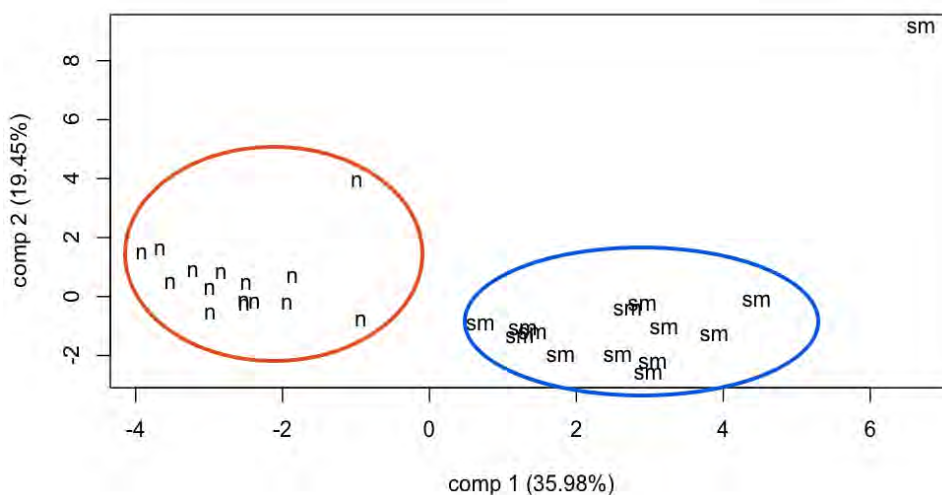


Figura 16. Agrupación entre sitios de acuerdo a análisis de componentes principales de la estructura de la comunidad microbiana determinada con ácidos grasos. Los puntos representados con “n” se refieren al sitio del invernadero con nopal, mientras que los representados por “sm” se refieren al sitio abandonado.

8.3.3 Experimento microbiológico

Se obtuvieron un total de 46 aislados en medio sin P, 555 aislados en medio con KH_2PO_4 , 490 aislados en medio con glifosato y 171 aislados en medio con Faena® (Figura 17).

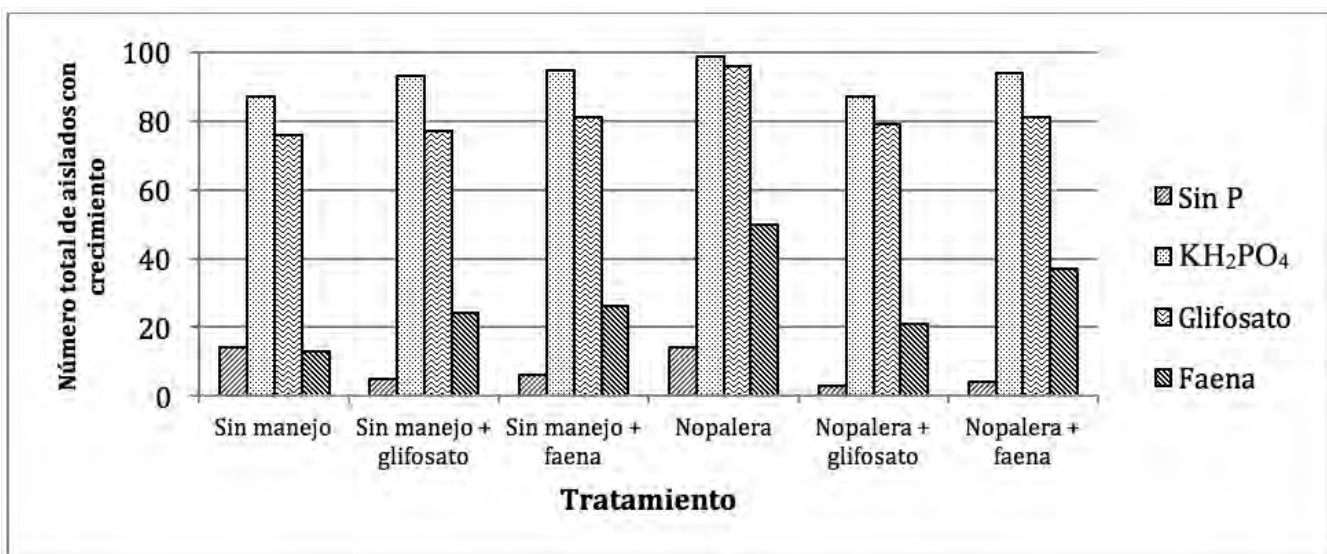


Figura 17. Número de aislados con crecimiento en diferentes fuentes de P y de muestras provenientes de diferentes tratamientos.

El número de aislados tuvo diferencias significativas para las interacciones sitio*incubación ($p=0.000003$) e incubación*fuentes ($p= 0.04$), donde la incubación se refiere al tratamiento que se utilizó en las incubaciones de suelo. El crecimiento de aislados provenientes de la incubación sin herbicida fue mayor para las bacterias obtenidas de suelo del sitio del invernadero de nopal en comparación con las obtenidas del sitio abandonado, mientras que no hubo diferencias entre sitios en los otros dos tratamientos de incubación (Figura 18). Así mismo, en las muestras provenientes de la nopalera, el crecimiento de aislados fue mayor en la incubación sin herbicida que el crecimiento en los otros dos tratamientos de incubación (Figura 18).

Para las muestras provenientes de cada tratamiento de incubación, el crecimiento de aislados fue mayor para las bacterias que tenían KH₂PO₄ como fuente de P, seguido por los que tenían glifosato, Faena® y al final el control, con excepción de la incubación sin tratamiento que no presentó diferencias entre el crecimiento de las fuentes de KH₂PO₄ y glifosato (Figura 19). Sin embargo, entre los tratamientos de las incubaciones, solamente se encontró diferencia en el medio sin P, siendo mayor el tratamiento de incubación sin herbicida que el tratamiento de incubación con glifosato y con Faena® (Figura 19).

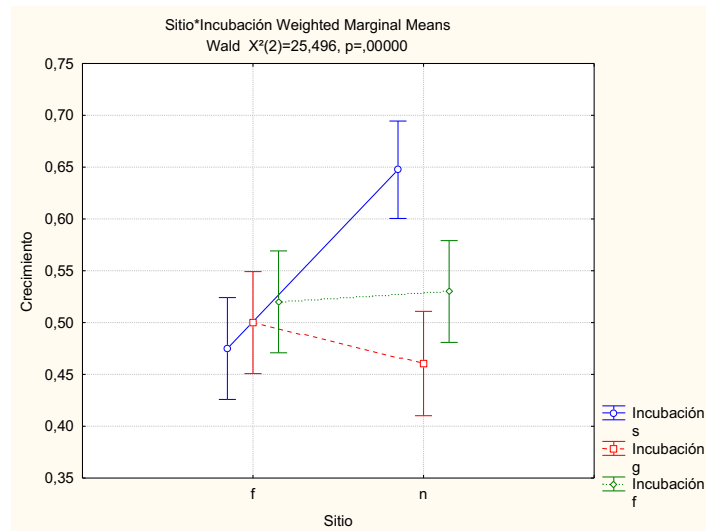


Figura 18. Interacción Sitio*Incubación, donde “f” pertenece al sitio abandonado, y “n” pertenece al invernadero con nopal. La incubación “s” se refiere a las muestras de suelo incubadas sin herbicida, la incubación “g” se refiere a las muestras incubadas con glifosato y la incubación “f” a las muestras incubadas con herbicida Faena®.

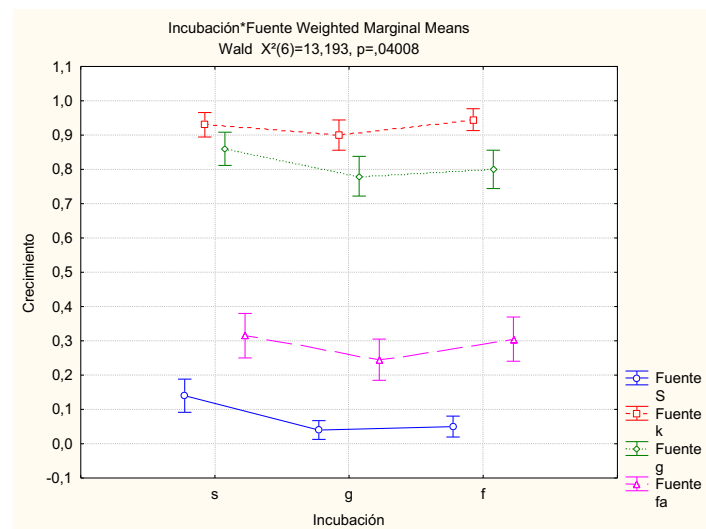


Figura 19. Interacción Incubación*Fuente, donde la incubación “s” se refiere a las muestras de suelo incubadas sin herbicida, la incubación “g” se refiere a las muestras incubadas con glifosato y la incubación “f” a las muestras incubadas con herbicida Faena®. La fuente “s” se refiere a las bacterias obtenidas en medio Sin P, la fuente “k” se refiere a las bacterias obtenidas en medio con KH_2PO_4 , la fuente “g” se refiere a las bacterias obtenidas en medio con glifosato como fuente de P, y la fuente “fa” a las obtenidas en medio con herbicida Faena®.

9. Discusión

9.1 Caracterización del sitio

El sitio agrícola fue el que presentó mayores concentraciones de la mayoría de las formas de nutrientes analizadas en comparación con el sitio abandonado (Figura 20a y 20b). El sitio con manejo agrícola, incluye el riego y la adición de agroquímicos en el suelo, como fertilizantes y herbicidas, además de la entrada de fertilizantes orgánicos como la composta, que probablemente son los principales factores que afectan la dinámica de estos nutrientes. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hernández-Becerra *et al.* (2016), quienes registraron mayores concentraciones en gran parte de los nutrientes analizados en un sitio agrícola con cultivo de alfalfa en el VCC, en comparación con un sitio abandonado y un sitio conservado.

A demás de los factores como la utilización de agroquímicos que pudieran afectar la dinámica de nutrientes, es importante mencionar que a pesar de que se llevaba a cabo la aplicación de herbicidas, las hierbas muertas no se retiraban en su totalidad, pudiendo ser una fuente de materia orgánica para el suelo (Figura 21). Así mismo, en este invernadero además de usar fertilizantes inorgánicos (N, P, K), también se añadía lixiviado de lombri-composta y composta sólida una vez al mes, lo cual representa una fuente importante de materia orgánica. Esto se ve reflejado en la mayor concentración de nutrientes orgánicos disueltos (COD, NOD y POD) en el invernadero de nopal, en comparación con la concentración de estos nutrientes en el sitio abandonado. El COD representa la principal fuente de energía para los microorganismos heterótrofos que liberan el N y P en formas disponibles a partir de la mineralización de los compuestos orgánicos (Neff y Asner, 2001).

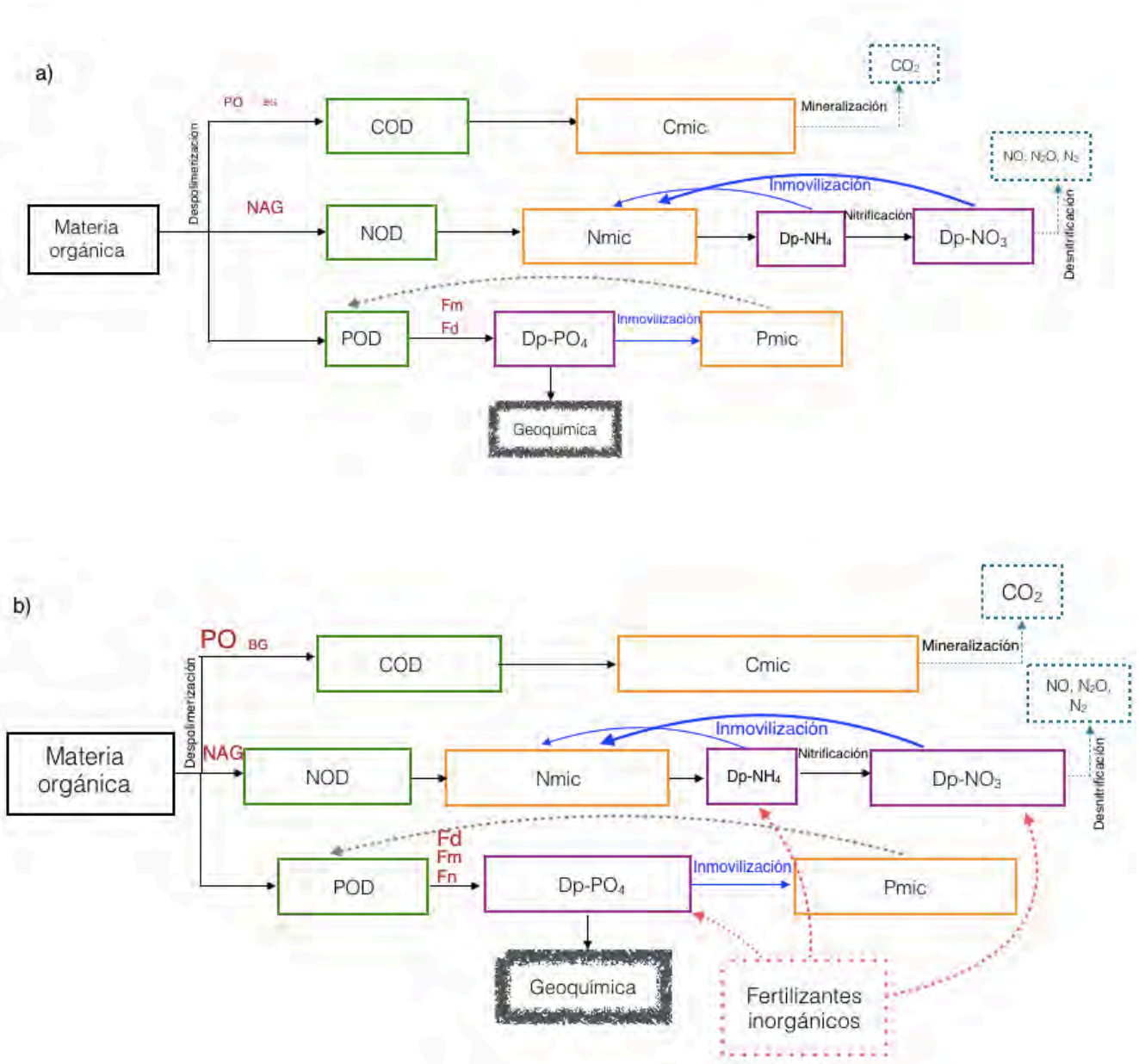


Figura 20. Dinámica de nutrientes representando diferencias en concentraciones con el tamaño de los cuadros en a) el sitio abandonado y b) el invernadero de nopal. Los cuadros color verde representan nutrientes disueltos (COD= C orgánico disuelto, NOD= N inorgánico disuelto, POD= P orgánico disuelto), los cuadros naranjas representan nutrientes en biomasa microbiana (Cmic= C microbiano, Nmic= N microbiano, Pmic= P microbiano), los cuadros púrpura representan nutrientes inorgánicos disponibles (Dp-NH₄= Amonio disponible, Dp-NO₃= Nitrato disponible, Dp-PO₄= Fósforo inorgánico disponible). Los cuadros punteados color azul representan pérdidas a la atmósfera. Las flechas azules representan inmovilización de nutrientes. Las letras color rojo representan la actividad enzimática (PO= polifenol oxidasa, NAG= N-acetil glucosaminidasa, BG= Beta glucosidasa, Fm= Fosfomonoesterasa, Fd= Fosfodiesterasa, Fn= Fosfonatasa).

Los resultados de esta tesis corroboran lo reportado por Hernández *et al.* (2016) donde concluyen que en las parcelas con manejo agrícola se incrementa la concentración de COD, debido a la fertilización y riego favoreciendo la productividad de las plantas y la actividad de los microorganismos del suelo. Estos dos factores son bajos en coberturas vegetales naturales en VCC, debido a las condiciones de aridez (Li *et al.*, 2009). Por lo tanto, se puede concluir que la baja concentración de nutrientes orgánicos disueltos en el sitio abandonado se debe a la ausencia de riego y fertilización, por lo tanto la vegetación actual era escasa, y había menor cantidad de materia orgánica en el suelo proveniente de la vegetación.



Figura 21. Invernadero de nopal en el Ejido de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Fotografía tomada el mes de Septiembre de 2014 por Pamela Chávez Ortiz.

La mayor concentración de COD y de N y P en formas disueltas y disponibles, sugiere un ambiente favorable para el crecimiento de la biomasa microbiana, lo cual se ve reflejado con la mayor concentración de Cmic obtenida en el invernadero de nopal en comparación con el sitio abandonado. Sin embargo, los cocientes C:N:P de la biomasa microbiana indican que el manejo agrícola ha cambiado las relaciones estequiométricas de los microorganismos.

El cociente microbiano de C:N:P en la parcela abandonada (48:5:1) fue más parecido al cociente propuesto por Cleveland y Liptzin (2007; 60:7:1), y es cercano al obtenido en un sitio conservado de VCC, que corresponde a 42:5:1 (Hernández *et al.*,

2016); mientras que el obtenido en la parcela con Nopal tuvo un cociente distinto (37:20:1) con proporciones más lejanas del cociente propuesto por Cleveland y Liptzin, y que difiere al cociente 100:33:1 obtenido por Hernández *et al.* (2016) en el sitio agrícola de alfalfa, sugiriendo que en el suelo del invernadero de nopal, los microorganismos inmovilizan en su biomasa una gran cantidad de N.

En el suelo del invernadero de nopal se encuentran altas concentraciones de N orgánico e inorgánico, como se observa en los resultados obtenidos en concentraciones de $Dp-NO_3^-$ y de NOD. La cantidad de N en exceso puede provocar que el crecimiento microbiano cambie de estar limitado por N a estar limitado por C (Chapin *et al.*, 2011). Debido a que los microorganismos tienen suficiente N, necesario para la síntesis de aminoácidos y proteínas, lo destinan a la producción de enzimas; lo cual puede explicarse en base a la correlación de NO_3^- con las enzimas Beta glucosidasa (BG), fosfonatasa (Fn), fosfodiesterasa (Fd) y fosfomonoesterasa (Fm), y en el NOD, que correlaciona con la enzima polifenol oxidasa (PO).

Los microorganismos heterótrofos de este sistema, utilizan enzimas como la BG, que participa en la degradación de la celulosa, liberando monómeros de glucosa a partir de celu-oligosacáridos (Sinsabaugh, 2004), para poder utilizar estos monómeros como fuentes de carbono, como se observa en la correlación positiva que existe entre el COD y la BG y en el Cmic y la BG, que sugiere que los microorganismos están utilizando la BG para obtener carbono orgánico disuelto, y que este carbono es el que se inmoviliza en su biomasa microbiana.

Las relaciones estequiométricas presentes en el sitio agrícola; donde el cociente $N_{mic}:P_{mic}$ es 20:1, en comparación al de Cleveland y Liptzin (2007) que corresponde a 7:1, también sugieren que el crecimiento de los microorganismos está limitado por el P; a pesar de las altas concentraciones de P disponible registradas en el sitio agrícola. Por esto mismo, parte del NO_3^- se destina a la producción de enzimas

(Fn, Fd y Fm) ligadas a la mineralización de diversas formas orgánicas de P en Pi. Comparado con otros estudios realizados en el VCC donde se mide la actividad enzimática (Tapia-Torres *et al.*, 2016), el presente estudio coincide en que en el invernadero de nopal, la actividad enzimática de la fosfodiesterasa es mayor a la actividad de la fosfomonoesterasa, lo cual sugiere que la comunidad microbiana del suelo obtiene el P principalmente de diésteres de fosfato. En suelos de Cuatro Ciénegas donde el P es un nutriente limitante, se ha observado la utilización de ADN como fuente de P, el cual es un diéster de fosfato (Tapia-Torres *et al.*, 2016). Así mismo, se observa que el POD está correlacionado positivamente con el Cmic y el Pmic, por lo que los microorganismos dependen de formas orgánicas de P para su crecimiento. Otra forma orgánica de P, que se ha observado que pueden utilizar los microorganismos del VCC, son los fosfonatos como el 2-Aminoetil fosfonato (2-AEP) (Tapia-Torres *et al.*, 2016), que requiere de la enzima fosfonatasa, de la cual se reportó actividad en el suelo del invernadero de nopal; lo que puede ser un indicio de que las bacterias intentan degradar fosfonatos como lo es el herbicida glifosato, o su subproducto más común que resulta de cuando el glifosato es utilizado como fuente de C, el ácido aminometil fosfónico, del cual hay evidencias indirectas de que requiere de fosfonatasas para ser mineralizado en P inorgánico (Sviridov *et al.*, 2012)

En el sitio abandonado, a pesar de la menor concentración de nutrientes, los cocientes estequiométricos son más parecidos a lo reportado en la literatura (Cleveland y Liptzin, 2007) y en otros trabajos de sitios conservados del VCC (Hernández *et al.*, 2016), lo que podría sugerir que este sitio no presenta gran perturbación. Sin embargo, si hay cambios en la dinámica de nutrientes de este sitio en comparación a suelos conservados del VCC, puesto que la baja concentración de NH_4^+ disponible y la mayor concentración de NO_3^- disponible sugiere que domina el proceso de nitrificación, realizado por bacterias autótrofas como lo son las bacterias de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosopumilus* y *Nitrospira* (Fenchel *et al.*, 2012), ya que existe poca disponibilidad de COD y pueden competir por el amonio disponible con las bacterias heterotróficas (Jones

et al., 2003), utilizando el amonio para la producción de energía (Chapin *et al.*, 2011). En los sitios conservados de Cuatro Ciénegas, no es dominante la nitrificación a pesar de las bajas concentraciones de COD que están dadas naturalmente por la aridez del sistema, sin embargo, en otros trabajos realizados donde se han estudiado sitios agrícolas abandonados del VCC, se ha documentado que este proceso domina (Martínez-Piedragil, 2013; Hernández *et al.*, 2016). Cuando se lleva a cabo la nitrificación, el N en forma de NO_3^- es más susceptible a perderse, ya sea por procesos de lixiviación o por medio de procesos de desnitrificación, donde se libera N gaseoso en forma de N_2 y también en forma de NO y N_2O , los cuales son gases importantes de efecto invernadero (Chapin *et al.*, 2011).

9.2 Oclusión de Fósforo

Los resultados reportados en este trabajo sugieren que los minerales del suelo estudiado tienen alta capacidad para ocluir P, ya que a las muestras que se les agregó más P tuvieron una mayor oclusión del P. Estos resultados coinciden con lo reportado por Perroni *et al.* (2014) en Gipsisoles dentro del Valle de VCC. Estos autores reportan una mayor capacidad de oclusión de P en suelos con pastizales que contienen mayor concentración de compuestos orgánicos, y concluyen que el P, además de ocluirse en cristales con iones como Ca y Mg, también se ocluye con formas no cristalinas, favorecidas por la presencia de compuestos orgánicos. Esto concuerda con los resultados de esta tesis, ya que la parcela con mayores contenidos de materia orgánica (parcela con nopal) presentó una mayor oclusión que los suelos de la parcela abandonada.

En las muestras con mayor nivel de fertilización, el tratamiento de Faena® disminuyó significativamente la oclusión. Así mismo, la menor pendiente de la recta de oclusión de P con los diferentes niveles de fertilización, fue en el tratamiento con Faena®. Esta reducción puede atribuirse a los otros compuestos que contiene el herbicida como adyuvantes que reducen las reacciones químicas en el suelo. Los adyuvantes se definen

como “ingredientes en la prescripción del herbicida que ayudan o modifican la acción del ingrediente principal” (Foy, 1987; Krogh *et al.*, 2003). En sentido general, los adyuvantes se añaden para aumentar la efectividad (biodisponibilidad) del plaguicida, aumentando la solubilidad o la compatibilidad de los ingredientes activos (Krogh *et al.*, 2003). Los adyuvantes comprenden un gran grupo de sustancias, dentro de las cuales los surfactantes son ampliamente utilizados (Foy, 1996). Los herbicidas con glifosato, además de los surfactantes contienen varios componentes menores que incluyen agentes anti-espumantes y colorantes, biocidas e iones inorgánicos para ajustar el pH (Badberry *et al.*, 2012). En los herbicidas con glifosato, a menudo son utilizados diversos surfactantes pertenecientes al grupo de de alquilaminas etoxiladas (Krogh *et al.*, 2003). Las alquilaminas etoxiladas (ANEOs) pueden unirse a las partículas del suelo de diferentes maneras (Figura 21). Las cadenas alquilo hidrofóbicas pueden adsorberse a la materia orgánica por medio de enlaces hidrofóbicos, mientras que las cadenas etoxi hidrofílicas, que contienen oxígenos unidos mediante enlaces éter (R-O-R'), puede unirse por medio de puentes de hidrógeno a minerales de arcilla polares en el suelo (Krogh *et al.*, 2003). Además, en las ANEOs, las porciones hidrofílicas e hidrofóbicas están conectadas por medio de un átomo de N. Este N puede protonarse dependiendo del valor de pK_a de la molécula y del pH de los alrededores. La forma protonada de las ANEOs puede formar enlaces iónicos, mientras que la forma desprotonada participa en enlaces complejos con los minerales del suelo (Krogh *et al.*, 2003). Los valores típicos de pK_a para los ANEO se encuentran en un rango del 5 al 7, por lo que el N se encuentra protonado en pH alrededor de 5 (Akzo, 1999; ICI Surfactants, 1987), pero a pH de los suelos agrícolas de Cuatro Ciénegas (alrededor de 8), se encontraría desprotonado.

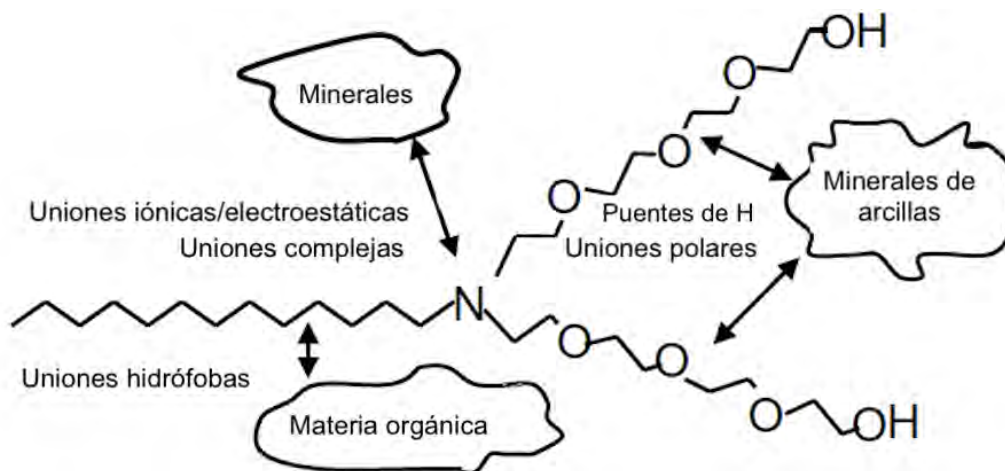


Figura 22. Interacciones de surfactantes los no iónicos clasificados como ANEOs, con diferentes compuestos del suelo. Imagen modificada de Krogh *et al.*, 2003

Dentro del grupo de las ANEOs, uno de los surfactantes más utilizados en formulaciones de herbicidas con glifosato es la polioxi-etileno amina (POEA), un surfactante no iónico, que consiste en una mezcla de alquil aminas de cadena larga polietoxiladas (Figura 23; Tush *et al.*, 2013), sintetizadas de ácidos grasos derivados de animales (Williams *et al.*, 2000). Se ha estudiado poco sobre la movilidad en el suelo de este compuesto, sin embargo se ha encontrado que la POEA es adsorbida fuertemente al suelo y que además, cationes como Na y Ca aumentan la adsorción de la POEA al suelo (Tush *et al.*, 2016).



Figura 23. Estructura teórica del POEA (Tush *et al.*, 2013)

Los resultados expresados en la Figura 8 y en la Figura 10, pueden deberse a que la adsorción de los surfactantes en las partículas del suelo pueden afectar la movilidad de otros químicos, como los plaguicidas (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2006). La adición de surfactantes no iónicos al suelo, disminuye la movilidad de los plaguicidas, los cuales probablemente son adsorbidos por los surfactantes previamente adsorbidos por el suelo

(Krogh *et al.*, 2013). Además se ha encontrado que la movilidad en el suelo de algunos plaguicidas como diazinon, atrazina y acefato disminuye en presencia de bajas concentraciones de surfactantes no iónicos. Se especula que el uso de la POEA en las formulaciones del glifosato, puede cambiar las características de sorción-desorción del glifosato en el suelo (Tush *et al.*, 2013), aunque se requieren más análisis que estudien las interacciones de estos surfactantes con el glifosato.

Se ha determinado que en la competencia de P inorgánico y glifosato por los sitios de adsorción del suelo, la adición de P inorgánico desplaza al glifosato puro de los sitios de sorción (Gimsing y Borggaard, 2001). Sin embargo si el POEA aumenta la oclusión de glifosato en el suelo, como ocurre con el aumento de la adsorción de otros plaguicidas con la adición de surfactantes (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2006), se podría promover mayor competitividad por los sitios de olusión, por parte del glifosato, afectando a la velocidad de oclusión de P como ocurrió en el presente estudio, sin embargo, se requieren más estudios al respecto.

9.3 Incubaciones de suelo y microbiología

9.3.1 Tasa de mineralización potencial de C

Los resultados obtenidos de mineralización de C sugieren que los factores sitio y tratamiento afectan a la mineralización de manera independiente, porque la interacción entre estos no fue significativa. En cuanto a los sitios, la mineralización fue mayor en el suelo proveniente del invernadero de nopal, lo que significa que este sistema con manejo agrícola favorece la actividad de los microorganismos heterótrofos, probablemente por la mayor disponibilidad de nutrientes como N y P en el suelo (Tabla 9). Esta diferencia entre sitios en cuanto a la mineralización potencial de C, concuerda con los resultados obtenidos del análisis de ácidos grasos, donde también se obtuvieron diferencias significativas entre sitios (Tabla 14), habiendo mayores concentraciones de ácidos grasos en el sitio del invernadero de nopal (Figura 15), y en algunas enzimas (Fm, Fd y PO) que mostraron

diferencias significativas entre sitios, con mayor actividad en el invernadero de nopal (Figura 14).

Las muestras de suelo donde se aplicó glifosato presentaron una menor tasa de mineralización de C promedio, en comparación al control. El glifosato puede afectar a los microorganismos del suelo al inhibir la ruta del ácido shiquímico, la cual se lleva no solamente en plantas, sino también en algunas bacterias y hongos (Bentley, 1990; Ratcliff, 2006). La inhibición de esta ruta, afecta a la síntesis proteica al impedir la formación de aminoácidos aromáticos (Bentley, 1990; Franz *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de que el glifosato puede afectar a microorganismos que lleven a cabo esta ruta, algunos estudios realizados han observado un aumento en la liberación de CO₂ a partir de suelos que contienen glifosato (Aráujo *et al.*, 2003) e incluso han determinado que el glifosato en dosis altas llega a estimular la respiración microbiana del suelo (Haney *et al.*, 2000). Estos estudios sugieren que el glifosato es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono y por ello aumenta la producción de CO₂, probablemente los resultados de esta tesis difieren por que los microorganismos del suelo del VCC sean más afectados por el glifosato y les sea más difícil utilizarlo como fuente de carbono, sin embargo para confirmar esto, se requiere analizar la capacidad de los microorganismos del VCC para utilizar el glifosato como fuente de C.

Otro factor que puede explicar la diferencia entre los resultados de esta tesis con otros estudios publicados, puede ser que la comunidad microbiana del suelo de Cuatro Ciénegas sea más susceptible a ser afectada negativamente por el glifosato. Se ha determinado que una aplicación constante de glifosato, puede llegar a seleccionar las poblaciones microbianas capaces de utilizarlo (Andréa *et al.*, 2003). Por ejemplo, se han encontrado correlaciones entre tasas de mineralización y cantidad de *Pseudomonas* en el suelo (Gimsing *et al.*, 2004), así como suelos con mayor cantidad de bacterias Gram negativas y de proteobacterias después de cinco aplicaciones de glifosato (Lancaster *et al.*, 2010), por lo que probablemente los resultados de mineralización de C obtenidos en el

presente trabajo están relacionados con la comunidad microbiana de los suelos estudiados.

Análisis moleculares realizados en el suelo en la parcela con cultivo de alfalfa de Cuatro Ciénegas muestran mayores proporciones de Proteobacterias seguidas por Gemmatimonadetes y Acidobacterias, los primeros dos phyla pertenecen a bacterias Gram negativas, mientras que las Actinobacterias son Gram positivas (Hernández *et al.*, 2016). Sin embargo, los análisis de ácidos grasos realizados en este estudio muestran una proporción diferente de la comunidad microbiana, puesto que en el sitio agrícola con nopal son más abundantes las bacterias Gram positivas, dentro de las cuales están los phyla Firmicutes y Actinobacterias (Woese, 1987), mientras que en el sitio abandonado hay una misma proporción de ácidos grasos pertenecientes a bacterias Gram positivas y Gram negativas. A pesar de las correlaciones encontradas con bacterias Gram negativas y *Pseudomonas*, la degradación del glifosato no es específica para algún género bacteriano (Singh *et al.*, 2006), por lo que probablemente las bacterias Gram positivas que se encuentran en el VCC, podrían ser capaces de degradar el glifosato, pero ser más susceptibles a ser afectadas negativamente por el glifosato.

A pesar de los efectos que tuvo el glifosato en la respiración, la aplicación del herbicida Faena® no presentó resultados diferentes al control. Esto concuerda con otros estudios que reportan pocos cambios en la biomasa microbiana, pero ningún cambio en la respiración del suelo, al utilizar formulaciones comerciales de este herbicida (Stratton y Stewart, 1992).

Los resultados del efecto intermedio del herbicida Faena®, pueden estar relacionados al comportamiento químico del herbicida en el suelo. Como se mencionó en la sección anterior, los componentes inertes del herbicida, como el surfactante, podría estar afectando la oclusión del glifosato en el suelo, haciéndolo menos móvil en

comparación con el glifosato puro (Tush *et al.*, 2013), y por lo tanto, menos disponible para su adquisición por los microorganismos.

En cuanto a los resultados biogeoquímicos, se presentaron diferencias significativas entre sitios en la mayoría de las variables. El Pmic fue la única variable que presentó diferencias entre tratamientos, obteniéndose menor concentración de Pmic en el suelo tratado con Faena®. Los microorganismos requieren altas concentraciones de P en su biomasa para mantener síntesis rápida de proteínas; dado que estos requieren responder rápidamente a las condiciones ambientales del suelo altamente variables (Chapin *et al.*, 2011). Además, el P microbiano es importante porque constituye una fuente de P potencialmente disponible (Richardson *et al.*, 1994), por lo tanto la aplicación del herbicida Faena® podría estar disminuyendo esta fuente de P.

9.3.2 Análisis de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos resultó en diferencias significativas entre sitios, lo cual indica que las prácticas agrícolas no sólo modifican la actividad microbiana como se vio con la mineralización de C, si no también modifican la composición de la comunidad microbiana del suelo. En este estudio, se reporta una mayor concentración de ácidos grasos en el sitio agrícola con nopal para todos los grupos microbianos (Figura 15). Esto puede estar relacionado con el aumento de fuentes de carbono orgánico total, como carbono y nutrientes disponibles. Diversos estudios han demostrado que hay grupos microbianos que contienen algunos ácidos grasos que se encuentran enriquecidos cuando se aumenta el carbono orgánico, como son los ácidos 15:0 anteiso, 17:0 anteiso, 16:0 iso, 18:0 10 metil y 15:0 iso (Bossio *et al.*, 1998). Estos grupos también fueron más abundantes en el suelo con mayores contenidos de materia orgánica (nopalera). Otros perfiles de ácidos grasos en suelos agrícolas reportan mayor abundancia de actinobacterias y bacterias Gram positivas (Bossio, 2005), coincidiendo con este estudio donde se presenta una mayor concentración de ácidos grasos correspondientes a bacterias Gram positivas en

el sitio agrícola, pero la concentración de ácidos grasos correspondientes a actinobacterias fue menor. Esto también difiere de otros estudios sobre los microorganismos de suelos del VCC, ya que las actinobacterias son uno de los grupos predominantes que se han encontrado en metagenomas de pastizales conservados, en sitios agrícolas abandonados y en parcelas agrícolas con cultivo de alfalfa (Hernández *et al.*, 2016). Dentro de los microorganismos cultivables aislados del VCC, también las actinobacterias han sido uno de los grupos dominantes (Tapia-Torres *et al.*, 2016).

Los tratamientos con glifosato y herbicida Faena® únicamente afectaron la concentración del ácido graso 18:0 19 metil TBSA, la cual disminuyó con el tratamiento del herbicida Faena®. Este ácido graso corresponde al grupo de actinobacterias. Se han documentado diversas respuestas de las actinobacterias frente a herbicidas con glifosato; algunos estudios han reportado que las poblaciones de actinobacterias aumentan con aplicaciones de glifosato en grado analítico (Aráujo *et al.*, 2003). Sin embargo, también se ha encontrado que este grupo de bacterias puede disminuirse con la aplicación de herbicidas con glifosato, como el Glysato (Sebiomo *et al.*, 2011), lo que puede significar que solo ciertas especies de actinobacterias son afectadas por este herbicida.

9.3.3 Utilización de glifosato como fuente de P

De un total de 555 aislados que crecieron en el control positivo (KH_2PO_4), el 88% pudo crecer utilizando glifosato puro como fuente de P y el 30% pudo crecer utilizando el herbicida Faena® como fuente de P. El crecimiento de las bacterias utilizando glifosato como fuente de P, un fosfonato antropogénico, nos indica que la mayoría de las bacterias aisladas tanto del sitio agrícola, como del sitio abandonado, tienen las enzimas necesarias para la mineralización de fosfonatos, las cuales pueden ser el complejo enzimático C-P liasa o la enzima fosfonatasa.

El complejo enzimático C-P liasa cataliza el rompimiento directo del enlace C-P de la molécula del glifosato, teniendo como subproducto sarcosina (N-metilglicina, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$)

y PO_4^{3-} (Pipke *et al.*, 1988; Sviridov *et al.*, 2015). Otra ruta de degradación del glifosato, implica la ruptura del enlace C-N de la molécula por medio de la enzima glifosato oxidorreductasa (GOR), teniendo como subproductos al glioxilato (C_2HO_3^-) (Borggard y Gimsing, 2008) y al ácido aminometil fosfónico (AMPA, $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$) el cual se rompe en pasos subsecuentes para producir fosfato inorgánico, CO_2 y NH_3 , o bien puede ser exportado al espacio extracelular (Ávila *et al.*, 1987; Sviridov *et al.*, 2015). Las bacterias pueden obtener fósforo inorgánico a través de la degradación del AMPA. Hay evidencias indirectas de que una ruta metabólica para la degradación del AMPA es similar a la de la degradación de 2-aminoetil fosfonato (2-AEP) un fosfonato similar, lo que incluye una transaminación por una aminotransferasa y un rompimiento del enlace C-P por una hidrolasa específica, Sviridov *et al.* (2012) reportaron que al cultivar las cepas de *O. anthropi* GPK3 utilizando el glifosato como fuente de P, fue inducida la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa (fosfonatasa) que participa en la degradación el 2-AEP (Figura 24).

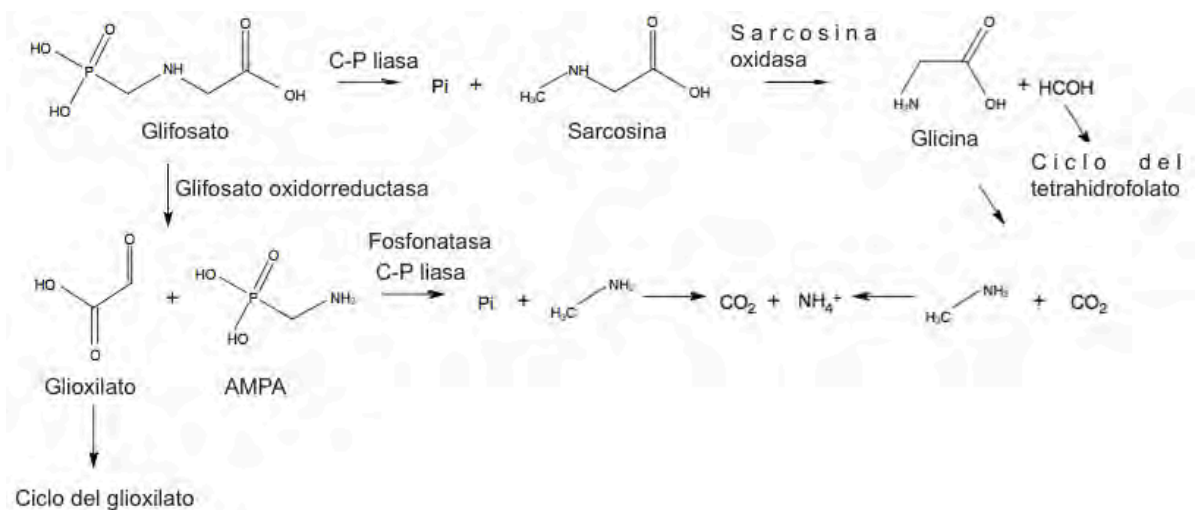


Figura 24. Rutas de degradación del glifosato. Modificado de Boggaard y Gimsing, 2008.

En otros trabajos se indica que bacterias de sitios conservados de Cuatro Ciénegas (Churince y Pozas Azules), debido a la escasez de P, tienen la capacidad de degradar el fosfonato antropogénico 2-AEP (Tapia-Torres *et al.*, 2016), el cual requiere de la utilización

de la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa para ser mineralizado (Rosenberg y La Nauze, 1970). También se han reportado bacterias edáficas provenientes de los sitios conservados de Cuatro Ciénegas capaces de utilizar el glifosato como fuente de P, las cuales en su mayoría pertenecieron al phylum Firmicutes (Morón, 2014). La capacidad de estas bacterias nativas de los suelos de CC para utilizar el glifosato como fuente de P, puede haber sido una ventaja para las bacterias Gram positivas, lo que se ve reflejado en el análisis de ácidos grasos.

Sin embargo, a pesar de que las bacterias demostraron tener las herramientas enzimáticas necesarias para mineralizar el glifosato, no todas las bacterias tuvieron la capacidad de sobrevivir en medio de cultivo con el herbicida Faena® como fuente de P, posiblemente por algunas características tóxicas que se le han atribuido a este herbicida debido a los otros ingredientes en su formulación, como los surfactantes, siendo el POEA el más utilizado. Se han realizado algunas investigaciones sobre la toxicidad del glifosato y de los herbicidas comerciales que contienen glifosato. Tsui *et al.* (2003) mostraron que la toxicidad del herbicida Roundup en organismos acuáticos puede ser atribuida al surfactante POEA. En este estudio se analizó la toxicidad del POEA en diversos organismos y se determinó que la LC50s varió de 0.57 a 10.2 mg/L, siendo la bacteria *Vibrio fischeri* la menos sensible a la toxicidad del POEA (dosis letal media de 10.2 mg/L). Sin embargo, la toxicidad del POEA en esta bacteria fue mayor que la del glifosato de grado analítico (DL50=17.5 mg/L). Nobels *et al.* (2011) determinaron que en bacterias *Escherichia coli*, el POEA causa daños en las membranas y lesiones celulares generales, además de que produce estrés oxidativo y daña al DNA lo que provoca la inducción de ciertos marcadores de DNA (RecA, UmuDC y SfiA) que son parte de la respuesta SOS bacteriana, un mecanismo de reparación en bacterias que es activado para que estas puedan sobrevivir a aumentos repentinos de daños en el DNA (Michel, 2005), lo cual sigue la genotoxicidad del surfactante.

Las bacterias que pudieron utilizar el herbicida Faena® como fuente de P, son de importancia biotecnológica, puesto que se podrían realizar experimentos con estas para ser utilizadas con fines de biorremediación de sitios contaminados con herbicidas con glifosato.

10. Conclusiones

Los sitios analizados presentaron diferencias significativas en las concentraciones de nutrientes y la actividad enzimática. El sitio agrícola presentó concentraciones muy elevadas de N, de acuerdo a las proporciones estequiométricas C:N:P, lo que ocasiona que tanto el C como el P sean nutrientes limitantes, y los microorganismos tengan altas actividades enzimáticas para la obtención de estos nutrientes.

El sitio abandonado, además de tener concentraciones más bajas de nutrientes en comparación con el invernadero con nopal, domina el proceso de nitrificación, por lo que el N es más susceptible a perderse por lixiviación y desnitrificación, favoreciendo las emisiones de gases de efecto invernadero.

El P en el sitio agrícola se ocluye en mayor proporción y a mayor velocidad en comparación con el sitio abandonado. Sin embargo, la adición del herbicida comercial Faena®, disminuye la concentración de P ocluido, así como la velocidad de oclusión de P. Esto puede darse debido a que el surfactante que contiene la formulación comercial del herbicida, puede llegar a modificar el comportamiento del glifosato en el suelo, aumentando su oclusión y su competencia con el P inorgánico por los sitios de oclusión del suelo. Sin embargo, se requieren más estudios sobre el efecto de los surfactantes en la adsorción de glifosato.

En este trabajo, también se determinó como se modifica la actividad microbiana, tanto por el manejo, como por la adición de glifosato. Los cambios en la actividad microbiana se observaron en los análisis de mineralización de C en el suelo, la cual resultó ser mayor en el suelo del invernadero con nopal. Resultó significativa la diferencia en la tasa potencial de mineralización de C, donde el tratamiento de glifosato disminuyó la tasa potencial de mineralización, lo que quiere decir que el glifosato disminuye la actividad microbiana en el suelo. Sin embargo, no hubo afectó

a la estructura de la comunidad, como se muestra en los análisis de ácidos grasos, con excepción de que el herbicida Faena® redujo a las poblaciones de actinobacterias.

Así mismo, el Faena® afectaba a gran parte de los microorganismos al ser cultivados en medio sólido; ya que sólo un 30% pudo utilizar este herbicida como fuente de P. Sin embargo, no se llegaron a identificar estos aislados bacterianos, por lo que no se sabe que tan diversos fueron estos microorganismos o si pertenecían a la misma especie de bacteria.

Con este trabajo se puede concluir también que a pesar que el herbicida Faena® tiene efectos en los microorganismos cultivados *in vitro*, estos efectos se ven amortiguados en los suelos estudiados, probablemente por la adsorción del glifosato y su surfactante en los suelos, lo cual disminuye su biodisponibilidad y por lo tanto, sus efectos negativos para la microbiota.

11. Literatura Citada

- Akzo Nobel, 1999. Safety Data Sheet, Berol 907.
- Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC genomics*, 11(1), 332.
- Alexander, M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211(4478), 132-138.
- Anderson, J. P. E., Domsch, K. H. (1978). Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(3), 207-213.
- Andréa, M. M. D., Peres, T. B., Luchini, L. C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M. B., Savoy, V. L. T. (2003). Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 38(11), 1329-1335.
- Araújo, A. D., Monteiro, R. T. R., Abarkeli, R. B. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52(5), 799-804.
- Ávila, L. Z., Loo, S. H., Frost, J. W. (1987). Chemical and mutagenic analysis of aminomethylphosphonate biodegradation. *Journal of the American Chemical Society*, 109(22), 6758-6764.
- Barber, S. A. (1984). Soil nutrient availability. *Wiley, New York*.
- Beltrán, O (2017). Dinámica de nutrientes del suelo bajo cultivo intensivo de alfalfa en la región ganadera del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Bentley, R., Haslam, E. (1990). The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(5), 307-384.

- Borggaard, O. K., Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64(4), 441-456.
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N., Graham, K. J. (1998). Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36(1), 1-12.
- Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., Vale, J. A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3), 159-167.
- Bremner J. M. (1996) Nitrogen-Total. In Sparks D. L. A L Page ME Summer M.A. Tabata.
- Brookes P., Landman A., Pruden G., Jenkinson D. (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17:837-842
- Buckingham, S. E., Neff, J., Titiz-Maybach, B., Reynolds, R. L. (2010). Chemical and textural controls on phosphorus mobility in drylands of southeastern Utah. *Biogeochemistry*, 100(1-3), 105-120.
- Buffin, D., Topsy, J. (2002). Health and environmental impacts of glyphosate. *Pesticide Action Network U.K.*, 1-40.
- Carreira, J. A., Vinegla, B., Lajtha, K. (2006). Secondary CaCO₃ and precipitation of P–Ca compounds control the retention of soil P in arid ecosystems. *Journal of Arid Environments*, 64(3), 460-473.
- Cerritos, R., Eguiarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J. L., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., Souza, V. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(2), 303–18.
- Cleveland, C. C., Liptzin, D. (2007). C:N:P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? *Biogeochemistry*, 85(3), 235–252.

- Cole CV, Elliott ET, Hunt HW, Coleman DC. 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. V. Phosphorus transformations. *Microbial Ecology* 4, 381-387.
- CONAGUA, (2010). <http://smn.cna.gob.mx/tools/RECURSOS/Normales5110/NORMAL05009.TXT>
- CONANP. (2007). Programa de desarrollo regional Sustentable. Estudio sobre el cambio de uso de suelos en el Valle de Cuatro Ciénegas periodo 2002-2006 (pp. 1–50).
- Cross, A. F., Schlesinger, W. H. (2001). Biological and geochemical controls on phosphorus fractions in semiarid soils. *Biogeochemistry*, 52(2), 155-172.
- Challenger A. (1998). Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: Pasado, presente y futuro. Mexico: CONABIO-Instituto de Biología Agrupación Sierra Madre.
- Damonte, M., Sánchez, R. M. T., dos Santos Afonso, M. (2007). Some aspects of the glyphosate adsorption on montmorillonite and its calcined form. *Applied Clay Science*, 36(1), 86-94.
- de Jonge, H., de Jonge, L. W., Jacobsen, O. H., Yamaguchi, T., Moldrup, P. (2001). Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science*, 166(4), 230-238.
- DOF, (2008), “Acuerdo por el que se dan a conocer los estudios técnicos del Acuífero 0528 Cuatrociénegas y se modifican los límites y planos de localización que respecto del mismo se dieron a conocer en el Acuerdo por el que se dan a conocer los límites de 188 acuíferos de los Estados Unidos Mexicanos, los resultados de los estudios realizados para determinar su disponibilidad media anual de agua y sus planos de localización”, México, Diario Oficial de la Federación 16 de junio 2008.
- Duke, S. O., Powles, S. B. (2008). Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319-325.
- EPA. (2009). What is a Pesticide? <http://www.epa.gov/opp00001/about/>

- Falkowski, P. G., Fenchel, T., DeLong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034–9. doi:10.1126/science.1153213
- FAO, "Enseñanzas de la revolución verde: hacia una nueva revolución verde" (1996). Documentos técnicos de referencia, Vol 2. Cumbre Mundial sobre la Alimentación, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- FAO, I. (2015). Status of the World's Soil Resources (SWSR)—Main Report. *Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy*, 650.
- FAO. (2013). FAO statistical yearbook 2013. World food and agriculture.
- Fenchel, T., King, G. M., Blackburn, H. (2012). The Ecophysiology of the bacterial Biochemistry: the Ecophysiology of mineral cycling (3° ed., p. 312). Academic Press.
- Fioretto, A., Papa, S., Pellegrino, A., Ferrigno, A. (2009). Microbial activities in soils of a Mediterranean ecosystem in different successional stages. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2061-2068.
- Fischer, R.J., Oehmcke, S., Meyer, U., Mix, M., Schwarz, K., Fiedler, T., Bahl, H. (2006) Transcription of the pst operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J Bacteriol* 188: 5469– 5478.
- Foy, C. L. (1996). Adjuvants—current technology and trends. *Pesticide formulation and adjuvant technology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 323-352.
- Foy, C.L., (1987). Adjuvants: Terminology, classification, and mode of action. In: Chow, P.N.P., Grant, C.A., Hinshalwood, A.M., Simundson, E. (Eds.), *Adjuvants and Agrochemicals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–15.
- Franz, J. E; Mao, M. K., Sikorski, J. A., (1997). Glyphosate: a unique global herbicide. Washington, DC, *American Chemical Society*. 653p. (American Chemical Society Monograph 189)
- Frossard, E., Condon, L.M., Oberson, A., Sinaj, S., Fardeau, J.C., (2000). Processes

governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality* 29, 15–23.

- Galloway, T. Handy, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12(1-4), 345-363.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B., Eggers, S. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 11(2), 97-105.
- Gianfreda, L., Rao, M. A. (2011). The influence of pesticides on soil enzymes. In *Soil Enzymology* (pp. 293-312). Springer Berlin Heidelberg.
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K. (2001). Effect of KCl and CaCl₂ as background electrolytes on the competitive adsorption of glyphosate and phosphate on goethite. *Clays and Clay Minerals*, 49(3), 270-275.
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K. (2002). Effect of phosphate on the adsorption of glyphosate on soils, clay minerals and oxides. *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry*, 82(8-9), 545-552.
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K., Jacobsen, O. S., Aamand, J., Sørensen, J. (2004). Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology*, 27(3), 233-242.
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., Wu, L. (2011). Pesticides industry sales and usage. *Environmental Protection Agency, US*.
- Haney, L., S., Senseman, F., Honsy, Zuberer. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* (48), 89-93.
- Hayes, V. E., N. G. Ternan, and G. McMullan. (2000). Organophosphonate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS Microbiology Letters* 186: 171-175.
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., Chauhan, B. S. (1982). Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 970–976.

- Hensley, D. L., Beuerman, D. S. N., Carpenter, P. L. (1978). The inactivation of glyphosate by various soils and metal salts. *Weed Research*, 18(5), 287-291.
- Hernández Becerra, Natali. (2014) Dinámica de C, N y P y composición de la comunidad bacteriana del suelo de un gradiente de manejo agrícola en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. (Tesis de licenciatura en Ciencias Ambientales). Universidad Nacional Autónoma de México
- Hernández-Becerra, N., Tapia-Torres, Y., Beltrán-Paz, O., Blaz, J., Souza, V., García-Oliva, F. (2016). Agricultural land-use change in a Mexican oligotrophic desert depletes ecosystem stability. *Peer Journal*, 4, e2365.
- Hernández, H. M. (2006). La vida en los desiertos mexicanos (p. 188). Ciudad de Mexico, Mexico: Fondo de cultura económica.
- Huffman E. N. (1997) Performance of a new automatic carbon dioxide coulometer. *Microchemical Journal* 2, 567-573.
- ICI Surfactants, 1987. Safety data, Atlas G-3780 A.
- INECC. <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/glifosato.pdf>. Revisado en abril de 2016
- Iranzo M, Sain-Pardo I, Boluda R, Sanchez J. Mormeneo S. (2001) The use of microorganisms in environmental remediation. *Annals of Microbiology* 51, 135–143.
- Jacobsen, C. S., Hjelmsø, M. H. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 15-20.
- Joergensen, R. G. (1996). The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the kEC value. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 25–31.
- Joergensen, R. G., Mueller, T. (1996). The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the kEN value. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 33–37.

- Jones, D. L., Shannon, D., Murphy, D. V., Farrar, J. (2004). Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(5), 749-756.
- Jones DL, Willett VB. 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38,991-999.
- Kolowith, L. C., Ingall, E. D., Benner, R. (2001). Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 46(2), 309-320.
- Kononova, S. V., Nesmeyanova, M. A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, 67(2), 184-195.
- Krogh, K. A., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B. B., Vejrup, K. V. (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere*, 50(7), 871-901.
- Lajtha, K., Schlesinger, W. H. (1988). The biogeochemistry of phosphorus cycling and phosphorus availability along a desert soil chronosequence. *Ecology*, 24-39.
- Lajtha, K., Driscoll, C. T., Jarrell, W. M., Elliott, E. T. (1999). Soil phosphorus: characterization and total element analysis. *Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press, New York, 115-142.
- Lancaster, S. H., Hollister, E. B., Senseman, S. A., Gentry, T. J. (2010). Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. *Pest Management Science*, 66(1), 59-64.
- Lehmann, C., Osleger, D. A., Montañez, I. P., Sliter, W., Vanneau, A. A., Banner, J. (1999). Evolution of Cupido and Coahuila carbonate platforms, early Cretaceous, northeastern Mexico. *Geological Society of America Bulletin*, 111(7), 1010-1029.
- Lepers, E., Lambin, E. F., Janetos, A. C., De Fries, R., Archad, F., Ramankutty, N., Scholes, R. J. (2005). A synthesis of rapid land-cover change information for the 1981–2000 period. *BioScience*, 55(2), 115–124.

- Li, X., Li, Y., Li, F., Ma, Q., Zhang, P., Yin, P. (2009). Changes in soil organic carbon, nutrients and aggregation after conversion of native desert soil into irrigated arable land. *Soil and Tillage Research*, 104(2), 263–269.
- López-Lozano, N. E., Heidelberg, K. B., Nelson, W. C., García-Oliva, F., Eguiarte, L. E., Souza, V. (2013). Microbial secondary succession in soil microcosms of a desert oasis in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico. *PeerJ*, 1, e47.
- Martínez-Piedragil, C. (2013). Dinámica de nutrientes en parcelas agrícolas abandonadas en el Valle de Cuatrociénegas, Coahuila (Tesis de maestría en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional Autónoma de México.
- McConnell, J. S., Hossner, L. R. (1985). pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(6), 1075-1078.
- MEA, Millennium Ecosystem Assessment—Ecosystems and Human Well-Being: Desertification Synthesis (World Resources Institute, Washington, DC, 2005).
- Michel B (2005) After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *Plos Biology* 3: 1174–1176.
- Morón, J.A. (2014). Degradación de N-fosfometil glicina (glifosato) por bacterias edáficas de Cuatro Ciénegas, Coahuila. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica). Instituto Tecnológico de Morelia.
- Müller, M. M., Rosenberg, C., Siltanen, H., Wartiovaara, T. (1981). Fate of glyphosate and its influence on nitrogen-cycling in two Finnish agriculture soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(1), 724-730.
- Murphy, J. A. M. E. S., Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- Neff, J. C., Asner, G. P. (2001). Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: synthesis and a model. *Ecosystems*, 4(1), 29-48.
- Nobels, I., Spanoghe, P., Haesaert, G., Robbens, J., Blust, R. (2011). Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *PLOS One*, 6(11), e24139.

- Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
- Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology*, 12(7), 648–58
- Perroni, Y., García-Oliva, F., Tapia-Torres, Y., Souza, V. (2014). Relationship between soil P fractions and microbial biomass in an oligotrophic grassland-desert scrub system. *Ecological Research*, 29(3), 463-472.
- Pinkava, D. J. (1979). Vegetation of and flora of the bolson of Cuatro Cienegas region Coahuila, Mexico [fibre plants]. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Ciudad de México, México.
- Pipke, R., and N. Amrhein. 1988. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Applied Environmental Microbiology*. 54, 1293-1296.
- Plassard, C., Louche, J., Ali, M. A., Duchemin, M., Legname, E., Cloutier-Hurteau, B. (2011). Diversity in phosphorus mobilisation and uptake in ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science*, 68(1), 33-43.
- Post. (1998) Organophosphate (Post note 12). Parliamentary Office of science and Technology, London, UK.
- Ratcliff, A. W., Busse, M. D., Shestak, C. J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 34(2), 114-124.
- Rey-Benayas JM, Bullock JM. 2012. Restoration of biodiversity and ecosystem services on agricultural land. *Ecosystems* 15, 883_899
- Rey-Benayas, J. M., Martins, A., Nicolau, J. M., Schulz, J. J. (2007). Abandonment of agricultural land: an overview of drivers and consequences. CAB Reviews. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2(057).

- Richardson, A. E. (1994). Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil Biota*, 50, 35-39.
- Ríos-Flores, J., Torres, J. R., Moreno, M. T., Rodríguez, Y. M. (2011). Productividad física y económica del metro cúbico de agua de riego por bombeo en el cultivo de alfalfa forrajera (*medicago sativa*) en la comarca lagunera, México, de 1990 a 2009. Nivel de agregación: ambos tipos de tenencia del suelo, Ejido y Pequeña. *Revista Chapingo*. 10, 1-10.
- Robertson, P. G., Coleman, D. C., Bledsoe, C. S., Sollins, P. (1999). Standard soil methods for long-term ecological research (pp. 258–271). New York: University Press, Oxford
- Rodríguez-Cruz, M. S., Sanchez-Martin, M. J., Andrades, M. S., Sánchez Camazano, M. (2006). Comparison of pesticide sorption by physicochemically modified soils with natural soils as a function of soil properties and pesticide hydrophobicity. *Soil & Sediment Contamination*, 15(4), 401-415.
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., Schoff, P. K. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235-1239.
- Rosenberg, H., La Nauze, J. M. (1967). The metabolism of phosphonates by microorganisms. The transport of aminoethylphosphonic acid in *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 141(1), 79-90.
- Ryan, J., Hasan, H. M., Baasiri, M., Tabbara, H. S. (1985). Availability and transformation of applied phosphorus in calcareous Lebanese soils. *Soil Science Society of America Journal*, 49(5), 1215-1220.
- Schlesinger, W. H. (1997). *Biogeochemistry* (Vol. 8). Gulf Professional Publishing.
- Schnürer, Y., Persson, P., Nilsson, M., Nordgren, A., Giesler, R. (2006). Effects of surface sorption on microbial degradation of glyphosate. *Environmental Science & Technology*, 40(13), 4145-4150.

- Sebiomo, A., Ogundero, V. W., Bankole, S. A. (2011). Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 770-778.
- SEMARNAT (2008). Informe de la situación del medio ambiente en México. *Informe técnico, SEMARNAT, México, DF.*
- SEMARNAT. (2012). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de cuentas ambientales. Edición 2012.
- Singh, B. K., Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology reviews*, 30(3), 428-471.
- Sinsabaugh, R. L. (2005). Fungal enzymes at the community scale. *Mycology Series*, 23, 349.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6565-6570.
- Sprankle, P., Meggitt, W. F., Penner, D. (1975). Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, 229-234.
- Stratton, G. W., Stewart, K. E. (1992). Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 7(3), 223-236.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Leontievsky, A. A. (2014). Glyphosate: safety risks, biodegradation, and bioremediation. In *Current Environmental Issues and Challenges* (pp. 183-195). Springer Netherlands.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., Leontievsky, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 188-195.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Zelenkova, N. F., Vinokurova, N. G., Morgunov, I. G., Ermakova, I. T., Leontievsky, A. A. (2012). Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 787-796.

- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301-307.
- Tapia-Torres, Y., García-Oliva, F. (2013). La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 231-242.
- Tapia-Torres, Y., Elser, J. J., Souza, V., García-Oliva, F. (2015). Ecoenzymatic stoichiometry at the extremes: How microbes cope in an ultra-oligotrophic desert soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 34-42.
- Tapia-Torres, Y., Rodríguez-Torres, M. D., Elser, J. J., Islas, A., Souza, V., García-Oliva, F., Olmedo-Álvarez, G. (2016). How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: lessons from bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 82(15), 4652-4662.
- Tsui, M. T., Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-1197.
- Tush, D., Meyer, M. T. (2016). Polyoxyethylene Tallow Amine, a Glyphosate Formulation Adjuvant: Soil Adsorption Characteristics, Degradation Profile, and Occurrence on Selected Soils from Agricultural Fields in Iowa, Illinois, Indiana, Kansas, Mississippi, and Missouri. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5781-5789.
- Tush, D., Loftin, K. A., Meyer, M. T. (2013). Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1319, 80-87.
- UNCCD y Zoï. Desertification. A visual synthesis. UNCCD-Zoï Environmental Network France. 2011.
- Vance, E., Brookes, P., Jenkinson, D. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(703–707).
- Verchot, L. V., Borelli, T. (2005). Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme

assays in degraded tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(4), 625-633.

- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas: Glifosato. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, (39), 169-186.
- Walker, T. W., Syers, J. K. (1976). The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma*, 15(1), 1-19.
- Wardle, D. A., Parkinson, D. (1990). Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 122(1), 29-37.
- Wardle, D. A., Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., van der Putten, W. H., Wall, D. H. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304, 1629-1633
- Williams, G. M., Kroes, R., Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31(2), 117-165.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221.